



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

VANESSA FERREIRA FRANCO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE *SPLICING* DA OSTEOPONTINA E
DO PTEN EM LINHAGENS CELULARES DE ENDOMÉTRIO**

**Orientadores: Prof^ª. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba
Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto**

**RIO DE JANEIRO
2020**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Programa de Pós-Graduação em Oncologia

VANESSA FERREIRA FRANCO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE *SPLICING* DA OSTEOPONTINA E
DO PTEN EM LINHAGENS CELULARES DE ENDOMÉTRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strico-sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia.

**Orientadores: Prof. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba
Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto**

RIO DE JANEIRO

2020

F825p Franco, Vanessa Ferreira

Perfil de expressão de isoformas de *SPLICING* da osteopontina e do PTEN em linhagens celulares de endométrio. / Vanessa Ferreira Franco. – Rio de Janeiro, 2020.
111f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2020.

Orientadora: Prof^a. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba
Co-Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

1. Osteopontina. 2. PTEN Fosfo-Hidrolase. 3. Splicing alternativo. 4. Neoplasias.
5. Neoplasias do Endométrio. I. Gimba, Etel Rodrigues Pereira (Orient.). II. Pinto, Luiz Felipe (Co-Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

Catálogo na fonte

Kátia Simões CRB7/5952



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Programa de Pós-Graduação em Oncologia**

VANESSA FERREIRA FRANCO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE *SPLICING* DA OSTEOPONTINA E
DO PTEN EM LINHAGENS CELULARES DE ENDOMÉTRIO**

**ORIENTADORES: Prof. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba
Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto**

Tese aprovada em: 28/01/2020

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá

Prof. Dra. Gabriela Nestal

Prof. Dra. Andréia Cristina de Mello

Prof. Dra. Danielly Cristiny Ferraz da Costa

Prof. Dra. Ianick Souto Martins - Suplente I

Prof. Dr. Leandro Miranda Alves - Suplente II

RIO DE JANEIRO

2020

*Aos pacientes que no seu sofrer diário, aguardam
respostas muitas vezes distantes de serem
atendidas.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que tudo aconteça.

Aos meus pais, por terem se doado por toda uma vida.

A Dra. Etel Gimba, por mais uma vez ter me aceito em seu grupo de pesquisa. Agradeço a oportunidade de ter me possibilitado desenvolver experimentos de bancada, bem como auxiliado na programação e interpretação dos mesmos. Obrigada pela paciência, pelo tempo dispendido, pelas inúmeras correções e por se mostrar incansável em busca da excelência. Gratifico especialmente por todos os ensinamentos em biologia celular e molecular os quais me proporcionam melhor entendimento da clínica.

Ao Dr. Luis Felipe, pelo auxílio e orientação dispensados nos momentos mais iniciais do desenvolvimento desse projeto.

Ao grupo da Dra. Etel Gimba e aqueles que já se despediram, por terem compartilhado tantos momentos de aprendizado. Obrigada à Dra. Luciana Bueno Ferreira, Dra. Isabella dos Santos Guimarães, Nataly Melo dos Santos, Paula Priscilla de Freitas, Ana Clara Santos da Fonseca Bastos, Mariana Concentino Menezes Brum, Abigail Cristina, Daniella Santos Mattos, Gabriela Ribeiro Silva e Bruna Prunes Pena Baroni Viana. Vocês são incrivelmente maravilhosas.

Ao grupo do Dr. Jose Morgado Días e do Dr. Júlio Madureira, pelo suporte e ajuda com experimentos. Agradeço ao Dr. Wallace Araújo, Dra. Annie Squiavinato, Dr. Murilo Ramos, Dr. Pedro Barcellos, Dr. Waldemir Souza, Dr. Leonardo Murad, Érika Elias, Amélia Perez, Jéssica de Andrade, Bruna Mendonça, Perony Nogueira, Dra. Renata Ivo por todo o tempo a mim dispensados.

A Dra. Nathalia da Costa Pereira Soares e ao Dr. Anderson Teodoro (UNIRIO), devido ao auxílio e colaboração nos experimentos que utilizam compostos do licopeno.

A Dra. Ya-Ting Husu e ao Dr Tim H.M. Huang, pelo fornecimento das linhagens celulares de endométrio e a colaboração nesse estudo.

Ao técnico do laboratório, Giovani Borges dos Santos, pelo auxílio durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Serviço de Ginecologia Oncológica do INCA, na pessoa do Dr. Érico Lustosa, pelo apoio e por possibilitar minha dedicação a especialidade.

“Tente mover o mundo - o primeiro passo será mover a si mesmo.”
(Platão)



**PERFIL DE EXPRESSÃO DE ISOFORMAS DE *SPLICING* DA OSTEOPONTINA E
DO PTEN EM LINHAGENS CELULARES DE ENDOMÉTRIO**

RESUMO

Tese de doutorado

Vanessa Ferreira Franco

O carcinoma endometrial (CE) é classificado nos subtipos I (endometrióide) e II (não endometrióide). Vários produtos gênicos foram estudados neste tumor, incluindo osteopontina (OPN) e o PTEN. Entretanto, os perfis de expressão de variantes de *splicing* da OPN (OPN-SI) e do PTEN (PTEN-SI), não foram investigados. As OPN-SI mais estudadas são as OPNa, OPNb e OPNc. As PTEN-SI são denominadas VS-FL (variante completa), VS-3a, VS-3b, VS-3c, VS-5a, VS-5b, VS-5c, VS-5d e VS-DeIE6. Este estudo objetivou caracterizar o padrão de expressão das OPN-SI e das PTEN-SI em linhagens celulares de endométrio, relacionar essa expressão com o grau e tipo histopatológico das linhagens tumorais investigadas, avaliar a expressão diferencial entre as linhagens tumorais e não tumorais de endométrio e analisar seus perfis de expressão em resposta ao tratamento com derivados de extratos de tomates. O RNA total foi extraído das linhagens celulares endometriais E6/E7/TERT e EM42 (não tumorais) e Ishikawa, RL95-2, AN3CA e KLE (tumorais), seguido da síntese de cDNA. A expressão transcricional, protéica e a viabilidade celular foram investigadas por qRT-PCR, imunoblot e ensaio de viabilidade por 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT). Demonstramos que todos transcritos das OPN-SI são expressos em todas as linhagens celulares, exceto na EM42, sendo o transcrito codificante da OPNa a isoforma expressa em níveis mais elevados. As três OPN-SI são expressas em níveis mais elevados em linhagens representativas de graus histopatológicos mais diferenciados. Em relação ao PTEN, as linhagens expressaram todas as PTEN-SI testadas, sendo a VS-FL a de maior nível de expressão, seguida das VS-DeIE6 e VS-3b. Em nível proteico, a OPN total é expressa em todas as linhagens e a PTEN completa somente em linhagens não tumorais. A pAKT exibiu um padrão de expressão oposto. O tratamento da KLE com preparações distintas de tomate contendo licopeno, diminuiu a viabilidade celular. Os níveis de expressão das variantes PTEN-FL, VS-DeIE6 e VS-3b mostraram-se maiores na linhagem tumoral tratada com o agente citotóxico em relação ao controle. Em nível protéico, a AKT mostrou-se expressa, de forma similar, na linhagem tumoral tratada com o extrato que contém licopeno, bem como na não tratada. No entanto, a pAKT exibiu menor expressão na linhagem tumoral tratada e a expressão da PTEN completa não foi detectada. Padrões de expressão diferenciais foram observados em algumas dessas isoformas entre células tumorais que representam diferentes graus e subtipos de tumor. O tratamento com extratos contendo licopeno, promoveram diminuição da viabilidade celular, aumento na expressão de isoformas específicas do PTEN e diminuição da expressão de pAKT. Em conjunto, nossos dados indicam que as OPN-SI e do PTEN-SI estudadas são expressas nas linhagens tumorais e não tumorais do endométrio. As OPN-SI e a VS-5c apresentam expressão diferencial nas linhagens celulares representativas dos tumores de endométrio do Tipo II e na linhagem celular não tumoral, respectivamente, indicando papel oposto entre elas. O tratamento com extratos contendo licopeno diminuem a viabilidade celular, aumentam a expressão de PTEN-SI e inibem a fosforilação de AKT, sugerindo que estas variantes, em especial a DeIE6 possam atuar na sobrevivência de células de CE. Nossos achados contribuem no conhecimento da biologia dos tumores de endométrio.



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação

**OSTEOPONTIN AND PTEN ISOFORMS EXPRESSION PATTERNS IN
ENDOMETRIUM CARCINOMA CELL LINES**

ABSTRACT

PhD. Thesis

Vanessa Ferreira Franco

Endometrial carcinoma (EC) is classified in subtypes I (endometrioid) and II (non-endometrioid). Several gene products have been studied in this tumor, including osteopontin (OPN) and PTEN. However, the expression profiles of OPN splicing variants (OPN-SI) and their PTEN isoforms expression (PTEN-SI) were not investigated, in these tumors. The main OPN-SI are OPNa, OPNb and OPNc. The PTEN-SI are called VS-FL (full variant), VS-3a, VS-3b, VS-3c, VS-5a, VS-5b, VS-5c, VS-5d and VS-DelE6. This work aims to characterize the expression pattern of OPN-SI and PTEN-SI in EC cell lines, relate this expression to the degree and the histopathological type of tumoral cell lines, evaluate the differential expression between tumoral and non-tumoral endometrial cell lines and analyze their expression profiles in response to the treatment of EC cells with tomato extract derivatives, which have known cytotoxic action in this cells. Total RNA was extracted from endometrial cell lines E6/E7/TERT and EM42 (non-tumoral) and Ishikawa, RL95-2, AN3CA and KLE (tumoral), followed by cDNA synthesis. Transcriptional expression, protein and cellular viability were investigated by quantitative real time PCR, immunoblot and cellular viability assay with 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium (MTT). We have shown that all OPN-SI are expressed in all cell lines, except in EM42, with OPNa being the most expressed isoform. The three OPN-SI are expressed at higher levels in cell lines representative of more differentiated histopathological degrees. Regarding the PTEN, the cell lines expressed all the PTEN-SI tested, with the VS-FL being the highest level of expression, followed by VS-DelE6 and VS-3b. At the protein level, total OPN (the sum of all OPN-SI) is expressed in all cell lines and complete PTEN, only in non-tumor cell lines. pAKT displayed an opposite expression pattern. Treatment of KLE cell line with distinct tomato preparations containing lycopene decreased cellular viability. The expression level of PTEN-FL, VS-DelE6 and VS-3b were higher in the tumor cell line treated with the cytotoxic agent in relation to the control. At the protein level, AKT was similarly expressed in the tumor cell line treated with the extract containing lycopene as well as in the untreated tumor cell line. However, pAKT exhibited lower expression in the treated tumor cell line. Differential expression patterns were observed considering the expression of some of these isoforms between tumor cells with different degrees and tumor subtypes. Treatment with tomato preparations containing lycopene, promoted decreased cellular viability, increased expression of specific isoforms of PTEN and decreased expression of pAKT. Taken together, our data indicate that both the splicing isoforms of OPN and PTEN studied are expressed in tumor and non-tumoral cell lines of the endometrium. OPN-SI and VS-5c show differential expression in cell lines representative of Type II endometrial tumors and in non-tumoral cell line, respectively, indicating the opposite role between them. Treatment with extracts containing lycopene decreases cell viability, increases PTEN-SI expression and inhibits AKT phosphorylation, suggesting that these variants, especially DelE6, may act on the survival of EC cells. These findings contribute to the knowledge of endometrial tumors biology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 - Família SIBLINGs de proteínas.	22
Figura 1.2 - Estrutura esquemática da proteína OPN.	23
Figura 1.3 - Clivagem da OPNh pela trombina.	24
Figura 1.4 - As proteínas da família SIBLINGs medeiam a interação matriz-célula e a sinalização celular.	26
Figura 1.5 - Diferentes isoformas da osteopontina resultantes de <i>splicing</i> alternativo.	31
Figura 1.6 - Localização do gene <i>PTEN</i>	32
Figura 1.7 - Subfamília de fosfatases da PTEN.	33
Figura 1.8 - A estrutura da PTEN.	33
Figura 1.9 - Interações protéicas da PTEN.	35
Figura 1.10 - Isoformas do PTEN.	43
Figura 1.11 - Estrutura do licopeno e seus diversos isômeros.	45
Figura 4.1 - Desenho experimental do estudo.	49
Figura 6.1 - Nível de expressão relativa das isoformas de <i>splicing</i> da osteopontina em linhagens celulares de endométrio.	58
Figura 6.2 - Nível de expressão relativa das variantes de <i>splicing</i> da OPN na linhagem celular representativa dos tumores do Tipo II, em comparação com as linhagens celulares de CE do Tipo I com diferentes graus histopatológicos.	60
Figura 6.3 - Nível de expressão relativa das isoformas da OPN nas linhagens celulares tumorais Ishikawa, RL95-2, AN3CA.	61
Figura 6.4 - Nível de expressão relativa das variantes de <i>splicing</i> do PTEN nas linhagens celulares de endométrio.	63
Figura 6.5 - Análise do perfil eletroforético de produtos de amplificação das isoformas do PTEN na linhagem celular EM42 em gel de agarose 2%.	64
Figura 6.6 - Nível de expressão das isoformas de <i>splicing</i> do PTEN nas linhagens celulares de endométrio.	67
Figura 6.7 - Nível de expressão das VS-PTEN-FL e -Del E6 nas linhagens celulares tumorais de endométrio.	68
Figura 6.8 - Nível de expressão das VS-PTEN-FL e -Del E6 nas linhagens celulares tumorais Ishikawa, RL95-2, AN3CA.	70
Figura 6.9 - Análise da expressão protéica da OPN total por imunoblot em linhagens de endométrio.	71
Figura 6.10 - Análise da expressão protéica do AKT total, pAKT e PTEN-FL por imunoblot em linhagens de endométrio.	72

Figura 6.11 - Ensaio colorimétrico com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolio (MTT)	73
Figura 6.12 - Nível de expressão das isoformas do PTEN (VS-PTEN-FL, VS-Del E6 e VS-3b) na linhagem celular tumoral KLE tratada com extrato de molho de tomate	74
Figura 6.13 - Análise da expressão protéica do AKT total, pAKT e PTEN-FL por imunoblot em linhagem tumoral de endométrio tratada com extrato de molho de tomate	75
Figura 7.1 - Expressão da OPN e do PTEN e suas variantes de <i>splicing</i> , nos quatro grupos de CE descritos pelo atlas do genoma humano	83
Figura 7.2 - Modelo proposto para ação da OPN, PTEN e suas variantes de <i>splicing</i> na ativação da via de PI3K	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Características das linhagens celulares tumorais e não tumorais do endométrio.	51
Tabela 5.2 - Anticorpos utilizados no Imunoblot	55
Tabela 5.3 - Conteúdo de carotenóides totais, cis-licopeno e all-trans-licopeno em produtos a base de tomate	56
Tabela 6.1 - Valores de Fold das PTEN-SI com menor nível de expressão, nas linhagens não tumorais de endométrio.	64
Tabela 6.2 - Valores de Fold das PTEN-SI com menor nível de expressão, nas linhagens tumorais de endométrio	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 - Fatores de risco epidemiológicos no desenvolvimento do CE.	14
Quadro 1.2 - Sistema de gradação histopatológica do CE.	15
Quadro 1.3 - Categoria N (linfonodos regionais) e M (metástase)do TNM.	16
Quadro 1.4 - Estadiamento do CE, segundo a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO 2009) e sua relação com as Categorias do TNM (UICC).	17
Quadro 1.5 - Estadiamento FIGO (2009) e categorias do TNM (UICC) no CE.....	18
Quadro 1.6 - Características do carcinoma do endométrio do Tipo I e do Tipo II.	19
Quadro 1.7 - Expressão da OPN total nos tumores de endométrio.....	30
Quadro1.8 - Expressão do PTEN total no carcinoma de endométrio	42
Quadro 5.1 - Seqüência dos oligonucleotídeos senso e antisenso para cada isoforma da osteopontina e do PTEN	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: adenocarcinoma da ampola de Vater
AH: ácido hialurônico
AIS: adenocarcinoma *in situ* no endométrio
AKT: *protein kinase B*
ASCO: *American Society for Clinical Oncology*
ASTRO: *American Society for Radiation Oncology*
BSP: gene da sialoproteína óssea
CA125: Antígeno do Câncer 125
CaP: câncer de próstata
CCC: carcinoma de células claras
CCR: adenocarcinoma de cólon
CCU: câncer do corpo uterino
CD: cisplatina associada a doxorubicina
Cdk2: cinase dependente de ciclina 2
CE: carcinoma de endométrio
CEA: antígeno carcinoembrionário
CE-NE: carcinoma de endométrio não endometrióide
CEE: carcinoma de endométrio do tipo endometrióide
CEM: carcinoma de endométrio misto
CENP-C: proteína C que se liga especificamente no centrômero
CEO: carcinoma epitelial do ovário
CES: carcinoma de endométrio do tipo seroso
CFH: fator de complemento H
CIE: carcinoma intraepitelial de endométrio
CIE-SE: carcinoma intra-epitelial seroso de endométrio
CK2: caseína cinase 2
CP: carboplatina e paclitaxel
CPT_c: carcinoma papilar clássico da tireóide
CPT_{vf}: variante folicular do carcinoma papilar da tireóide
CSC: células tronco cancerígenas
CT: tomografia computadorizada
DIC: doença inflamatória crônica
DIU: dispositivo intra-uterino
DMP1: dentina proteína 1 da matriz
DSPP: *dentin sialophosphoprotein*
E: estadiamento
EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal
ERMs: elementos responsivos do miRNA
Eta-1: *early T-lymphocyte activation-1*
FAK: cinase de adesão focal
FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
G: grau histopatológico
GDI: inibidor de dissociação do GDP
GEF: fator de troca GDP/GTP
GPCR: receptor acoplado a proteína G
GSK3: casein kinase 3
HCA: hiperplasia complexa com atipia
HE: hiperplasia endometrial
HE4: epidídimo humano 4

HER-2: receptor do fator 2 de crescimento epidermal
HIF-1: fator 1 de indução de hipóxia
IELV: invasão do espaço linfovascular
IMC: índice de massa corpórea
IMS: instabilidade de microsatélite
IHQ: imunohistoquímica
IKK β : inibidor da cinase β do NF κ B
MAC: complexo de ataque à membrana celular
MAPK: cinase ativadora de mitógeno
MEC: matriz extracelular
miRNAs: microRNAs
MMAC1: *mutated in multiple advanced cancers 1*
MMPs: metaloproteinases da matriz
mTOR: *mammalian target of rapamycin*
mTORC2: *mammalian target of rapamycin* (mTOR) complexo 2
MVP: *major vault protein*
NER: nível de expressão relativa
NIE: neoplasia intraepitelial endometrial
NIPAG: neoplasia intraepitelial prostática de alto grau
NMIP: neoplasia mucinosa intrapapilar do pâncreas
OMS: organização mundial de saúde
OPN: osteopontina
OPNh: gene da osteopontina humana
OPN-SI: isoformas de *splicing* da OPN
PBS: phosphate-buffered saline
PDIs: proteínas com desordem intrínseca
PDK1: *phosphatidylinositol dependent kinase-1*
PHTS: Síndrome Tumor Hamartoma PTEN
PI3Ks: *Phosphatidylinositol 3-kinases*
PIP2: *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*
PIP3: *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*
PPAR γ : receptor ativador proliferador de peroxisomo
PTEN: *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome TEN*
PTEN-FL: *PTEN-full length*
PTEN-SI: isoformas de *splicing* do PTEN
QNA: quimioterapia neoadjuvante
QT: quimioterapia
RAB7: *small GTPase in endo-lysosomal trafficking*
Rb: proteína Retinoblastoma
RGD: seqüência de tri-peptídeo arginina-glicina-aspartato
rhOPN: OPN recombinante humana
RILP: proteína lisossomal que interage com o Rab7
RT: radioterapia
RTK: receptor de tirosina-cinase
SC: Síndrome de Cowden
SFKs: cinases da família Src
SG: sobrevivida global
SGO: *Society of Gynecologic Oncology*
SLD: sobrevivida livre de doença
SLN: seqüência de localização nuclear
SPP1: fosfoproteína secretada I
SRRB: Síndrome Bannayan-Ritley-Ruvalcaba

TEM: transição epitélio-mesenquima
TEP1: *TGF- β -induced epithelial-derived protein 1*
TIMPs: inibidores teciduais de metaloproteinases
TPIP: TPTE e PTEN fosfatase lipídica homóloga ao inositol
TPTE: fosfatase transmembrana homolóloga a tensina
TMA: microarranjo de tecido
TMX: tamoxifeno
UICC: *International Union Against Cancer*
uPA: ativador de plasminogêneo tipo urokinase
VS: variantes de *splicing*
WT: *Wild type*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. CARCINOMA DE ENDOMÉTRIO	13
1.1.1 Epidemiologia.....	13
1.1.2 Classificação dos Carcinomas de Endométrio	14
1.1.3 Prevenção, rastreamento, diagnóstico e tratamento.....	20
1.2 OSTEOPONTINA	21
1.2.1 O Gene	21
1.2.2 A proteína OPN	22
1.2.3 Papéis funcionais da OPN	25
1.2.4 Expressão da OPN em diversos tumores	27
1.2.5 O transcrito da OPN e suas variantes de <i>splicing</i>	30
1.3. PTEN	32
1.3.1 O gene.....	32
1.3.2 A proteína PTEN	32
1.3.3 Papel funcional da PTEN	35
1.3.4 Expressão do PTEN nos diversos tumores	38
1.3.5 O transcrito do PTEN e suas variantes de <i>splicing</i>	42
1.3.6 OPN e sua relação com o PTEN.....	43
1.4 O ANTIOXIDANTE LICOPENO	44
2. JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo principal	48
3.2 Objetivos específicos	48
4. DESENHO EXPERIMENTAL	49
5. MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1 Cultura de células.....	50
5.2 Extração de RNA total	51
5.3 Síntese de DNA complementar.....	51
5.4 PCR em tempo real	52
5.5 Eletroforese em gel de agarose	53
5.6 Cálculo do Nível de Expressão das isoformas da OPN e do PTEN	54
5.7 Imunoblot.....	54
5.8 Preparo dos extratos de tomate contendo licopeno.....	55
5.9 Ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico de MTT	57
5.10 Análises estatísticas	57
6. RESULTADOS	58
6.1 Análise da expressão das variantes de <i>splicing</i> da osteopontina em linhagens de endométrio.....	58

6.2 Análise da expressão das variantes de <i>splicing</i> do PTEN em linhagens celulares tumorais e não tumorais do endométrio	62
6.3 Expressão protéica das isoformas completas da OPN e do PTEN e da via PI3K	71
6.4 Resposta celular ao tratamento com extratos de tomate contendo licopeno.....	72
6.5 Expressão de isoformas do PTEN em resposta ao tratamento com extrato de molho de tomate contendo licopeno	73
6.6 Expressão protéica da via PI3K em resposta ao tratamento com extrato de tomate contendo licopeno.....	74
7. DISCUSSÃO	76
8. CONCLUSÕES.....	89
9. PERSPECTIVAS.....	90
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. CARCINOMA DE ENDOMÉTRIO

O carcinoma de endométrio (CE) origina-se no epitélio glandular que recobre a cavidade uterina. A idade avançada é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do CE, o que explica em parte, o aumento da sua incidência em todo o mundo (MÜNSTEDT et al., 2004). A obesidade, um outro fator de risco, é atualmente considerada uma epidemia nos países desenvolvidos, assim como em alguns países em desenvolvimento. A organização mundial de saúde (OMS) tem proposto políticas públicas para promoção da saúde baseadas na implementação de exercícios físicos no ambiente escolar e em hábitos alimentares saudáveis (CALLE; KAAKS, 2004).

1.1.1 Epidemiologia

Nas estimativas mundiais de câncer, este tumor é descrito juntamente com os sarcomas uterinos, no grupo denominado de câncer do corpo uterino (CCU). Nos países desenvolvidos, ocorrem 70% dos casos dos CCU. As maiores taxas de incidência encontram-se na América do Norte e no norte da Europa ocidental e as menores, na África e no sul da Ásia central (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O CCU corresponde ao tumor ginecológico maligno mais frequente nos Estados Unidos, estimando-se para o ano de 2020, 65.620 novos casos e 12.590 mortes por essa neoplasia (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

No Brasil, esperam-se, para cada ano do triênio 2020-2022, 6.540 casos novos de CCU, com um risco estimado de 6,07 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CCU ocupa a oitava posição em incidência dentre todos os tumores malignos que acometem as mulheres. O CCU é mais frequente que os tumores do sistema nervoso central e os linfomas não Hodgkin. Entretanto, é mais raro que os cânceres de mama, cólon e reto, colo do útero, aparelho pulmonar, tireóide, estômago e ovário. Sua incidência é variável nas diversas regiões do país, sendo o sexto mais incidente na região sudeste, o sétimo na região centro-oeste, o oitavo na região nordeste, o décimo na região norte e o 11º mais frequente na região sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em relação à mortalidade, foram estimados 76 mil óbitos, sendo que a maior taxa de mortalidade está na Malásia e a menor, no Norte da África (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Ademais, mulheres negras tem risco 40% menor em desenvolver a doença, mas 54%

maior de morrer pela mesma (BEREK S. J, 2009).

A obesidade, o sedentarismo e o diabetes *mellitus* constituem fatores de risco relevantes para o CE (RENAUD et al., 2013) (Quadro 1.1). Esses fatores propiciam a resistência à insulina e a hiperinsulinemia crônica, os quais estão envolvidos na tumorigênese (KHANDEKAR; COHEN; SPIEGELMAN, 2011). Outros fatores de risco incluem menarca precoce, menopausa tardia, tumores produtores de estrogênio, história de câncer de mama, uso de tamoxifeno, nuliparidade, infertilidade e hipertensão (SCHOUTEN; GOLDBOHM; BRANDT, 2004; BEREK S. J, 2009). A relação entre a terapia de reposição hormonal e o risco de CE foi minuciosamente descrita em uma meta-análise, onde 527 artigos foram avaliados e 28 incluídos. Sjogren et al. (2016) demonstraram aumento do risco de desenvolvimento de CE, em todos os estudos com tibolona, no uso isolado do estrogênio e na terapia sequencial combinada, mesmo no tratamento com duração menor que cinco anos. Inversamente, a terapia combinada contínua não aumentou o risco de CE, mesmo no uso prolongado por mais de dez anos.

Quadro 1.1 - Fatores de risco epidemiológicos no desenvolvimento do CE.

Fator de risco	Risco relativo (%)
Reposição de estrogênio isolado	2 a 10
Menopausa tardia > 55 anos	2,4
Nuliparidade	2
Anovulação crônica	3
Hipertensão	1,5
Obesidade	10
Diabetes	2,8
Síndrome HNPCC	22 a 50
Uso de tamoxifeno	6 a 8

REANUD et al., 2013

HNPCC: câncer colorretal não polipóide hereditário

1.1.2 Classificação dos Carcinomas de Endométrio

A OMS reconhece três variantes especiais do carcinoma endometrióide do endométrio (CEE), o adenocarcinoma, o adenoacantoma (adenocarcinoma com metaplasia escamosa) e o carcinoma adenoescamoso (adenocarcinoma misto e carcinoma de células escamosas). Outros

tipos histológicos como o adenocarcinoma mucinoso, o seroso-papilífero, o de células claras, o indiferenciado e o misto, também são descritos (CREASMAN et al., 2006).

O sistema de gradação foi proposto pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), em 1988 e modificado por Zaino et al. (1995). O grau histopatológico (G) do CE varia de 1 a 3 onde o G1 é considerado bem diferenciado, o G2 moderadamente diferenciado e o G3 pouco diferenciado ou indiferenciado. O CE do tipo células claras e os serosos são por convenção considerados pouco diferenciados (G3). Por outro lado, o CE do tipo endometrióide e os mucinosos devem ser graduados quanto ao seu aspecto arquitetural e nuclear. O grau de diferenciação arquitetural segue a percentagem de áreas sólidas no tumor. Os tumores com grau arquitetural 1, tem uma porcentagem de áreas sólidas $\leq 5\%$, enquanto os tumores com grau arquitetural 2 e 3 tem padrão de crescimento sólido entre 6-50% e $>50\%$, respectivamente. A graduação nuclear varia de 1 a 3, sendo que o grau nuclear 1 tem aspecto semelhante ao núcleo do endométrio normal com discreta hipercromasia ou vascularização. O grau nuclear 2 apresenta aumento do volume nuclear, cromatina aberta e nucléolo evidente e o grau nuclear 3 é caracterizado por marcado pleomorfismo nuclear e cromatina grosseira. Além disso, atipia nuclear inapropriada para o grau arquitetural, aumenta em 1 grau o grau tumoral (CREASMAN et al., 2006) (Quadro 1.2).

Quadro 1.2 - Sistema de gradação histopatológica do CE.

Áreas sólidas (%)	Grau arquitetural	Graduação nuclear
$\leq 5\%$	1	1- discreta hipercromasia ou vascularização
6-50%	2	2- ↑ volume nuclear, cromatina aberta, nucléolo evidente
$> 50\%$	3	3- marcado pleomorfismo nuclear e cromatina grosseira

FIGO, 1988; ZAINO et al., 1995; CREASMAN et al., 2006.

A *International Union Against Cancer* (UICC) categorizou o CE conforme o TNM, onde T refere-se ao tumor primário, N aos linfonodos regionais e M as metástases (SOBIN L. H.; GOSPODAROWICZ M. K.; WITTEKIND C., 2009) (Quadro 1.3 e 1.4). O estadiamento (E) do carcinoma de endométrio é cirúrgico. Segundo a FIGO, esses tumores são classificados em estádios de I a IV, conforme a progressão do tumor (PECORELLI, 2009) (Quadro 1.4 e 1.5). Aproximadamente 80% dos pacientes com CE apresentam-se no estadiamento inicial, FIGO I, com prognóstico favorável (NOUT et al., 2010). Entretanto, os carcinomas endometriais nos estádios avançados (FIGO III e IV), apresentam prognóstico reservado.

Quadro 1.3 - Categoria N (linfonodos regionais) e M (metástase)do TNM.

Categoria	Características
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser acessados
N0	Ausência de metástases nos linfonodos regionais
N1	Presença de metástase nos linfonodos regionais ¹
M0	Ausência de metástase a distância
M1	Presença de metástase a distância ²

SOBIN L. H.; GOSPODAROWICZ M. K.; WITTEKIND C., 2009

¹Os linfonodos regionais são representados pelos linfonodos pélvicos hipogástricos (obturador e ilíaco interno), os ao longo da artéria ilíaca comum e externa, os parametriaes e sacrais, além dos linfonodos para-aórticos.

²Excluindo metástase para a vagina, serosa pélvica ou anexo. Incluindo metástases para os linfonodos inguinais e intra-abdominaes que não os pélvicos e para-aórticos.

Quadro 1.4 - Estadiamento do CE, segundo a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO 2009) e sua relação com as Categorias do TNM (UICC).

Estadiamento da FIGO		Categorias do TNM
Estadio I	Tumor primário não pode ser acessado	TX
	Não há evidência do tumor primário	T0
	Carcinoma <i>in situ</i> (pré invasivo)	T_{is}
	Tumor confinado ao corpo do útero	T1
	Sem invasão miometrial ou com invasão < 50% do miométrio	T1a
Estadio IB	Invasão ≥ a 50 % do miométrio	T1b
Estadio II	Tumor invade o estroma cervical, mas não se estende além do útero	T2
Estadio III	Disseminação local e/ou regional do tumor	T3e/ou N1
Estadio IIIA	Tumor invade a serosa do útero e/ou o anexo	T3a
Estadio IIIB	Envolvimento vaginal e/ou parametrial	T3b
Estadio IIIC	Metástases para linfonodos pélvicos e/ou para-aórtico	
Estadio IIIC1	Linfonodos (LNFs) pélvicos positivos	N1
Estadio IIIC2	LNFs para-aórticos positivos com ou sem LNFs pélvicos positivos	N2
Estadio IV	Tumor invade a mucosa da bexiga e/ou do intestino e/ou metástase a distância	
Estadio IVA	Tumor invade a mucosa da bexiga e/ou do intestino	T4
Estadio IVB	Metástase a distância: metástases intra-abdominal e/ou linfonodos inguinais	M1

PECORELLI, 2009; SOBIN L. H.; GOSPODAROWICZ M. K.; WITTEKIND C., 2009

O envolvimento glandular endocervical deve ser considerado estadiamento I.
Citologia positiva deve ser descrita separadamente, sem alterar o estadiamento.

Quadro 1.5 – Estadiamento FIGO (2009) e categorias do TNM (UICC) no CE.

Estadiamento FIGO	Tumor (T)	Linfonodo (N)	Metástase (M)
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3a	N0	M0
IIIB	T3b	N0	M0
IIIC	T1, T2, T3	N1, N2	M0
IIIC1	T1, T2, T3	N1	M0
IIIC2	T1, T2, T3	N2	M0
IVA	T4	qualquer N	M0
IVB	qualquer T	qualquer N	M1

SOBIN L. H.; GOSPODAROWICZ M. K.; WITTEKIND C., 2009

Um modelo dualístico da carcinogênese endometrial foi proposto classificando o CE em tumores do Tipo I e II (BOKHMAN, 1983).

Os tumores do Tipo I são aqueles com histologia endometrióide, representam 70 a 80% de todos os casos, estão relacionados a instabilidade de microsátélites e mutações no *PTEN*, *PIK3CA*, *K-RAS* e *CTNNB1* (beta-catenina). Esses tumores são geralmente diagnosticados na pré e peri-menopausa e nos estadiamentos iniciais, quando apresentam bom prognóstico. Os tumores do Tipo II correspondem aos carcinomas não-endometrióides (serosos e os de células claras), representam 20% dos casos diagnosticados, exibem mutações no *TP53*, superexpressão do receptor do fator 2 de crescimento epidermal (HER-2) e instabilidades cromossômicas. A idade média do diagnóstico é aos 67 anos e 50% disseminaram além do útero, sendo responsáveis por uma alta taxa de mortalidade (PRAT et al., 2007; DOLL et al., 2008) (Quadro 1.6).

Quadro 1.6- Características do carcinoma do endométrio do Tipo I e do Tipo II.

Características	Tipo I	Tipo II
Exposição ao estrogéneo isolado	Sim	Não
Tipo histopatológico	Endometrióide	Seroso, células claras
Endométrio de origem	Hiperplásico	Atrófico
Instabilidade de microsatélite	20 - 40%	0 - 5%
Mutação no <i>TP53</i>	10 - 20%	90%
Mutação <i>CTNNB1</i>	31 - 47%	0 - 3%
Mutação <i>KRAS</i>	15 - 30%	0 - 5%
Inativação do <i>PTEN</i>	35 - 50%	10%
<i>HER2/neu</i>	sem informação	18 - 80%

DOLL et al., 2008

Doll et al. (2008) descreveram que na sua evolução, os CE do Tipo I progridem a partir de um endométrio hiperplásico simples ou complexo sem atipias. Esses tumores evoluem para o epitélio hiperplásico com atipias denominado de neoplasia intraepitelial endometrial (NIE) e deste, para o adenocarcinoma. Os tumores do Tipo II originam a partir do endométrio atrófico para o carcinoma intraepitelial de endometrio (CIE) e então para o adenocarcinoma de alto grau. Posteriormente, a análise do genoma e transcriptoma humano, possibilitou a categorização do CE em quatro classes distintas. O grupo POLE (ultramutado) de prognóstico favorável, caracterizado por mutação no domínio exonuclease do POLE (subunidade da DNA polimerase), aberrações com pouco número de cópias, e altas taxas de mutação do *PTEN*, *PIK3R1*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *KRAS*. O grupo de instabilidade de microsatélite (IMS), hipermutado, de prognóstico intermediário, caracterizado por CEE com hipermetilação do promotor *MLH1*, altas taxas de mutação, aberrações em pouco número de cópias, deleção frameshift *RPL22* e mutações no *KRAS* e *PTEN*. O grupo dos tumores endometrióides com baixo número de cópias aberrantes que compreende tumores de G1 e G2, caracterizado por frequente mutação no *CTNNB1* e o grupo dos tumores com alto número de cópias aberrantes, G3, mutações *TP53*, *FBXW7* e *PPP2R1A*, de prognóstico ruim (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2013).

1.1.3 Prevenção, rastreamento, diagnóstico e tratamento

A redução dos fatores de risco e a inclusão de fatores protetores, no estilo de vida, minimizam o risco do desenvolvimento do CE. Assim, é recomendado a prática de exercícios físicos de forma regular e a manutenção do índice de massa corpórea (IMC), da pressão arterial e da glicemia dentro dos valores normais (COLOMBO et al., 2016).

Não há um teste suficientemente sensível e específico para o rastreamento populacional de mulheres assintomáticas. Assim, para o diagnóstico precoce, as mulheres com fatores de risco que estejam na menacme e aquelas na menopausa, devem ser investigadas caso reportem sintomas como metrorragia ou sangramento vaginal pós-menopausa (LINKOV et al., 2008). No diagnóstico do CE, a histeroscopia é o padrão ouro para a realização de biópsia do endométrio (DIJKHUIZEN et al., 2000).

O tratamento do CE consiste na hormonioterapia, cirurgia, braquiterapia (BT), radioterapia externa (RT) da pelve ou estendida, quimioterapia (QT). A hormonioterapia é reservada para pacientes que desejam gestar e para aquelas que não são candidatas a cirurgia (LINKOV et al., 2008). A cirurgia consiste na histerectomia total, na anexectomia bilateral e na remoção do linfonodo sentinela e/ou linfadenectomia (DOTTERS, 2000; HAGEN et al., 2016). O tratamento adjuvante é baseado no risco de recorrência (COLOMBO et al., 2016). Assim, a *American Society for Radiation Oncology* (ASTRO) e a *American Society for Clinical Oncology* (ASCO) recomendam que embora a observação seja uma opção razoável para pacientes com CEE E IA, G1 e G2, aquelas com E IB, G1 ou G2 ou IA G3 devem ser submetidas a BT. Além disso, para aquelas com CEE IB G3 ou E II, a RT é necessária (KLOPP et al., 2014; MEYER et al., 2015). O tratamento no E avançado (EIII e IV) envolve a cirurgia, a RT, a QT ou ambos. A QT é baseada em seis ciclos de carboplatina associada ao paclitaxel, a cada 3 semanas (BROOKS et al., 2019).

Considerando a agressividade dos carcinomas endometriais nos estádios avançados, a caracterização de genes que possam auxiliar na compreensão da carcinogênese do CE, é de grande interesse clínico. Neste contexto, diversas proteínas têm sido estudadas e apresentam expressão aberrante no CE. A UbcH10, enzima da família conjugadora do Ubiquitina, mostrou-se superexpressa em todos os CEE (KEFELI et al., 2012). O fator 1 de indução de hipóxia (HIF-1) e o TWIST (um regulador da transcrição do tipo hélice-alfa-hélice) mostraram-se superexpressos em tumores de CE de alto grau (FENG et al., 2013). Por outro lado, a E-caderina apresenta expressão reduzida em 63.7% dos CEE (TANAKA et al., 2013).

A osteopontina, uma proteína com papel na biologia tumoral do endométrio, está envolvida na progressão tumoral e sua superexpressão foi observada em diversos tipos tumorais, bem como no CEE, CE do tipo seroso e CE de células claras (BROWN et al., 1994; BRIESE et al., 2006; DU et al., 2009; GIMBA; TILLI, 2013; RAMACHANDRAN et al., 2013; LI et al., 2015).

1.2 OSTEOPONTINA

1.2.1 O Gene

O gene da osteopontina humana (OPNh) estende-se por 8 kb, estando mapeado no braço longo do cromossomo 4, próximo aos genes da sialoproteína óssea (*Bsp*), da dentina proteína 1 da matriz (*Dmp1*), da dentina sialofosfoproteína (*Dspp*) e da fosfoglicoproteína da matriz extracelular (*Mepe*) (Figura 1.1). Estes cinco genes constituem a família SIBLINGs (do inglês, *small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins*) (BELLAHCÈNE et al., 2008).

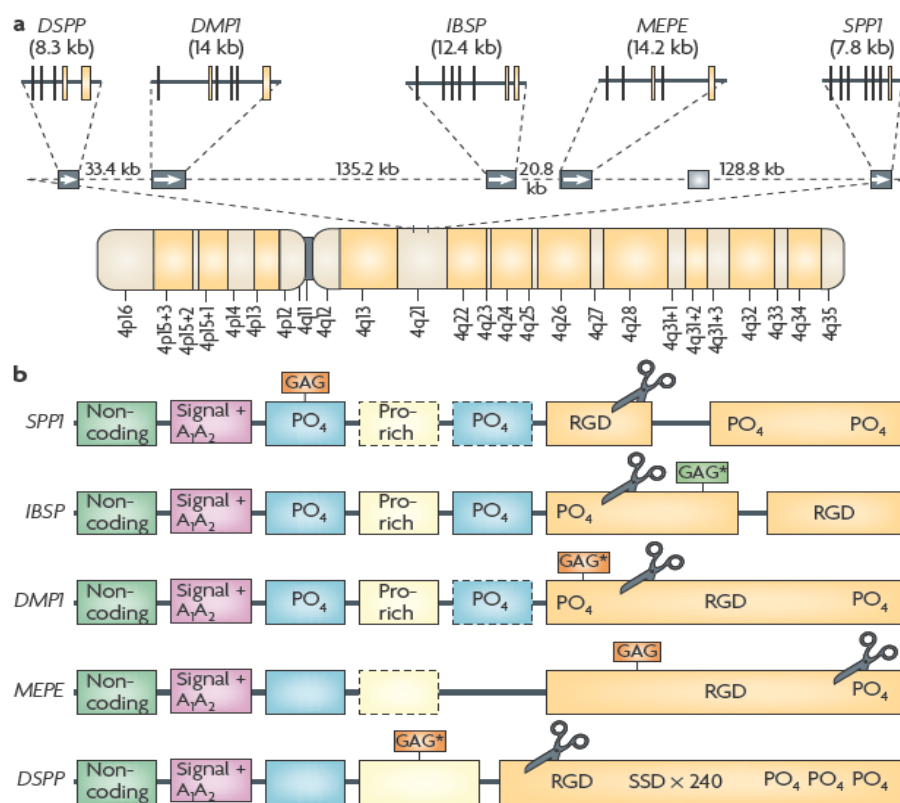


Figura 1.1 - Família SIBLINGs de proteínas. O éxon 1 não é codificante. O segundo éxon contém o códon de iniciação da tradução e os dois primeiros aminoácidos da proteína madura. Os éxons 3 e 5 contêm a seqüência para a fosforilação da serina (PO₄). O éxon 4 é rico em prolina, contém a seqüência de ligação para a transglutaminase e representa o único domínio com carga positiva. O éxon 5 também contém os resíduos de serina e treonina os quais são alvos da caseína cinase (CKII). O tripeptídeo RGD (Arg-Gly-Asp) é encontrado dentro do último ou dos dois éxons maiores. As cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) de cor laranja indicam cadeias de condroitin ou dermatan sulfato e a de cor verde indica a cadeia de Keratan sulfato. O sítio de clivagem de proteínas da família SIBLINGs está representado pela tesoura. *Spp1*, osteopontina; *Ibsp*, sialoproteína óssea; *Dmp*, dentina proteína 1 da matriz; *Dspp*, dentina sialofosfoproteína; *Mepe*, fosfoglicoproteína da matriz extracelular (Modificado de BELLAHCÈNE et al., 2008; BRIONES-ORTA et al., 2017).

1.2.2 A proteína OPN

A OPN é uma proteína matricelular não estrutural e apresenta um papel crítico no crescimento celular, adesão, migração e na formação de metástases (MURPHY-ULLRICH; SAGE, 2014). É também conhecida como sialoproteína óssea I, fosfoproteína secretada I (SPP1), 2ar, uropontin e early T-lymphocyte activation-1 (Eta-1). É uma proteína secretada, solúvel, rica em aspartato e resíduos de ácido siálico. A OPN é observada em variados tipos de tecidos, estando amplamente distribuída nos fluidos humanos como plasma, urina, semen, suor, leite e bile. A OPN é expressa por diversos tipos celulares, incluindo osteoclastos, osteoblastos, células epiteliais da mama, rim, pele, células nervosas, células do músculo liso

vascular, células endoteliais e células do ducto das glândulas salivares. As células imunes ativadas, como células T, células “NK”, macrófagos e células de Kupffer também expressam OPN (NAGATOMO et al., 2004; OGBUREKE; FISHER, 2007; LIU; XIE, 2012). Esta proteína está associada à múltiplas patologias, incluindo a injúria tecidual, a infecção, doenças auto-imunes e o câncer (SHEVDE; SAMANT, 2014).

Senger et al. (1979) descreveram a OPN como um marcador de transformação de células epiteliais, tendo sido isolada pela primeira vez a partir de uma matriz óssea calcificada por Franzen e Heinegard (1985). A OPN humana contém aproximadamente 314 aminoácidos, sendo que o peso molecular das suas isoformas varia entre 41 e 75 kDa. Esta proteína é altamente modificada em nível pós-tradução, existindo em múltiplas formas, com distintos graus de glicosilação e fosforilação (CHRISTENSEN et al., 2005).

A OPN contém diversos domínios funcionais, apresentando seqüências que são conservadas entre as espécies, quais sejam as regiões NH₂ e COOH terminais, o sítio de clivagem de trombina (RSK) e a seqüência GRGDS (glicina-arginina-glicina-aspartato-serina). Observa-se similaridade na seqüência de aminoácidos da OPN entre sete diferentes espécies (rato, camundongo, vaca, porco, humano, coelho e galinha) (Figura 1.2).

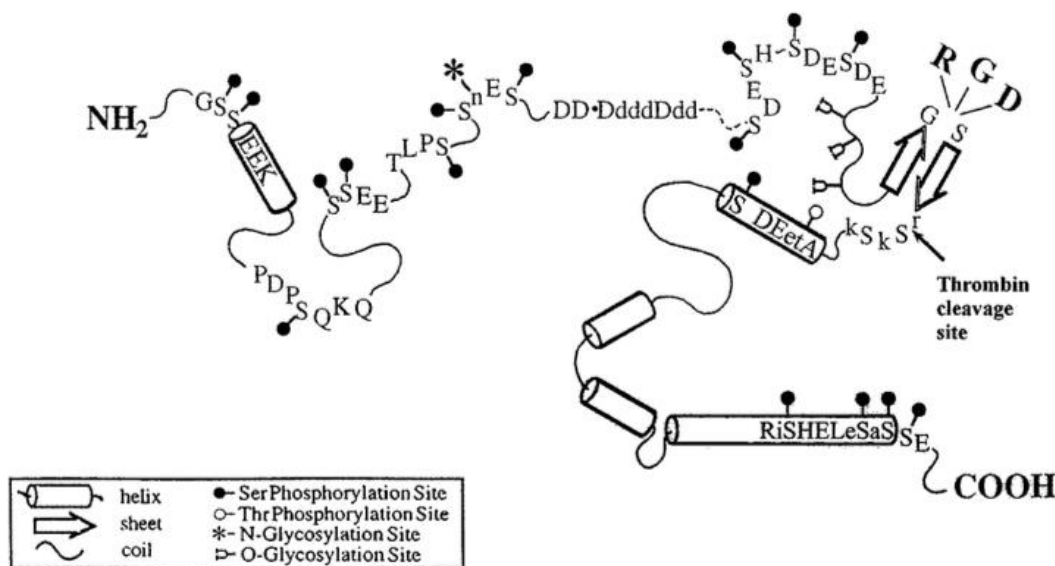


Figura 1.2. - Estrutura esquemática da proteína OPN. A OPN foi seqüenciada em sete espécies (rato, camundongo, vaca, porco, humano, coelho e galinha). As letras maiúsculas indicam os aminoácidos que são idênticos nas sete espécies enquanto as minúsculas indicam os aminoácidos conservados (citado por DENHARDT et al., 2001).

A trombina pode clivar a OPN e produzir dois fragmentos, expondo os domínios de ligação da integrina e do CD44 (RODRIGUES et al., 2007) (Figura 1.3). A GRGDS é uma seqüência localizada no fragmento amino-terminal da OPN humana, traduzida a partir do

éxon 6, e contém uma seqüência RGD modificada (arginina-glicina-aspartato) a qual, constitutivamente, se liga ao heterodímero receptor de integrina da superfície celular ($\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 8\beta 1$).

A clivagem pela trombina da OPNh também expõe a seqüência de adesão SVVYGLR (Serina-Valina-Valina-Tirosina-Glicina-Leucina-Arginina), a qual é um ligante para a integrina $\alpha 9\beta 1$ e para a $\alpha 4\beta 1$ (BAYLESS et al., 1998; YOKOSAKI et al., 1999; BARRY et al., 2000b).

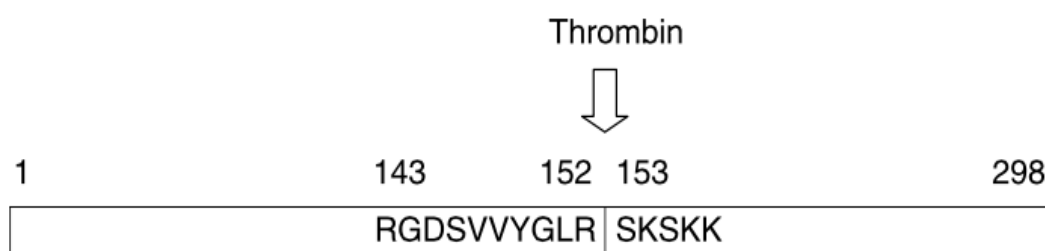


Figura 1.3 - Clivagem da OPNh pela trombina. A Clivagem pela trombina no Arg152-Ser153 gera um fragmento NH₂-terminal com a seqüência RGD e SVVYGLR e um fragmento C-terminal (RODRIGUES et al., 2007).

Weber et al. (1996) demonstraram que a OPN se liga ao CD44 de uma maneira independente de RGD, através do fragmento carboxi-terminal, promovendo tumorigênese, invasão e migração celular. Katagiri et al. (1999) encontraram que a OPN se liga nas variantes do CD44, v6-v7, mas não ao CD44 completo. Além disso, demonstraram que a interação da OPN ao CD44 requer a integrina $\beta 1$, consistente com a associação desses dois receptores. Samanna et al. (2006), utilizando como modelo linhagens de melanoma, reforçaram a existência de uma alça de feedback, em que a expressão do CD44 aumente devido a interação entre a OPN e a integrina. Especificamente no CE, a CD44v6 mostrou-se expressa em 20% dos 40 tumores analisados (STOKES et al., 2002).

A OPN é também é clivada pelas metaloproteinases (MMP-3 e MMP-7), pela plasmina e catepsina D. Esse processamento proteolítico influencia na funcionalidade da OPN já que fragmentos N terminal da OPN gerados através de clivagem pela plasmina e trombina apresentam afinidades semelhantes para a integrina $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$, mas diminuída em relação ao fragmento gerado pela clivagem pela catepsina D (AGNIHOTRI et al., 2001; CHRISTENSEN et al., 2010). Assim, a presença de vários fragmentos da OPN resultantes da clivagem pela trombina, MMP, plasmina e catepsina D, além da fosforilação, contribuem para a complexidade da interação OPN-receptor e a sinalização "downstream".

1.2.3 Papéis funcionais da OPN

A OPN apresenta uma variedade de funções celulares fisiológicas, além de estar envolvida com diversas fases do desenvolvimento do câncer e progressão tumoral. Tem papel na adesão celular, proliferação, invasão, degradação da matriz extracelular, na resposta imune (inflamação e evasão do complemento), angiogênese e metástase (BELLAHCÈNE et al., 2008).

No tecido ósseo, a OPN aumenta atividade do osteoclasto como consequência da interação entre a OPN e as integrinas da superfície celular do osteoclasto. A OPN está envolvida na remodelação óssea, demonstra múltiplas interações com o Ca^{++} , inibe e quebra o crescimento de cristais de oxalato de cálcio e tem papel no processo de formação de massa óssea (DENHARDT; NODA, 1998; CHOI et al., 2008).

Na doença aterosclerótica, a OPN inibe o depósito de cálcio ectópico e é um inibidor da calcificação vascular (HIGGINS et al., 2015). A OPN também apresenta função na sobrevivência celular e progressão tumoral através das vias de sinalização intra-celulares (Figura 1.4). A via de Akt cinase serina/treonina regula a progressão do ciclo celular e medeia a viabilidade e migração celulares. A OPN ativa o $\text{NF}\kappa\text{B}$, o qual promove a sobrevivência das células T ativadas, através da fosforilação do inibidor da cinase β do $\text{NF}\kappa\text{B}$ ($\text{IKK}\beta$) e da inibição da transcrição do fator Foxo3a. Na encefalopatia autoimune induzida em camundongos, a OPN inibe a remissão clínica e promove a progressão e exacerbação da doença (HUR et al., 2007). A OPN promove sobrevivência celular por regular negativamente a apoptose em resposta a condições de estresse, incluindo a exposição a agentes anticancerígenos. Assim, a OPN apresenta papel na modulação da resistência à quimioterapia e à radioterapia (GIMBA; BRUM; MORAES, 2019).

A proliferação das células cancerosas é induzida pela OPN através da transativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), o qual através da cinase SRC forma um complexo com a integrina. Esse complexo ativa a cinase ativadora de mitogeno (MAPK), a qual resulta na ativação de vias de sinalização associadas com a progressão tumoral (BELLAHCÈNE et al., 2008).

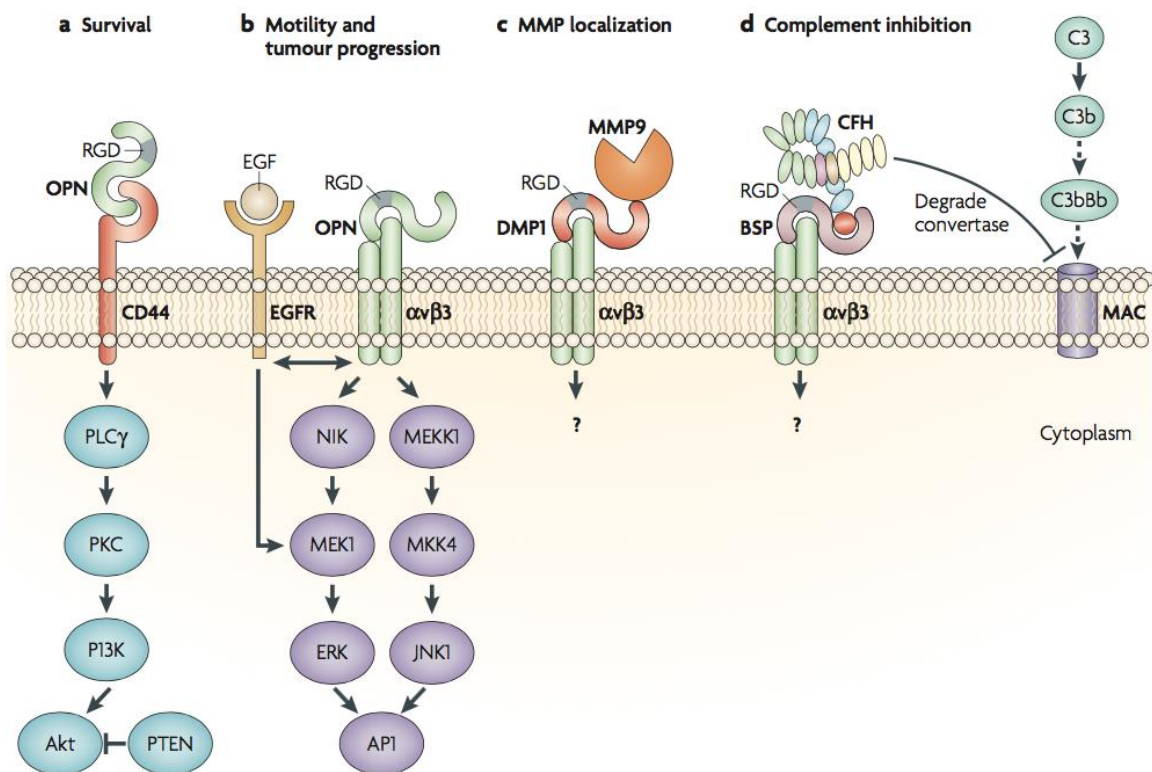


Figura 1.4 - As proteínas da família SIBLINGs medeiam a interação matriz-célula e a sinalização celular. Essas glicoproteínas podem promover interações dependentes e independentes de RGD. A OPN também pode interagir com receptores da família do CD44. Alguns desses complexos são capazes de mediar as seguintes funções: (a) sobrevivência celular através da fosfolipase C- γ (PLC γ), da proteína cinase C (PKC), da *phosphatidylinositol 3-Kinase* (P13K), ativação da via de Akt que leva a sinais de anti-apoptose nas células tumorais. A fosforilação de Akt induzida pela OPN pode ser bloqueada pelo supressor de tumor PTEN (*phosphatase and tensin homologue*); (b) motilidade através da ativação da via canônica de integrina $\alpha_v\beta_3$ onde tanto a cinase indutora de fator nuclear (NIK), como o MEK1 (proteína cinase cinase cinase 1) e JNK1 (MAPK8) promovem a migração celular através da ativação da expressão do gene dependente de AP1; (c) ligação com as metaloproteinases (MMP) da matriz, permitindo a digestão da matriz extracelular local, a remodelação tecidual e migração celular através da matriz extracelular; (d) ligação e ativação do fator de complemento H (CFH), através da promoção da degradação de C3 converte o complexo C3bBb. A ativação do CFH pelo SIBLING impede a formação do complexo de ataque da membrana (MAC) e a lise subsequente de células cancerosas logo, favorece o escape da defesa imunológica (Modificado de BELLAHCÈNE et al., 2008).

A OPN apresenta também papel em diferentes momentos da formação de metástases. No tumor primário, as células cancerosas secretam altos níveis de proteínas da família SIBLINGs, que favorecem a sua proliferação. Para que ocorra invasão, é necessária a alta motilidade das células cancerosas e o aumento da expressão das proteases que degradam a matriz extra-celular (MEC) (BELLAHCÈNE et al., 2008).

A degradação da MEC ocorre através de duas vias de controle de proteólise, o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA) e via MMP. A OPN induz a secreção de uPA por ativar a via de sinalização SRC-EGFR-ERK. A interação da uPA com o seu receptor facilita a

conversão do plasminogênio em plasmina, a qual regula a invasão celular através da degradação de proteínas como fibronectina, colágeno tipo IV e laminina promovendo a migração e progressão tumoral. A plasmina também regula a invasão celular indiretamente através das metaloproteinases da matriz (MMPs) (DAS; MAHABELESWAR; KUNDU, 2004). As MMPs são uma família de endopeptidases dependentes de zinco e capazes de degradar todos os componentes da matriz, são conhecidos 21 genes dessa família. A atividade proteolítica das MMPs é inibida especificamente pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), uma família que consiste em 4 membros (VIHINEN; KÄHÄRI, 2002). Li et al. (2015) encontraram que a expressão e secreção da MMP-2 aumenta na linhagem celular HEC-1A de CE, após o tratamento com a OPN recombinante humana (rhOPN).

A OPN age com um fator pró-angiogênico, sendo o receptor de integrina essencial para a angiogênese tumoral. A integrina $\alpha_v\beta_3$ medeia a migração de células endoteliais durante a formação dos vasos e é extensamente expressa nos vasos sanguíneos em amostras de tumor humano, mas não é expressa nos tecidos humanos normais (WEBER; ASHKAR, 2000).

As células tumorais atingem a corrente sanguínea, onde são transportadas. Essas células superexpressam OPN, a qual se liga nos receptores da membrana célula ($\alpha_v\beta_3$ e CD44) e seqüestram o fator de complemento H (CFH). Esse complexo inibe a formação do MAC (Complexo de ataque à membrana celular) e logo, inibe a lise celular mediada pelo sistema complemento. Desta forma, as células transformadas podem escapar a lise celular mediada pelo sistema complemento, favorecendo a sua sobrevivência (FEDARKO et al., 2000; JAIN et al., 2002).

1.2.4 Expressão da OPN em diversos tumores

Níveis plasmáticos alterados da OPN estão relacionados com vários tipos de carcinomas, e positivamente correlacionados com a progressão, invasão e a formação de metástases (NAKAE et al., 2006). A superexpressão da OPN foi observada em células tumorais da mama, endométrio, colo do útero, carcinoma de células claras renais, bexiga, próstata, cólon, gástrico, esôfago, pâncreas, pulmão, câncer de cabeça e pescoço e no câncer hepatocelular (CASSON et al., 1997; THALMANN et al., 1999; AGRAWAL et al., 2002; DONATI et al., 2005; BRIESE et al., 2006; HASHIGUCHI et al., 2006; HE; MIRZA; WEBER, 2006; VORDERMARK et al., 2006; HIGASHIYAMA et al., 2007; MIRZA et al.,

2008). Adicionalmente, o nível sérico da OPN está substancialmente elevado nos pacientes com carcinoma metastático (COPPOLA et al., 2004).

Dentre os tumores ginecológicos, a expressão da OPN foi descrita no tumor do colo uterino, do ovário e do endométrio. No carcinoma cervical, a imunoreatividade para OPN foi observada em 67% dos casos e foi ausente no tecido cervical saudável. A alta imunoreatividade mostrou-se relacionar com pior sobrevida global (SG) e menor sobrevida livre de doença (SLD) caracterizando-se como um biomarcador útil no diagnóstico e prognóstico do carcinoma cervical (CHO et al., 2008). Sakaguchi et al. (2007) demonstraram que o nível protéico da OPN é maior na doença metastática linfonodal do que no tumor cervical primário e que esses pacientes apresentam mau prognóstico. No carcinoma escamoso cervical avançado, a expressão aberrante da OPN medeia a transição epitélio-mesenquima (TEM) e promove radiorresistência (GIMBA; BRUM; MORAES, 2019).

Na neoplasia ovariana, Tiniakos, Yu e Liapis (1998) desenvolveram o primeiro estudo de expressão de OPN. A expressão da OPN mostrou-se fraca ou ausente em 93% dos pacientes com adenocarcinoma e em suas metástases e presente em 80% dos tumores *borderline* e em 50% dos seus implantes. No carcinoma epitelial do ovário (CEO), o nível de OPN no soro pode ser útil em predizer essa neoplasia, em detectar recorrência e parece ter relação com o estadiamento da doença. Níveis elevados de OPN na urina podem ser úteis para o rastreamento não invasivo. A maioria das células tumorais apresentou positividade > 50% e essa marcação foi citoplasmática (MAKI et al., 2000; BRAKORA et al., 2004; SCHORGE et al., 2004; O'NEILL et al., 2005; NAKAE et al., 2006; YE et al., 2006).

No tumor do endométrio, Brown et al. (1994) detectaram o transcrito da OPN nas células tumorais do adenocarcinoma, bem como nos macrófagos. Briese et al. (2006), encontraram que a OPN é expressa em 80% das amostras de endométrio normal e que sua localização é citoplasmática. Nesse estudo, nas hiperplasias endometriais e nos carcinomas a expressão foi de 64,7% e 67,4%, respectivamente.

Du et al. (2009), demonstraram formação de estruturas tubulares significativamente menor nas células endoteliais endometriais humanas transfectadas com siOPN. A inibição da OPN na linhagem celular Ishikawa e sua inoculação em camundongo nude, produz tumores cujos microtúbulos tem densidade menor que aqueles produzidos pelo controle, sugerindo papel importante da OPN na angiogênese do CE. Ramachandran et al. (2013) encontraram que a deficiência da OPN altera o ciclo celular promovendo um aumento da taxa celular em G0/G1, além do aumento da fragmentação do DNA. Há superexpressão dos genes supressores

de tumor como o *TP53*, *CDKN1A* e *CDKN1B* e diminuição da expressão de *CD44*, *RE α* e da *MMP-9*. Adicionalmente, inibidores da via de sinalização das integrinas, do Src e da via PI3K inibem a formação de colônias pela linhagem celular de CE.

Li et al. (2015) demonstraram no CE que, a rhOPN aumenta a proliferação, migração e invasão celular através da ativação da via de AKT e ERK1/2. Além disso, promove a TEM por diminuir a expressão protéica da E-caderina e aumentar a expressão da vimentina e da N-caderina (Quadro 1.7).

Quadro 1.7 - Expressão da OPN total nos tumores de endométrio.

Autor	Amostra e linhagens	Perfil de expressão	Potencial de aplicação
Brown et al., 1994	N=76 (T variados) CEE: 5G1, 3G2	HIS: RNAm expresso macrófagos e células tumorais	Diagnóstico Northern: expressão CE > TN
Coppola et al., 2004	N= 350 (T variados) TN= 113 CE= 14	IHC: marcação citoplasmática e significante em 10/14 (71%) CE NS: OPN e estadiamento	NA
Briese et al., 2006	28 CEE, 10 CS, 5 CCC	80% endométrio normal 64.7% hiperplasias 67.4% carcinomas	Diagnóstico 100% CCC: marcação muito baixa X 70% CS: forte padrão de expressão
Cho et al., 2009	N= 32 12 TN CE: 22 E I/II, 10 E III/IV	Correlação nível OPN sérica com E, GH, TH, IM, citologia. IHC: OPN correlaciona-se com EII e com a citologia positiva	Prognóstico SG e SLD: pior para pacientes com OPN positiva (>218 ng/ml)
Du et al., 2009	HEEC: céls endoteliais endometriais humanas Ishikawa	HEEEC/siRNA: ↓ migração, invasão (67.4%) ISK/siOPN: ↓ invasão 51.2%	Terapêutico tumores com microtúbulos de densidade menor x controle
Ramachandran et al., 2013	THES: célula estromal endometrial humana RL95, Hec1A, Ishikawa	OPN/siRNA: ↑ células G0/G1, fragmentação do DNA, expressão dos genes supressores de tumor p53, p21 e p27 e ↓ CD44, REa, MMP-9.	Terapêutico inibidores da via de sinalização das integrinas, do Src e da via PI3K inibem a formação de colônias CE.
Li et al., 2015	HEC-1A	rhOPN: ↑ proliferação, migração e invasão celular pela ativação da via AKT e ERK1/2. promove TEM: ↓ E-caderina e ↑ vimentina e N-caderina.	NA

CE: carcinoma de endométrio, CCC: carcinoma de células claras, CEE: CE do tipo endometrióide, CS: carcinoma seroso, E: estadiamento, IHC: imuno-histoquímica, IM: invasão muscular, N: tamanho amostral, NS: não significativo, T: tecidos variados, TH: tipo histopatológico, TN: tecido normal, HIS: hibridização *in situ*, SG: sobrevida global, SLD: sobrevida livre de doença

1.2.5 O transcrito da OPN e suas variantes de *splicing*

O transcrito primário da OPN humana (OPNh) sofre *splicing* alternativo. Neste evento molecular fisiológico, o transcrito primário (pré-RNA) é processado pela maquinaria de *splicing* e pode gerar RNAs maduros múltiplos e distintos, levando a expressão de isoformas de proteínas com estruturas e propriedades funcionais diferentes (GHIGNA; VALACCA; BIAMONTI, 2008). Muitos genes relacionados ao câncer são regulados pelo *splicing* alternativo. Eles originam proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, proliferação, diferenciação, via de sinalização, morte celular, angiogênese, invasão, motilidade e metástase.

Uma variante de *splicing* (VS) específica identificada somente no câncer, mas não nas células saudáveis poderia ser um candidato a biomarcador (PAJARES et al., 2007). O *splicing* aberrante do pré-RNA, gera variantes de *splicing* relacionadas à carcinogênese e resistência à terapia-alvo e imunoterapia. Ademais, as VS geradas a partir de um mesmo gene, podem apresentar papéis antagônicos entre si. Estratégias que tenham como alvo uma variante de *splicing* aberrante específica ou a maquinaria do spliceossomo que gera essa variante, apresentam papel no tratamento de tumores e na re-sensibilização às drogas (WANG; LEE, 2018).

O *splicing* alternativo do transcrito primário codificador da OPN, gera pelo menos cinco isoformas distintas (Figura 1.5). A isoforma OPNa contém 7 éxons e representa a forma canônica completa do mRNA. Na OPNb ocorre deleção do éxon 5, enquanto na OPNc há deleção do éxon 4. Os éxons 4 e 5 apresentam-se deletados na isoforms OPN4. Já na isoforma OPN5, um exon extra é retido entre os éxons 3 e 4 (VILORIA; HILL, 2016; BRIONES-ORTA et al., 2017).

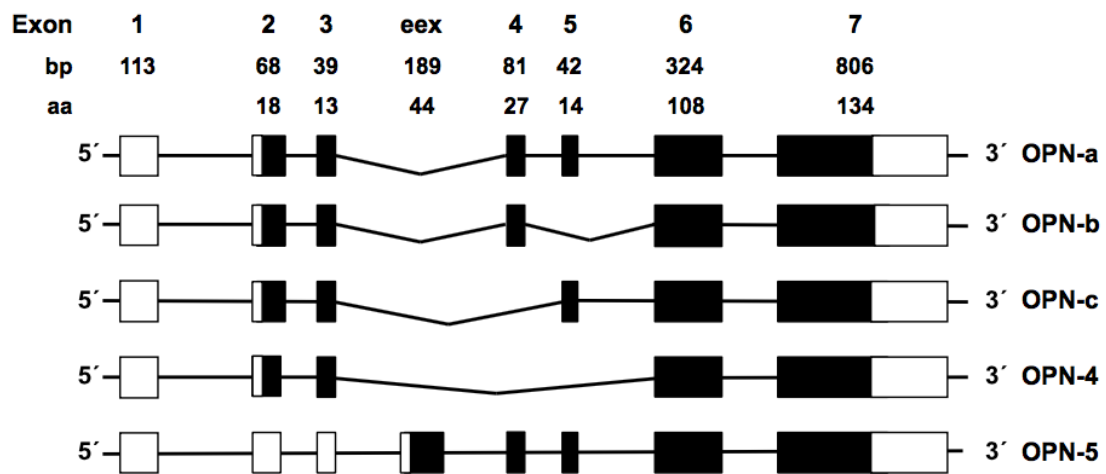


Figura 1.5- Diferentes isoformas da osteopontina resultantes de *splicing* alternativo. O éxon 1 não é codificante. A OPNa é a isoforma completa da OPNa, na OPNb e OPNc estão ausentes, respectivamente os éxon 5 e 4. A Os éxons 4 e 5 estão ausentes na OPN4, representando o menor transcrito. A OPN5 é o maior transcrito e contém um éxon extra (eex) retido entre os éxons 3 e 4. Esse eex, é gerado pela retenção de parte do íntron 3, o qual também tem um códon iniciador diferente (BRIONES-ORTA et al., 2017).

As OPN-SI (do inglês *osteopontin splicing isoforms*) foram descritas em uma série de tipos tumorais e a expressão das diversas isoformas é tecido e tumor específica (GIMBA; TILLI, 2013; GIMBA; BRUM; MORAES, 2019).

1.3. PTEN

1.3.1 O gene

O gene "*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome TEN*" (*PTEN*) também conhecido como "*mutated in multiple advanced cancers 1*" (*MMAC1*) e "*TGF- β -induced epithelial-derived protein 1*" (*TEP1*) foi identificado em 1977 (LI et al., 1997; MESTER; ENG, 2013). Está localizado no braço longo do cromossomo 10, na região 10q23.3 e codifica uma proteína multifuncional de 403 aminoácidos e peso molecular de 47kDa. O *PTEN* é considerado um gene supressor de tumor e pode apresentar mutações somáticas e germinativas (Figura 1.6) (STECK et al., 1997; MILELLA et al., 2015).

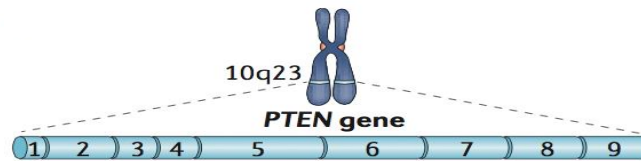


Figura 1.6 - Localização do gene *PTEN*. O gene *PTEN* está localizado no cromossomo humano 10q23, um locus altamente susceptível a mutação nos cânceres humano (SONG; SALMENA; PANDOLFI, 2012).

1.3.2 A proteína PTEN

A PTEN pertence a uma família de fosfatases na qual inclui a fosfatase transmembrana homóloga a tensina (TPTE ou PTEN) e a TPTE e PTEN fosfatase lipídica homóloga ao inositol (TPIP) (WORBY; DIXON, 2014) (Figura 1.7).

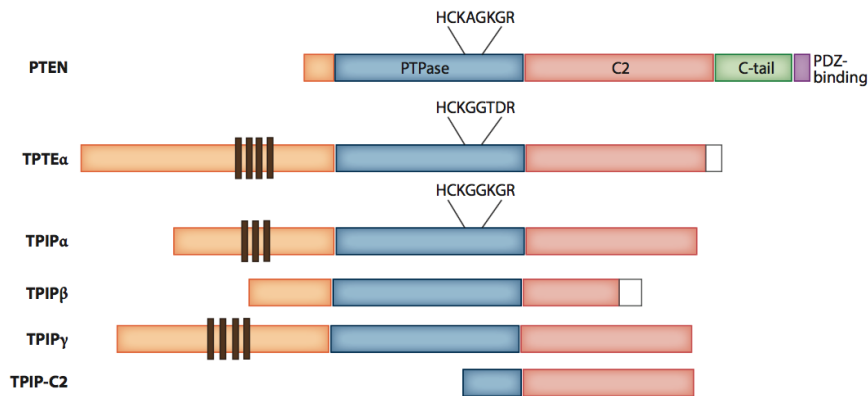


Figura 1.7 - Subfamília de fosfatases da PTEN. A subfamília da PTEN consiste na PTEN, uma fosfatase transmembrana homóloga a tensina (TPTE) e a TPTE e PTEN fosfatase lipídica homóloga ao inositol (TPIP). Todas as TPTE e TPIP (exceto o TPIP-C2) contém uma porção N-terminal (retângulos laranja) e a maioria delas contém um domínio transmembrana (barras marrons). A fosfatase e o domínio C2 estão demonstrados em retângulos azuis e rosa, respectivamente. O local ativo da TPTE, HCKGGTDE, contém diversas substituições que provavelmente leva a inatividade catalítica. O local ativo da proteína TPIP é capaz de desfosforilar o PIP3, similar a PTEN (WORBY; DIXON, 2014).

A estrutura da PTEN contém o domínio N-terminal, o centro catalítico, e o domínio C terminal. O domínio N-terminal contém o local de ligação ao *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (PIP2) da membrana celular, o local de ubiquitinação do resíduo da lisina 13 e o sinal de localização citoplasmática. O centro catalítico de ligação a membrana compreende os domínios de fosfatase e o domínio lipídico C2, esse contém o local de ubiquitinação do resíduo da lisina 289. No domínio C terminal identifica-se resíduos fosforilados pela caseína cinase 2 (CK2) e GSK3 além de um domínio de ligação modificado, a classe I do PDZ, a qual reconhece proteínas alvo (Figura 1.8) (LESLIE; FOTI, 2011).

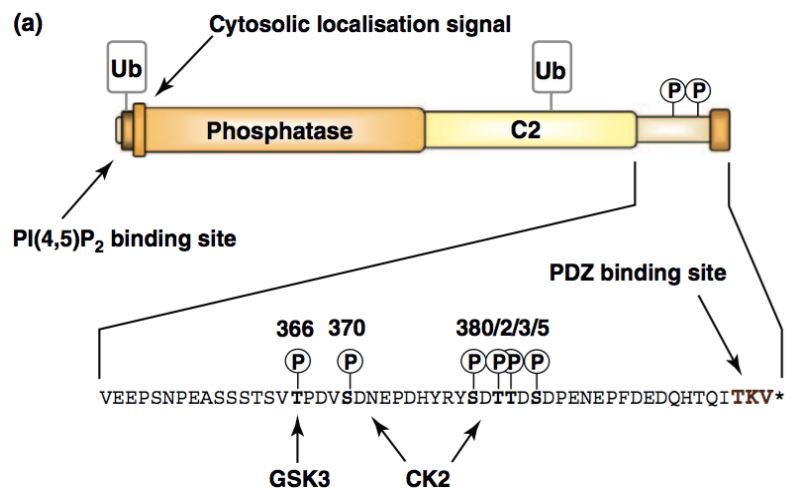


Figura 1.8 - A estrutura da PTEN. A proteína PTEN é mostrada, incluindo na expansão da cauda C-terminal regulatória a identificação dos resíduos fosforilados pela caseína cinase (CK2) e GSK3. Identificados os locais de ubiquitinação dos resíduos da lisina 13 e 289. O local de ligação ao PIP2 e de localização citoplasmática estão localizados no domínio N-terminal (LESLIE; FOTI, 2011).

É amplamente expresso no cérebro, coração, rim, baço, fígado, leucócitos, músculos, pulmão e testículo. No citoplasma, a PTEN está distribuída ao longo dos microtúbulos, sendo recrutado pelas vesículas através da interação do domínio C2 com o lipídio de assinatura endossomal. O domínio C2, o qual contém a alça CBR3, está presente nas vesículas duplamente positivas para o lipídio de assinatura endossomal e para o *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate* (PIP3), o substrato lipídico da PTEN (AGRAWAL; ENG, 2006; NAGUIB et al., 2015).

Chung, Ginn-Pease e Eng (2005), demonstraram que a importação nuclear da PTEN, independe da sua função de fosfatase, é mediado por *major vault protein* (MVP) e que a fosforilação não interfere na localização nuclear. Identificaram que a PTEN contém quatro sequências não tradicionais, porém, semelhantes à sequência de localização nuclear (SLN), a SLN1 (aminoácidos 10-14, RNKRR), a SLN2 (aminoácidos 160-164, RTRDKK), a SLN3 (aminoácidos 233-237, RREDK) e a SLN4 (aminoácidos 265-269, KKDK). A combinação das sequências SLN4 e SLN2 ou SLN3 é necessária para a localização nuclear da PTEN.

O PTEN é regulado em diversos níveis, incluindo o silenciamento epigenético, a regulação transcricional, a degradação e repressão da tradução pelos microRNAs, as modificações pós-traducionais e as interações proteína-proteína (CHALHOUB; BAKER, 2009; MILELLA et al., 2015). O silenciamento epigenético através da hipermetilação de ilhas CpG no promotor do *PTEN* foi observado em diversos cânceres esporádicos. Salvesen et al. (2001), demonstraram esse fenômeno em 19% das pacientes com CE. Além disso, a hipermetilação do promotor, relacionou-se significativamente com a doença metastática e com o fenótipo de instabilidade de microssatélite, mas não com a sobrevida.

Fatores transcricionais como Egr-1, Atf2, p53, CBP/p300, regulam positivamente a transcrição do *PTEN*, entretanto o NF- κ B, Snail1, Bm1-1 e C-Jun promovem regulação negativa desse gene e o receptor ativador proliferador de peroxisomo (PPAR γ) e do CBF-1, podem atuar das duas formas (LESLIE; FOTI, 2011). Stambolic et al. (2001), demonstraram que o p53 liga-se de forma específica ao promotor do *PTEN* e induz o aumento do seu transcrito e da proteína. Ademais, a indução de apoptose pelo p53 requer a ativação direta da transcrição do *PTEN*.

Em nível pós-traducional diversos mecanismos incluindo a fosforilação, acetilação, oxidação, ubiquitinação e sumoilação estão envolvidos na regulação do PTEN. Tamguney e Stokoe (2007), descreveram que as cinases CK2, GSK3 β , PICT e Rock tem a capacidade de fosforilar o PTEN no seu domínio C-terminal. Vazquez et al. (2001) demonstraram que a

fosforilação da cauda do PTEN regula sua atividade por promover mudança conformacional nessa proteína. Assim, impede sua interação com domínios PDZ de outras proteínas e seu recrutamento nos complexos multiprotéicos, os quais são necessários para a localização do PTEN próximo a membrana plasmática. Baseados nesse modelo de regulação conformacional do PTEN proposto por Vazquez et al. (2001), Leslie e Foti (2011) ratificaram que, na conformação aberta, as superfícies básicas do PTEN (N-terminal) interagem seletivamente com PIP2 na superfície interna ácida da membrana plasmática. Por outro lado, a fosforilação do domínio C-terminal promove uma interação eletrostática entre esse domínio altamente ácido e as superfícies básicas do domínio N-terminal, o que a torna inativa.

O PTEN, em domínios específicos, interage com diversas proteínas, as quais modulam sua atividade. Algumas dessas interações aumentam a sua função, entretanto, outras diminuem. A regulação do PTEN através da interação proteína-proteína envolve mecanismos como alteração da estabilidade protéica ou conformacional, regulação da atividade da fosfatase e localização errônea da proteína (Figura 1.9) (HOPKINS et al., 2014).

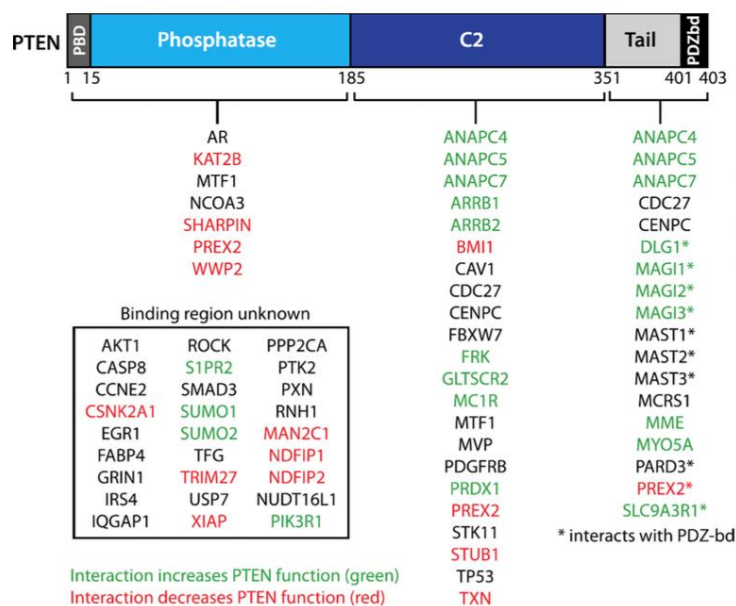


Figura 1.9 - Interações proteicas da PTEN. São demonstrados os sítios de ligação para a interação proteica da PTEN. As proteínas que interagem em sítios de ligação desconhecidos da PTEN, estão listadas no quadro. As interações que aumentam a função da PTEN estão em verde e aquelas que diminuem a sua função, estão em vermelho (HOPKINS et al., 2014).

1.3.3 Papel funcional da PTEN

As funções da PTEN baseiam-se principalmente na sua capacidade de remover fosfatos de substratos lipídicos e protéicos ou na sua função além do domínio catalítico (MYERS; CLEMENTS, 2001; DEY et al., 2008; BONONI; PINTON, 2015). Sua atuação

sobre substratos lipídicos é bem definida, tendo papel como regulador negativo da via da *phosphatidylinositol 3 kinase* (PI3K) (SHINDE; MADDIKA, 2016).

As *Phosphatidylinositol 3-kinases* (PI3Ks) são uma família de cinases lipídicas que integram sinais dos fatores de crescimento e estímulos ambientais, traduzindo-os em sinais intracelulares que regulam múltiplas vias de sinalização. Essas vias, controlam funções fisiológicas e processos celulares que incluem a proliferação, sobrevivência e motilidade celular. Ativação da via de PI3K é frequentemente encontrada em uma variedade de cânceres. Existem três classes de PI3Ks, a classe I é a mais conhecida e subdivide-se em IA e IB. A classe IA, contém as subunidades catalíticas p110 α , p110 β e p110 δ e as regulatórias p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ e p50 α . A classe IB, contém a subunidade catalítica p110 γ , e as regulatórias p101 e p87. Após a ativação do receptor de tirosina-cinase (RTK) ou do receptor acoplado a proteína G (GPCR), por fator de crescimento ou quimiocinas ou pela insulina, as PI3Ks são recrutadas para a membrana plasmática, onde a inibição da subunidade catalítica pela regulatória é aliviada. Assim, a subunidade catalítica p110 fosforila o grupo 3-hidroxil das *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate* (PIP2), convertendo-as em *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate* (PIP3). Esse segundo mensageiro, recruta a *phosphatidylinositol-dependent Kinase 1* (PDK1) e o AKT para a membrana plasmática. O AKT é então fosforilado na Thr308 por PDK1 e na Ser473 pelo *mammalian targeted of rapamycin* (mTOR) complexo 2 (mTORC2) e ativa a via de sinalização *downstream*. A atividade de fosfatase lipídica da PTEN remove o fosfato 3' do anel inositol da PIP3 e, inativa a sinalização da via de PI3K (LEEVERS; VANHAESEBROECK; WATERFIELD, 1999; THORPE; YUZUGULLU; ZHAO, 2015; LIN et al., 2015).

Além do seu papel de desfosforilar substratos lipídicos, a PTEN apresenta atividade fosfatase protéica. Tamura et al. (1998), demonstraram que a interação da PTEN com as integrinas da MEC reduz substancialmente a migração celular, os microfilamentos de actina e em 64% a fosforilação da tirosina da cinase de adesão focal (FAK). Posteriormente, Dey et al. (2008) demonstraram que o estímulo com vitronectina, que ativa os receptores de integrina, promove taxa de migração semelhante nas linhagens celulares de glioma *PTEN null* U87-MG, e nas transfectadas com o vetor de expressão retroviral que contém clonado o *PTEN* mutado R130M, cataliticamente inativo. Entretanto, linhagens transfectadas com o vetor que contém clonado o *PTEN WT*, ou *PTEN* com atividade fosfatase lipídica inativa, ou que superexpressam o C-terminal da cinase Src (CSK), apresentam taxa de migração significativamente menor que o controle. O tratamento com o PP1, inibidor de cinases da

família Src (SFks), bloqueia a migração das células U87-MG, sem modificar o pAKT. Utilizando astrócitos primários, demonstraram que o bloqueio da atividade cinase da FYN, membro predominantemente expresso das SFks e que controla a migração via $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$, diminui em 60% a migração dessas células. Assim, concluem que a migração das células de glioma, dependente de integrinas, é regulada pela atividade fosfatase protéica da PTEN, envolve o papel das SFks e independe da sua função fosfatase lipídica.

A atividade fosfatase protéica da PTEN, também tem papel relevante no tráfego endossomal celular, atuando sobre o Rab7, uma proteína conhecidamente envolvida com o amadurecimento dos endossomos e fusão dos endossomos tardios aos lisossomos. Shinde e Maddika (2016), demonstraram que a PTEN, através do seu domínio C2, interage com o complexo citosólico inativo Rab7 GDP-Mon1 e desfosforila o RAB7 na sua serina 72 e tirosina 183. O Rab7 desfosforilado é capaz de interagir com o inibidor de dissociação do GDP (GDI), o qual entrega o complexo RAB7-Mon1 a membrana endossomal. Nessa membrana, o Rab7 interage com a proteína efetora CcZ1, um dos componentes do fator de troca GDP/GTP (GEF). O Rab7, agora ativado, é capaz de se ligar a proteína lisossomal que interage com o Rab7 (RILP), promovendo a maturação do endossomo, sua interação com lisossomo e a degradação das vesículas que contém o EGFR ativado.

Planchon, Waite e Eng (2008), descreveram que a PTEN nuclear tem uma variedade de funções como a regulação negativa de MAPK (ERK), promovendo a diminuição do nível da ciclina D1 e a parada do ciclo celular em G0-G1, o aumento dos níveis de RAD1 e do reparo da dupla fita do DNA, a interação com a proteína C que se liga especificamente no centrômero (CENP-C) com aumento da estabilidade cromossômica e o aumento da apoptose. Ademais, ausência da PTEN nuclear está associada com tumores mais agressivos.

A perda da função somática do PTEN ocorre em diversos tumores esporádicos incluindo melanoma, glioblastoma, cólon, esôfago, CE, renal, pancreático, mama, cervical e vulvar (FOO et al., 2013; SHROFF et al., 2013; GUO et al., 2015; LAVORATO-ROCHA et al., 2015; YANG et al., 2016; SENOL et al., 2017). Mutações germinativas do *PTEN* estão associadas a 85% dos casos da Síndrome de Cowden e 65% da Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, assim como a outras desordens. Coletivamente, são conhecidas como Síndrome Tumor Hamartoma PTEN (PHTS) e caracterizam-se pelo risco aumentado de câncer de tireóide, mama e útero (ENG, 2003; SARQUIS et al., 2006).

1.3.4 Expressão do PTEN nos diversos tumores

No adenocarcinoma de cólon (CCR), Senol et al. (2017) descreveram que 12 dos 38 biomarcadores avaliados por microarranjo de tecido (TMA), apresentam expressão diferencial entre tumor e não tumor. Especificamente a PTEN, encontra-se expressa nas 20 amostras de mucosa colônica normal e em 59 dos 189 casos de CCR. A perda da PTEN relaciona-se significativamente com a presença de metástase linfonodal e com os estadiamentos avançados.

No pâncreas, Foo et al. (2013) avaliaram por TMA a expressão da PTEN em 133 pacientes com adenocarcinoma ductal, no E II, submetidos a ressecção cirúrgica. O tecido pancreático normal adjacente, apresentou expressão forte da PTEN em 100% dos casos. Nos tecidos tumorais, a marcação foi negativa em 25.6% das amostras, e 74.4% reteram a PTEN citoplasmática e/ou nuclear. A perda da PTEN relacionou-se com menor SG, menor SLD e representa um fator de prognóstico independente, nesse grupo. No adenocarcinoma da ampola de Vater (AA), Shroff et al. (2013) demonstraram que a marcação da PTEN na IHQ, mostrou-se ausente, fraca e forte, respectivamente em 23 (25%), 57 (62%) e 12 pacientes (13%) submetidos a duodenopancreatectomia. A perda da expressão da PTEN no AA, está significativamente relacionada com linfonodos metastáticos, estadiamentos avançados, maior recorrência, pior SG e SLD. A intensidade de marcação, fraca ou forte, não se relaciona ao prognóstico.

Lu et al. (2015), avaliaram a expressão da PTEN e do mTOR por IHQ e *Western blot*, em 148 pacientes com carcinoma de células escamosas do esôfago, submetidos a esofagectomia. Demonstraram que a expressão da proteína PTEN está aumentada no tecido normal quando comparado ao tumoral e a expressão da mTOR mostrou-se elevada nos tecidos tumorais. O coeficiente de Pearson evidenciou uma correlação negativa significativa entre a expressão dessas duas proteínas. Na análise multivariada, a expressão da mTOR, bem como o estadiamento e o grau de diferenciação celular, representam fatores de prognóstico independentes. A alta expressão da PTEN e a baixa expressão da mTOR relacionam-se com melhor SG e SLD.

No câncer de mama, Yang et al. (2016) incluíram na meta-análise 32 trabalhos e 4393 pacientes com idade entre 20 e 95 anos e estadiamento variando de I a IV. Demonstraram que a expressão negativa da PTEN na IHQ, está significativamente associado com a sobrevida global desfavorável.

Bakkar et al. (2015) avaliaram a expressão da PTEN em 126 pacientes com carcinoma seroso de alto grau ou carcinoma primário de peritônio, no estadiamento avançado (III e IV). Demonstraram, pelo método semi-quantitativo de IHQ, que 58%, 31% e 11% apresentaram, respectivamente, marcação difusa e forte, reduzida e ausente para a PTEN. Embora não se associe com a cirurgia de citorredução, nem com a sensibilidade à platina, a expressão positiva da PTEN cursa com uma pior sobrevida livre de recorrência e com pior prognóstico.

No Brasil, Lavorato-Rocha et al. (2015) avaliaram a expressão da PTEN por IHQ em 150 mulheres com carcinoma de vulva. Utilizando a técnica quantitativa denominada HScore, a qual considera a percentagem e intensidade de marcação, demonstraram que essa proteína é expressa no citoplasma e no núcleo de células tumorais e não tumorais. Níveis maiores de expressão da PTEN foram encontrados nos pacientes com melhor sobrevida. Assim, sugerem ser a PTEN um biomarcador de bom prognóstico em pacientes com câncer vulvar.

No carcinoma cervical, Guo et al. (2015) avaliaram a resposta à quimioterapia neoadjuvante (QNA) baseada em platina em 259 pacientes no E Ib2 e IIb e sua associação com 17 polimorfismos de nucleotídeo único (tSNPs) na via de PI3K. Encontraram que o genótipo CC no *locus* 17431184 do *PTEN*, demonstra uma tendência à associação com o grupo não-respondedor à QNA. Além disso, a heterozigotidade em dois *loci* do gene *PIK3CA* mostra associação significativa com a quimiorresistência à cisplatina combinada ao paclitaxel, mas não a carboplatina combinada ao paclitaxel. Este grupo sugere que o polimorfismo genético da via de PI3K, tem papel importante em modular a resposta terapêutica à quimioterapia.

Du et al. (2016) demonstraram que em 41 pacientes com carcinoma do colo do útero, o nível de expressão do microRNA-221 (miR-221) foi significativamente maior nos tecidos tumorais que no tecido adjacente normal. A transfecção das linhagens celulares HeLa e SiHa, com o miR-221 mimico e inibidor, resultou na redução e indução da expressão do PTEN, além do aumento e diminuição da função pAKT, respectivamente. Ademais, o miR-221, diminuiu a sensibilidade ao gefitinib, um inibidor do RTK, no câncer cervical, através da via de PI3K.

Peralta-Zaragoza et al. (2016) descreveram o PTEN como alvo de outro microRNA, o miR-21. Esse pequeno RNA não codificante, medeia a regulação do PTEN ligando-se na região regulatória 3'-UTR do PTEN, na sequência do nucleotídeo 1925 a 1956. Células SiHa HPV 16+, transfectadas com o plasmídeo SIMIR21, um siRNA específico para o miR-21,

apresentam um aumento de 60% na expressão do PTEN, diminuição da viabilidade celular, formação de vacúolos de autofagossomos e indução do apoptose precoce. No câncer de próstata, as células PC3 transfectadas com esse micro-RNA apresentam diminuição significativa na expressão da PTEN e aumento da expressão dos genes PI3K e AKT, *downstream* dessa via. Há aumento da viabilidade e invasividade celular, além da expressão de genes anti-apoptóticos como o Bcl-2 e Survivina assim como dos pró-proliferativos MMP2 e MMP9 (YANG; GUO; SHAO, 2017).

No carcinoma de endométrio Lacey et al. (2008), em estudo caso-controle de dados populacionais, demonstraram que a perda da expressão do PTEN em biópsias de endométrio com hiperplasia endometrial (HE), não está associado com o aumento do risco de progressão para o CE. A presença de glândulas com PTEN inativo, mostrou-se relativamente alta (50%) e semelhante aos controles, os quais não progrediram para o câncer. Assim, o *status* do PTEN na biópsia apresenta baixa sensibilidade como marcador de progressão. Por outro lado, as mutações do PTEN em três casos que progrediram da HE para o CE, foram conservadas. Este grupo sugere que essas mutações devem ter papel como marcador para clones isolados e ocorre precocemente, persistindo durante a carcinogênese endometrial.

Memarzadeh et al. (2010), estabeleceram um sistema de regeneração endometrial *in vivo* dissociando o epitélio uterino murino do estroma. Utilizando esse sistema, demonstraram que a perda exclusiva do PTEN epitelial ou a ativação de AKT, são suficientes para iniciar o CE no epitélio uterino adulto. No CE, as mutações são complexas e heterogêneas, e nenhuma mutação mostrou-se exclusiva de um tipo tumoral. Embora o CEE tenha uma alta prevalência de *PTEN* mutado, no CES o gene altamente mutado é o *TP53*. Quando o CEE é do grau histológico 3, existe algum grau de sobreposição de suas características moleculares (MURALI; SOSLOW; WEIGELT, 2014).

Djordjevic et al. (2012) demonstraram por IHQ, marcação ausente ou heterogênea para a PTEN em 75% dos CEE. Por outro lado, 57% das amostras de CE-NE, apresentam marcação positiva, caracterizada como citoplasmática, difusa e nuclear em >90% das células. A perda do PTEN foi melhor detectada pela IHQ (64%) do que pelo sequenciamento (43%). Anormalidades no sequenciamento do *PTEN* e na perda da proteína por IHQ foram encontradas, respectivamente, em 51% e 75% dos CEE e em 28% e 43% dos CE-NE. Entretanto, não houve correlação entre o grau histopatológico do tumor e esses achados. Embora aberrações na sequência do exon 7 do *PTEN* tenha sido mais comum no CEE do que no CE-NE, elas foram identificadas em todos os éxons, o que demonstra a dificuldade de

utilização clínica desse método. Posteriormente, Djordjevic et al. (2013) avaliaram 87 pacientes com CE-NE e demonstraram que a positividade da PTEN na IHQ mostrou-se significativamente relacionada com a expressão de proteínas do MMR. Através deste método, a PTEN configura-se como um biomarcador independente, que potencialmente pode ajudar a identificar pacientes que devem ser investigados quanto a Síndrome de Lynch.

Mirantes et al. (2013) apresentaram um novo modelo de camundongo *knockout* que carrega a deleção do PTEN induzida pelo tamoxifeno (TMX), exclusivamente nas células epiteliais. Após 6 a 8 semanas da injeção intraperitoneal do TMX, 100% dos camundongos apresentaram adenocarcinoma *in situ* no endométrio (AIS). As tireóides desses camundongos são maiores que as dos controles. Os folículos tireoideanos apresentam perda total da expressão do PTEN, desenvolvem hiperplasia nodular folicular, mas não o carcinoma invasor de tireóide. Os camundongos machos, evoluíram com perda completa da PTEN nas células epiteliais prostáticas, mas não nas estromais, apresentando desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial prostática e aumento das células positivas para Ki-67, indicando proliferação das células epiteliais prostáticas. Nos tecidos do rim, fígado, pulmão e cólon, há perda da imunoreatividade da PTEN, entretanto nenhum deles mostrou alterações morfológicas ou crescimento neoplásico. O tratamento com everolimus, inibidor de mTOR, promove redução da severidade da lesão endometrial, 25% dos camundongos passam a ter endométrio normal, 25% apresentam AIS e 50% hiperplasia de endométrio. O everolimus também diminui a tireoideomegalia provocada pelo TMX e a porcentagem de células positivas para Ki-67.

Scully et al. (2014) desenvolveram a linhagem celular Ishikawa de CE humano que expressa PTEN e o RE α mutante, caracterizado pela ausência da sequência de localização nuclear (ISK-RE α _{NLS}PTEN⁺). Demonstraram que o estímulo do estrogênio (E2), promove o recrutamento do PTEN para o complexo RE α /CK2 α e que o RE α citosólico é suficiente para promover a fosforilação do AKT. A exposição do camundongo ooforectomizado atímico ao E2, promove aumento do pPTEN, tPTEN e pAKT no endométrio. Propuseram um modelo no qual, no complexo E2/RE α /CK2 α /PTEN, a CK2 α promove fosforilação nos resíduos regulatórios S380, T382 e T383 da cauda C-terminal do PTEN, diminuindo a atividade fosfatase lipídica do PTEN, o que leva a ativação da sinalização *downstream* do AKT. Resumidamente, a sinalização E2/RE α aumenta a fosforilação de AKT através de ações regulatórias negativas sobre o PTEN (Quadro 1.8).

Quadro 1.8 - Expressão do PTEN total no carcinoma de endométrio.

Autor	Amostra e linhagens	Perfil de expressão	Potencial de aplicação
Lacey et al., 2008	caso-controle populacional 138 pacientes com HE que após 1 ano evoluíram para CE 241 controles com HE que não evoluíram para CE	IHC: PTEN-null BPO HE, não ↑ progressão para CE. 50% glândulas PTEN inativo @ controles 3 casos que progrediram: mutações do PTEN (conservadas).	mutações: marcador para clones isolados, ocorre precocemente e persiste durante a carcinogênese.
Memarzadeh et al., 2010	desenvolveram sistema de regeneração endometrial <i>in vivo</i> dissociando o epitélio uterino do estroma	perda exclusiva do PTEN epitelial ou a ativação de AKT: suficientes para iniciar o CE no epitélio uterino adulto.	NA
Djordjevic et al., 2012	154 pacientes com CE 100 CEE: 6 G1, 78 G2, 16 G3 54 CE-NE: 13 TMMM, 10 indiferenciados, 4 CCC, 1 CS, 26 mistos	IHQ: 75% CEE PTEN ausente ou heterogênea 57% CE-NE: PTEN citoplasmática, difusa e nuclear em >90% das células.	NA
Djordjevic et al., 2013	87 pacientes com CE-NE	IHC: Positividade da PTEN relaciona-se com a expressão de proteínas do MMR.	PTEN: biomarcador independente, identificar pacientes que devem ser investigados quanto a Síndrome de Lynch.
Mirantes et al., 2013	novo modelo de camundongo <i>knockout</i> com deleção do PTEN induzida pelo TMX	TMX intraperitoneal: após 6-8 semanas, 100% camundongos apresentaram AIS	Terapêutico everolimus: 25% endométrio normal, 25% AIS e 50% HE.
Scully et al., 2014	Ishikawa: RE _α NLS ⁺ PTEN ⁺ Camundongo: ooforectomizado atímico ao E2	E2: E2/RE α /CK2 α /PTEN CK2 α : pPTEN (S380, T382 e T383) diminuindo a atividade fosfatase e ↑AKT	NA

CCC: carcinoma de células claras, CEE: CE do tipo endometrióide, CE-NE: carcinoma de endométrio não endometrióide, CS: carcinoma seroso, G1: grau histopatológico 1, G2: grau histopatológico 2, G3: grau histopatológico 3, HE: hiperplasia endometrial, TMMM: carcinossarcomas, TMX: tamoxifeno, AIS: adenocarcinoma *in situ* no endométrio, E2: 17 β -estradiol

1.3.5 O transcrito do PTEN e suas variantes de *splicing*

O gene *PTEN* também passa pelo processo de *splicing* alternativo e gera onze isoformas distintas. A *PTEN-full length* (PTEN-FL) contém 9 éxons e representa a isoforma completa. As variantes de *splicing* (VS) 3a, -3b e -3c e as VS 5a, -5b, -5c e -5d consistem na inserção de regiões intrônicas após o éxon 3 e 5, respectivamente. A VS com deleção do éxon 6 (VS Del E6) há perda de 142pb após o éxon 5 (SARQUIS et al., 2006). A VS com deleção parcial do éxon 5 (VS Del E5), há perda de 77pb desse éxon, e a VS PTEN- Δ com inclusão do íntron 8 (AGRAWAL e ENG, 2006; BREUKSCH et al., 2018) (Figura 1.10).

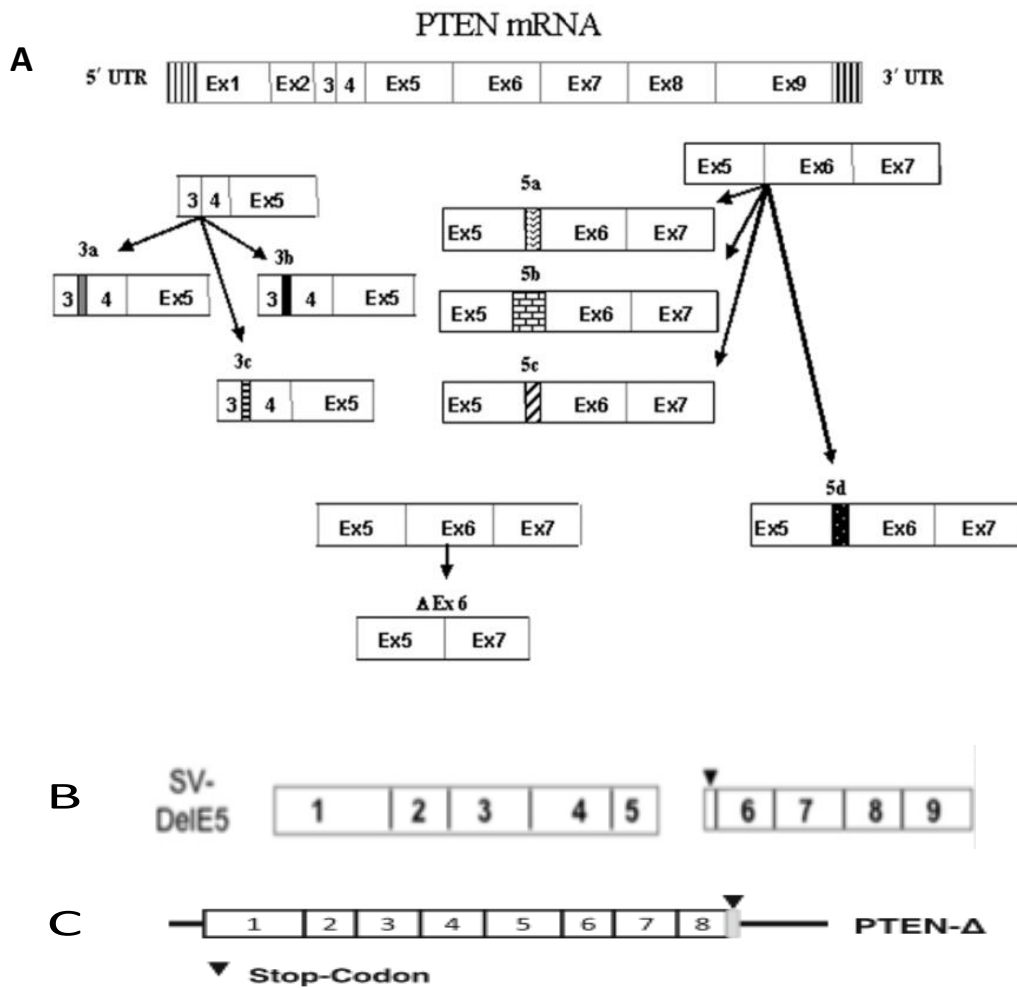


Figura 1.10 - Isoformas do PTEN. **A.** Diagrama mostrando as variantes de splicing do PTEN: sv-3a, -3b, -3c, -5a, -5b, -5c, -5d e -Del E6 (Δ Ex6). Excetuando-se a VS- Δ Ex6, todas as demais consistem na inserção de regiões intrônicas (representadas por barras de diferentes padrões) após a extremidade 3' dos exons. Assim, a VS-3a, -3b, -3c são geradas com a inserção de 29pb, 52pb e 40pb após o éxon 3 e, as VS-5a, -5b, -5c e -5d com a inserção de 38pb, 327pb, 158pb e 60pb após o éxon 5. A VS Δ Ex6 é gerada pela deleção do éxon 6. **B.** VS- DelE5 é gerada pela deleção parcial do éxon 5. **C.** VS PTEN- Δ com inclusão do intron 8, após o éxon 8. (SARQUIS et al., 2006; AGRAWAL e ENG, 2006; BREUKSCH et al., 2018).

1.3.6 OPN e sua relação com o PTEN

Alguns estudos têm mostrado que a expressão da OPN se relaciona com o *status* do PTEN e modula sua atividade. Shao et al. (2007) demonstraram que camundongos duplos heterozigotos para o gene *Apc* e para o *Pten* ($Apc^{min/+}Pten^{+/-}$), desenvolveram adenomas de alto grau e adenocarcinomas. Por outro lado, os camundongos heterozigotos para o gene *Apc*, mas com *Pten* WT ($Apc^{min/+}Pten^{+/+}$), desenvolveram adenomas colônicos de baixo grau. Naqueles, os tumores apresentavam-se em maior número e tamanho. Dentre os 113 genes avaliados, a OPN foi caracterizada como o gene de expressão majoritária e mostrou-se 4,6

vezes mais expressa nos adenocarcinomas *Apc^{min/+}Pten^{+/-}* que nos adenomas *Apc^{min/+}Pten^{+/+}*. Em ensaios *in vitro*, utilizando a linhagem celular HCT116, representativa de adenocarcinoma de cólon, encontraram que na presença de mutação da via de PI3K (HCT116/PI3KCAMU), a privação dos fatores de crescimento promove o aumento da síntese da OPN, uma menor fragmentação do DNA e o aumento da viabilidade celular. O aumento da expressão da OPN na linhagem celular epitelial intestinal RIE transformada por *Ras*, é revertido tanto com a inibição da via de sinalização PI3K e MAP/ERK como através de duas sequencias independentes de siRNA da OPN. Essa interferência, além de promover a diminuição da OPN, diminui o número de células, as colônias formadas são não invasivas e apresentam menor tamanho.

Kim et al. (2005) demonstraram que o estímulo com o ácido hialurônico (AH), principal glicosaminoglicano da MEC do cérebro, promove aumento da expressão da OPN nas linhagens celulares de glioma humano mutantes para o *PTEN* (U87MG, U373MG e U251MG), mas não nas células *PTEN-WT* (LN18 e LN428). Inibidores da via de PI3-K (Ly294002 e Wortmannin) e de mTOR (Rapamicina), mas não da via ERK1/2 (PD98059) significativamente inibem a expressão de OPN induzida por AH. O estímulo com o AH favoreceu o aumento da migração na linhagem celular U87MG (*PTEN* mutante), porém, não na LN428 (*PTEN-WT*). Naquelas, o anticorpo neutralizante da OPN é capaz de diminuir a motilidade dependente de AH e a adição exógena de OPN proporciona aumento na motilidade celular. Logo, ativação da motilidade celular pelo AH, requer expressão da OPN e o *PTEN* modula a motilidade celular por inibir a expressão de OPN induzida por AH, via PI3-K/Akt/mTOR, nas células de glioma. Assim, a identificação de genes e suas VS envolvidas nos tumores de endométrio podem permitir a melhor caracterização dessa neoplasia. Nesse sentido, o licopeno, um conhecido carotenóide, vem sendo utilizado como um agente citotóxico, indutor de estresse celular e auxilia na compreensão dos papéis funcionais, bem como da possível modulação entre esses genes e de suas VS.

1.4 O ANTIOXIDANTE LICOPENO

O licopeno é uma molécula simétrica contendo 13 duplas ligações na cadeia de carbono. Destas, duas ligações duplas são não conjugadas, o que lhe confere maior reatividade. A configuração *all-trans* é o isômero mais comum encontrado nos alimentos e o *5-cis*, o mais estável (NGUYEN; SCHWARTZ, 2000; CHASSE et al., 2001) (Figura 1.11).

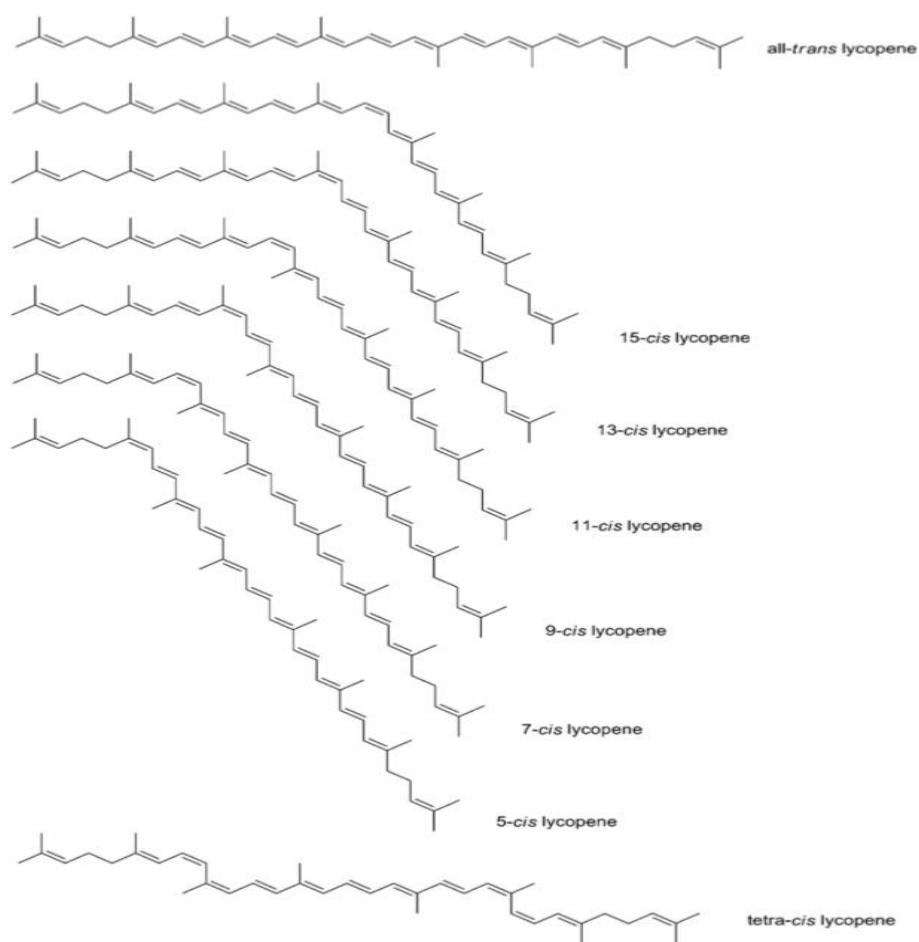


Figura 1.11 - Estrutura do licopeno e seus diversos isômeros (STORY et al., 2010).

O licopeno é o carotenóide predominante no plasma e tecidos humanos, representa 50% dos carotenóides do soro, sendo encontrado em altas concentrações no testículo, na adrenal e na próstata. A maior fonte de licopeno é o tomate e seus derivados (GESTER, 1997; SHAMI; MOREIRA, 2004; TANG, 2012).

No CCR, Tang et al. (2008) demonstraram que o licopeno, de uma maneira dose dependente, suprime efetivamente a proliferação das células HT-29. A taxa de sobrevivência celular mostrou-se diminuída na presença do Wortamanin, um inibidor de PI3K e o tratamento com licopeno suprime significativamente a fosforilação de AKT. Esse carotenóide, aumenta o acúmulo de β -catenina fosforilada no citoplasma, promovendo sua degradação, e inibe a atividade do promotor do gene da ciclina D1, suprimindo a expressão dessa proteína. O estímulo dessas células com o licopeno, induz a localização nuclear de p27 e bloqueia a fosforilação da proteína Retinoblastoma (Rb), o que restringe a entrada da célula na fase S do ciclo celular.

O tratamento da linhagem celular do câncer de pâncreas (PANC-1), com licopeno a 0.25 e 0.5 μM , promoveu, de uma maneira dose dependente, a diminuição da viabilidade celular, do nível de ROS intracelular e mitocondrial, da taxa de consumo de oxigênio e do potencial de membrana mitocondrial, do NF- κ B nuclear, da expressão protéica do inibidor do NF- κ B (I κ B α) fosforilado (pI κ -B α) e da expressão dos inibidores de apoptose como o cIAP1, cIAP2 e survivina. O grupo demonstrou que esse carotenóide aumenta a expressão da caspase-3 clivada, do I κ B α e a relação Bax/Bcl-2. Propuseram que na linhagem celular PANC-1, o licopeno tem efeito inibitório na sinalização do NF- κ B e na expressão de seus genes alvo, os quais são medeadas por ROS (JEONG; LIM; KIM, 2019).

Nahum et al. (2001) demonstraram que o tratamento com licopeno inibe a progressão do ciclo celular para a fase S, na linhagem celular ECC-1, de CE. Ademais, a atividade da cinase dependente de ciclina 2 (Cdk2), e da ciclina D1, diminui de 60 a 70% e de 80%, respectivamente, em relação ao grupo controle não tratado.

2. JUSTIFICATIVA

O CE não apresentou avanços significativos no tratamento, nas últimas décadas, principalmente por pouco conhecimento na biologia desse tumor. Nesse contexto, a OPN, um reconhecido oncogene, e o PTEN, um gene supressor tumoral que atua como regulador negativo da via PI3K, demonstraram apresentar papel em diversos tumores, bem como no CE. Entretanto, a expressão de variantes específicas de *splicing* do PTEN foram pouco exploradas no carcinoma de mama e renal. Por outro lado, as variantes de *splicing* da OPN tem apresentado papel como biomarcador tumoral de diagnóstico e prognóstico mais fidedigno que os observados com a OPN total. Embora a OPNc tenha sido descrita no CE por Hahne et al. (2013), a OPNa e OPNb, bem como a expressão de variantes de *splicing* do PTEN, nesse modelo tumoral, ainda não foram caracterizadas. Assim, avaliar a expressão de variantes de *splicing* da OPN e do PTEN no CE, abre perspectivas de melhor entendermos os potenciais papéis das variantes de *splicing* destes genes na biologia desses tumores. Além disto, de modo a iniciar a compreensão do papel destas variantes na biologia do CE, avaliar seus perfis de expressão mediante o tratamento de linhagens celulares de CE com agentes citotóxicos que modulam a viabilidade celular também pode nos esclarecer como estas isoformas contribuem na biologia e sobrevivência destes tumores. Neste cenário, a seguir são apresentados os objetivos deste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Caracterizar o perfil de expressão de isoformas de *splicing* da OPN (OPN-SI) e do PTEN (PTEN-SI) em linhagens celulares de endométrio.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de expressão de isoformas da OPN e do PTEN e possíveis relações com o grau e tipo histopatológico das linhagens investigadas;
- Com base no perfil de expressão observado, avaliar se as OPN-SI e as PTEN-SI apresentam expressão diferencial entre as linhagens tumorais e não tumorais de endométrio;
- Analisar o perfil de expressão destas variantes em resposta à efeitos citotóxicos de extratos de tomate contendo licopeno, como abordagem inicial de se compreender os possíveis papéis das PTEN-SI em células de CE.

4. DESENHO EXPERIMENTAL

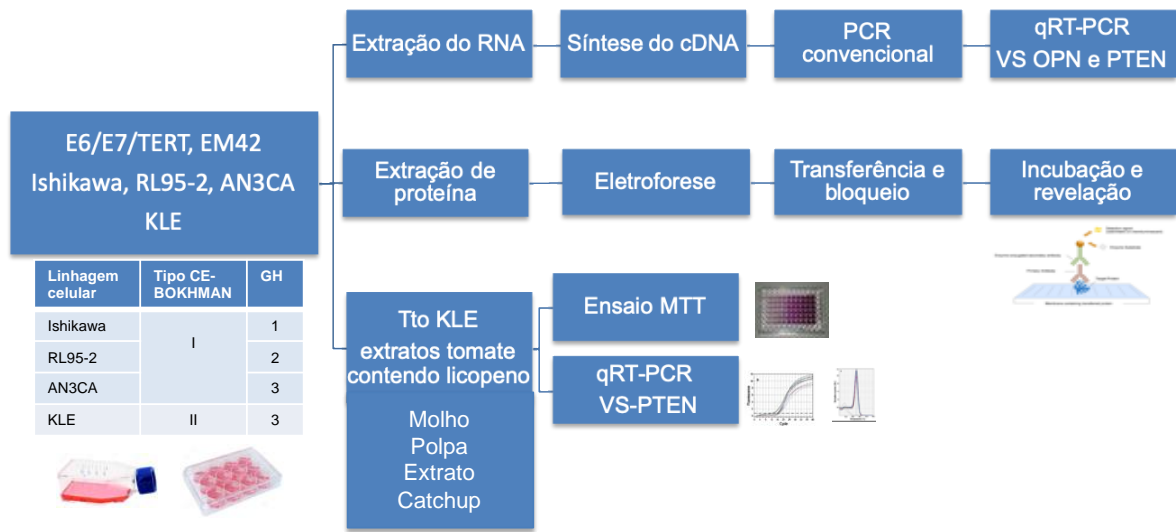


Figura 4.1- Desenho experimental do estudo. Utilizamos seis linhagens celulares de endométrio, sendo duas não tumorais (E6/E7/TERT e EM42) e quatro tumorais (Ishikawa, RL95-2, AN3CA e KLE). A linhagem celular de carcinoma de endométrio Ishikawa, RL95-2, AN3CA são representativas dos CE do Tipo I de Bokhman, de grau histopatológico 1, 2 e 3, respectivamente. A linhagem celular KLE é representativa dos CE do Tipo 2 de Bokhman, de grau histopatológico 3. Fizemos a extração do RNA e de proteína para a realização do PCR em tempo real das VS da OPN, do PTEN e para o ensaio de Imunoblot, respectivamente. Tratamos a linhagem celular tumoral KLE com extratos de tomate contendo licopeno (molho, polpa, extrato de tomate ou catchup) e realizamos ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico de MTT e PCR em tempo real para VS do PTEN. CE: carcinoma de endométrio, MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolio, qRT-PCR: PCR em tempo real, VS: variantes de *splicing*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cultura de células

Utilizamos as linhagens celulares tumorais de endométrio, Ishikawa, RL95-2, AN3CA e KLE, derivada de amostras teciduais provenientes de lesão primária ou metastática de endométrio humano (Tabela 5.1). A Ishikawa e a RL95-2 são representativas do CE do Tipo I, tendo origem a partir do adenocarcinoma endometrióide G1 e do adenocarcinoma adenoescamoso G2, respectivamente. As linhagens celulares AN3CA e KLE são representativas de grau histopatológico 3. A AN3CA é derivada de lesão metastática linfonodal e a KLE, do tumor primário de endométrio. Yamamoto et al. (2015) refere-se à linhagem celular AN3CA como endometrióide, ou seja, representativa do CE do Tipo I. Entretanto, Korch et al. (2012) a consideram representativa do CE do Tipo II. Similarmente, a linhagem celular KLE tem sido descrita como representativa de tumores do Tipo I ou II. Estas linhagens apresentam distintos *status* mutacionais do PTEN (FORBES et al., 2011). Apesar das controvérsias na literatura sobre o tipo histopatológico representado pelas linhagens celulares AN3CA e KLE, a maioria dos autores as consideram como representativa dos tumores do Tipo I e do Tipo II, respectivamente. Nesse estudo assumimos a linhagem celular AN3CA como Tipo I, G3 e a linhagem celular KLE como Tipo II, G3.

As linhagens celulares epiteliais não tumorais de endométrio humano utilizadas foram a E6/E7/TERT e a EM42, obtidas a partir de endométrio proliferativo tardio de pacientes submetidas a histerectomia devido a mioma. Essas linhagens foram imortalizadas com vetor retroviral transduzido com E6 e E7 do HPV 16, além do hTERT (Tabela 4.1). As linhagens celulares foram cultivadas conforme a recomendação da *American Type Culture Collection*. Todas as linhagens celulares, exceto a KLE, foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), e 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S). A KLE foi cultivada em meio DMEM/F12 (mistura de 1:1 - *Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient F-12 Ham*). Todas as linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo grupo do Dr. Huang TH, do *Institute of Biotechnology of The University of Texas Health Science Center at San Antonio-USA*.

Tabela 5.1 - Características das linhagens celulares tumorais e não tumorais do endométrio.

Linhagens celulares	Tipo HP	Grau HP	Classificação de Bokhman	Origem	Gene <i>PTEN</i> mutado	Referências
E6/E7/TERT	NT	NT	NT	Endométrio proliferativo	Não	Kyo <i>et al.</i> , 2003
EM42	NT	NT	NT	Endométrio proliferativo	Não	Rong <i>et al.</i> , 2002
Ishikawa	Adenocarcinoma endometrióide	G1	Tipo I	39 anos	Sim	Myers; Clements, 2001
RL95-2	Carcinoma adenoescamoso	G2	Tipo I	65 anos, tumor primário	Sim	Way <i>et al.</i> , 1983
AN3CA	Adenocarcinoma	G3	Tipo I*	55 anos, metástase	Sim	Korch <i>et al.</i> , 2012; Korets <i>et al.</i> , 2014
KLE	Adenocarcinoma	G3	Tipo II*	64 anos, branca, O+, tumor primário	Não	Liu <i>et al.</i> , 2014; Lin <i>et al.</i> , 2014; Korets <i>et al.</i> , 2014; ATCC

HP: histopatológico; NT: não tumoral; * Informações controversas na literatura: CE do Tipo I/G3 ou do Tipo II; ATCC: *American Type Culture Collection*-, Manassas, VA

5.2 Extração de RNA total

A extração do RNA total das linhagens celulares foi feita utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), seguindo o protocolo conforme as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop Lite* da Thermo Scientific.

5.3 Síntese de DNA complementar

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita a partir de 1 µg de RNA total, as quais foram reversamente transcritas para cDNA, segundo o protocolo do kit “*Superscript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR*” (Invitrogen) conforme descrito pelo fabricante. Após a síntese do cDNA, o mesmo era dosado no espectrofotômetro *NanoDrop Lite* da Thermo Scientific. O cDNA foi então utilizado em uma concentração de 60 ng/µl para a realização do PCR.

5.4 PCR em tempo real

Para testar a qualidade do cDNA sintetizado, avaliamos a expressão do gene constitutivo GAPDH através de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Este gene foi amplificado utilizando-se as seguintes condições: 2µL do tampão 10x (Amersham), 2µL de Taq polimerase (5U/µL), 0,4µL dNTPs (10µM), 0,6 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,4µL dos oligonucleotídeos senso e antisenso a 30 moles/µl e 5 µl de cDNA a 60 ng/µL para um volume final de 20 µL. A sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene GAPDH estão apresentadas no Quadro 5.1. As condições de ciclagem foram: incubação inicial de 94°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 90 segundos (extensão). O tamanho do produto amplificado com estes oligonucleotídeos era de 418 pb.

A análise do nível de expressão das isoformas da osteopontina (OPNa, OPNb e OPNc) e das variantes de *splicing* do PTEN (PTEN-FL, VS-3a, -3b, -3c, 5a, -5b, -5c, 5d e Del E6) foi realizada através de PCR em tempo real (RT-PCR) através do sistema *SYBR Green* (SYBRTM Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). A reação contém 10 µL de *SYBR Green*, 0,2 µM dos iniciadores senso e antisenso (específico para cada isoforma da OPN, do PTEN ou do GAPDH), 5 µl de cDNA para um volume final de 20 µl. Todas as amostras foram analisadas em duplicada.

As condições de ciclagem utilizadas para a amplificação das isoformas de OPN, consistem em uma incubação inicial a 50°C por 2 min e 95°C por 5 min, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão). A curva de *melt* foi de 90°C por 5 segundos, 65°C por 5 segundos e 90°C por 5 segundos. O termociclador utilizado foi o Illumina e o *software* de análise dos dados o Eco 4.0.07.0.

As condições de ciclagem utilizadas para a amplificação das variantes de *splicing* do PTEN foram: incubação inicial a 50°C por 2 min, ativação da polimerase a 94°C por 5 min, seguidos por 42 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 59°C por 30 segundos (anelamento) e extensão a 72°C por 30 segundos. Após o término da etapa de amplificação, as amostras amplificadas eram submetidas a uma curva de dissociação para verificar se o produto amplificado correspondia ao produto específico de interesse. Essa curva consistia em um aumento de temperatura a partir de 72°C até 95°C por 15 segundos, incubação a 55°C e a 95°C por 15 segundos em cada temperatura. A curva de desnaturação produz um único pico

para reações de amplificação específicas. O termociclador utilizado foi o *ViiA 7* e o software de análise dos dados gerados foi na versão 1.2.2.

Quadro 5.1 - Sequência dos oligonucleotídeos senso e antisenso para cada isoforma da osteopontina e do PTEN

Gene	F Sequência 5'-3'	R Sequência 5'-3'
OPNa	ATC TCC TAG CCC CAC AGA AT	CAT CAG ACT GGT GAG AAT CAT C
OPNb	ATC TCC TAG CCC CAG AGA C	AAA ATC AGT GAC CAG TTC ATC ATG AG
OPNc	CTG AGG AAA AGC AGA ATG CTG	GTC AAT GGA GTC CTG GCT GT
GAPDH	TGA CCC CTT CAT TGA CCT CA	AGT CCT TCC ACG ATA CCA AA
PTEN-FL	TGG ATT CAA AGC ATA AAA ACC A	AAA AGG ATA TTG TGC AAC TCT GC
VS-3a	CAG CCA TCA TCA AAG AGA TCG	CTT TCA GCA CAA TTA ACT TCT CT
VS-3b	CAG CCA TCA TCA AAG AGA TCG	CTG TGT GAC CTT GTT CAA CTC A
VS-3c	CAG CCA TCA TCA AAG AGA TCG	GCA GTA CCC TGG TAA CTC CAA
VS-5a	TCT TTG TGC TGA AAG ACA TT	AGC CTT CTC TTG GAT TTA ATT TGG ACT T
VS-5b	TCT TTG TGC TGA AAG ACA TT	CGC CTC GGC CTC CCA AAG T
VS-5c	TCT TTG TGC TGA AAG ACA TT	GGC CTC TAC AAG GTC AGG ATC AT
VS-5d	TCT TTG TGC TGA AAG ACA TT	GCC TTC TCT TGG ATT TAA TTT GG
VS-Del E6	AGG ACC AGA GAC AAA AAG ATC	CTG GTC CTG GTA TGA AGA AT
GAPDH	CCA TCT TCC AGG AGC GAG A	AAA TGA GCC CCA GCC TTC T

5.5 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. A agarose (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante, foi dissolvida em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) e no corante de *DNA Gel Red* (Biotium). A corrida eletroforética foi a 100 volts e, após a corrida, os géis foram analisados no Gel DocXR. As bandas encontradas foram avaliadas comparando com o padrão de peso molecular de 100 bp (Invitrogen).

5.6 Cálculo do Nível de Expressão das isoformas da OPN e do PTEN

As amostras que apresentaram picos únicos na curva de dissociação foram selecionadas para o cálculo do nível de expressão. Para cada reação de amplificação da isoforma da OPN ou do PTEN, foi utilizado o CT (do inglês "*Cycle-Threshold*"), o qual corresponde ao ciclo de amplificação onde a fluorescência emitida da reação de amplificação cruza a linha de base ("*threshold*"). A média do CT da OPN e do PTEN foi calculada, respectivamente, a partir de seis e três experimentos independentes feitos em duplicata. A partir destes valores, foi então calculado o ΔC_t que representa o valor médio do Ct de cada isoforma diminuído pelo valor médio do Ct do GAPDH. Para o cálculo do $\Delta\Delta C_t$, o valor do ΔC_t da isoforma da amostra de interesse foi diminuído dos valores do ΔC_t da isoforma correspondente da amostra de referência. O nível de expressão de cada isoforma foi então obtido através da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

5.7 Imunoblot

Para o preparo dos extratos protéicos, as células foram centrifugadas, lavadas em PBS e incubadas, durante 30 min, em gelo, com tampão de lise (1% de Triton X-100, 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris, pH 7,4, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, pH 8,0, 0,2 mM de Na₃VO₄, 0,2 mM de NP-40). Os lisados celulares foram centrifugados e a concentração protéica determinada, no sobrenadante, com o ácido Bicinconínico (BCA). No preparo da amostra, 60 µg de proteína nos ensaios com OPN e 47µg naqueles do PTEN, do AKT e pAKT são adicionados ao tampão que contém Tris-HCl, glicerol, bromofenol, SDS e 2β - mercaptoetanol. Esse tampão garante a preservação da amostra, e promove a desnaturação protéica, mantendo as proteínas totais com carga negativa, permitindo a migração e separação das bandas protéicas de acordo com seu peso molecular. As amostras de cada linhagem celular de CE e das linhagens não tumorais, foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS). Realizamos a transferência úmida por 1 hora à 200mA para membranas nitrocelulose (GE). Utilizamos, por 1 hora, solução de 5% de leite em 0,05% de Tween-20 tamponada com fosfato (TBS-T 0,05%), bloqueando as membranas para ligação não específica. As membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo anti-OPN (diluição 1:500, O-17, IBL), com o anticorpo anti-PTEN (monoclonal, diluição 1:1000, Cell Signaling), com anticorpos anti-AKT (diluição de 1:1000, Cell Signaling) e pAKT (diluição 1:500, Cell Signaling) (Tabela 5.2).

Após lavagem das membranas com o TBS-T 0,05%, elas foram incubadas, durante uma hora, com o anticorpo secundário anti-rabbit (diluição 1:20000). As membranas foram expostas no ChemiDoc MP system (BioRad) com o reagente de detecção ECL (*Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent - GE*) para a visualização das bandas. Ao longo do texto, a nomenclatura das proteínas, bem como dos genes foi baseada na nomenclatura da *Human Genome Organisation* (HUGO), no link <https://www.biosciencewriters.com/Guidelines-for-Formatting-Gene-and-Protein-Names.aspx>.

Tabela 5.2 – Anticorpos utilizados no Imunoblot

	Anticorpo primário	Marca
O17 (OPN)	Rabbit 1:1000 em leite 0.05%	IBL
PTEN monoclonal	Rabbit 1:1000 em BSA 1% e TBST 0.1%	cell signaling
AKT	Rabbit 1:1000 em leite 0.05%	cell signaling
pAKT (S473)	Rabbit 1:500 em leite 0.05%	cell signaling
GAPDH (14C10)	Rabbit 1:3000 em leite 0.05%	cell signaling

5.8 Preparo dos extratos de tomate contendo licopeno

De forma a iniciar a caracterização funcional das PTEN-SI em células de CE, utilizamos a abordagem do uso de extratos celulares derivados do tomate, contendo altas concentrações de licopeno. Esta estratégia foi escolhida em função de uma colaboração vigente em nosso grupo em que estes extratos apresentam forte atividade citotóxica em células de carcinoma de próstata (SOARES, 2016). Dados prévios da literatura apontam para efeitos citotóxicos similares em células de tumor de endométrio (NAHUM et al, 2001). Assim, utilizamos extratos contendo licopeno obtidos a partir do molho de tomate, polpa de tomate, extrato de tomate ou catchup para avaliar qual desses extratos apresenta o maior efeito citotóxico na linhagem celular tumoral de endométrio. Essa abordagem, visa avaliar como o perfil de expressão das PTEN-SI se comportariam mediante a ação citotóxica deste composto como análise preliminar para compreender possíveis papéis funcionais destas variantes.

Os extratos liofilizados de cada amostra (molho, polpa, extrato de tomate ou catchup) foram preparados conforme descrito por Soares, 2016. Estes extratos foram obtidos a partir de 500 g de cada amostra, com a adição de 1000 ml de etanol P.A. Posteriormente, a suspensão foi agitada em banho de ultrassom durante 40 minutos. A solução foi filtrada a vácuo e colocada em um balão de fundo redondo para a retirada completa do solvente em rotaevaporador (Marconi) a 60°C por 6 horas. O material foi então congelado em ultrafreezer por 24 horas e levado ao liofilizador (Terroni LD 3000) por 20 horas. Em seguida, foi acondicionado em frasco âmbar a -20°C, para as análises (SOARES, 2016). No momento do uso, este estoque gelatinoso foi diluído para a concentração de 30 mg/ml, com água de injeção estéril na temperatura de 56°C. Após a diluição, foi armazenado no -80°C.

O conteúdo médio de licopeno é de 97,78%, 96,65%, 96,48% e 95,12% para o extrato da polpa de tomate, de molho de tomate, de catchup e de extrato de tomate, respectivamente. O percentual de licopeno total foi estatisticamente diferente entre os extratos da polpa de tomate, de catchup e de extrato de tomate. Entretanto, o conteúdo de licopeno total do extrato de molho de tomate é semelhante ao dos demais produtos (Tabela 5.3) (SOARES et al., 2019).

Tabela 5.3 - Conteúdo de carotenóides totais, cis-licopeno e all-trans-licopeno em produtos a base de tomate

Amostra	Carotenoides Totais	cis-Licopeno	trans-Licopeno	Conteúdo de Licopeno
	(µg/g)	(µg/g)	(µg/g)	(%)
Catchup	147,81 ± 8,35 ^a	9,20 ± 0,89 ^a	133,39 ± 6,64 ^a	96,48 ± 0,36 ^a
Extrato de tomate	85,60 ± 1,09 ^b	6,48 ± 0,88 ^b	74,94 ± 1,73 ^b	95,12 ± 0,22 ^b
Molho de tomate	168,95 ± 5,36 ^c	7,40 ± 0,49 ^b	155,94 ± 7,45 ^c	96,65 ± 1,63 ^{a,b,c}
Polpa de tomate	77,57 ± 1,81 ^d	5,05 ± 0,40 ^b	70,80 ± 2,09 ^b	97,78 ± 0,10 ^c

O conteúdo do licopeno (%) foi mensurado através da fórmula: (cis-licopeno + trans-licopeno) x 100/carotenóides total. A tabela foi expressa como média ± desvio padrão. As letras diferentes entre as amostras indicam diferença significativa entre elas ($p < 0,05$).

5.9 Ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico de MTT

O 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolio (MTT) é um sal hidrossolúvel que, em solução, apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado pelas células viáveis. O ensaio baseia-se na capacidade das células viáveis, através da atividade da enzima redutase mitocondrial, reduzirem metabolicamente o sal de MTT em cristais de formazam. Estes cristais têm coloração azul-púrpura e se acumulam no citoplasma celular. Para este ensaio, foram plaqueadas 1×10^5 células da KLE por poço, em 100 μ l de DMEM/F12, em placas de 96 poços. As placas foram incubadas em estufa, a 37°C, com 5% de CO₂, durante 24 h. Após este tempo, o meio foi desprezado e as células foram tratadas com distintos preparos a partir de tomate.

Os distintos preparos a partir de tomate foram testados em quadruplicata, nas concentrações de 5, 2.5, 1.0 ou 0.5 mg/ml. As placas foram novamente incubadas em estufa, e leituras foram efetuadas em 48, 72 e 96 h. Quatro hs antes da leitura, adiciona-se 20 μ l da solução de MTT (5 mg de MTT em 1 ml de PBS) em cada poço, seguido por incubação durante 4 h. Posteriormente, centrifugar a 450 xg, por 5 min, a 20°C e descartar o sobrenadante. Adiciona-se 100 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço, para dissolver os cristais de formazam, o que resulta em uma solução púrpura. A placa é então homogeneizada por 3 min e incubada durante 10 min a 37°C. A absorbância foi verificada no espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices) com um comprimento de onda de 538nm e seus valores utilizados como indicador de viabilidade celular. Este ensaio foi utilizado para avaliar o efeito do tratamento da linhagem celular KLE com extrato de molho de tomate contendo licopeno sobre a expressão de isoformas do PTEN.

5.10 Análises estatísticas

Primeiramente foi utilizado o software *IBM SPSS Statistics 24* para avaliar, através do teste de Shapiro-Wilk, se as amostras apresentavam distribuição normal. As amostras que apresentaram distribuição normal foram submetidas ao teste paramétrico de *t-student* e as amostras que não apresentaram distribuição normal foram submetidas ao teste não paramétrico *Mann-Whitney*.

6. RESULTADOS

6.1 Análise da expressão das variantes de splicing da osteopontina em linhagens de endométrio

O nível de expressão das diferentes isoformas da OPN foi caracterizado em linhagens celulares de endométrio. As três isoformas da OPN (OPNa, OPNb e OPNc) são expressas em linhagens tumorais e não tumorais de endométrio, exceto a linhagem EM42, que não apresenta níveis detectáveis dos transcritos das três variantes. Em todas as linhagens que expressam as 3 isoformas, a expressão da OPNa é predominante sobre as demais isoformas ($p < 0,001$). Exclusivamente na linhagem não tumoral E6/E7/TERT, a expressão da OPNb é significativamente maior que a OPNc ($p < 0,05$). Nas linhagens celulares Ishikawa, RL95-2, AN3CA e KLE, a diferença entre o nível de expressão entre a OPNb e OPNc não é estatisticamente significativa ($p = 0,94$, $p = 0,53$, $p = 0,74$, $p = 0,39$; respectivamente) (Figura 6.1).

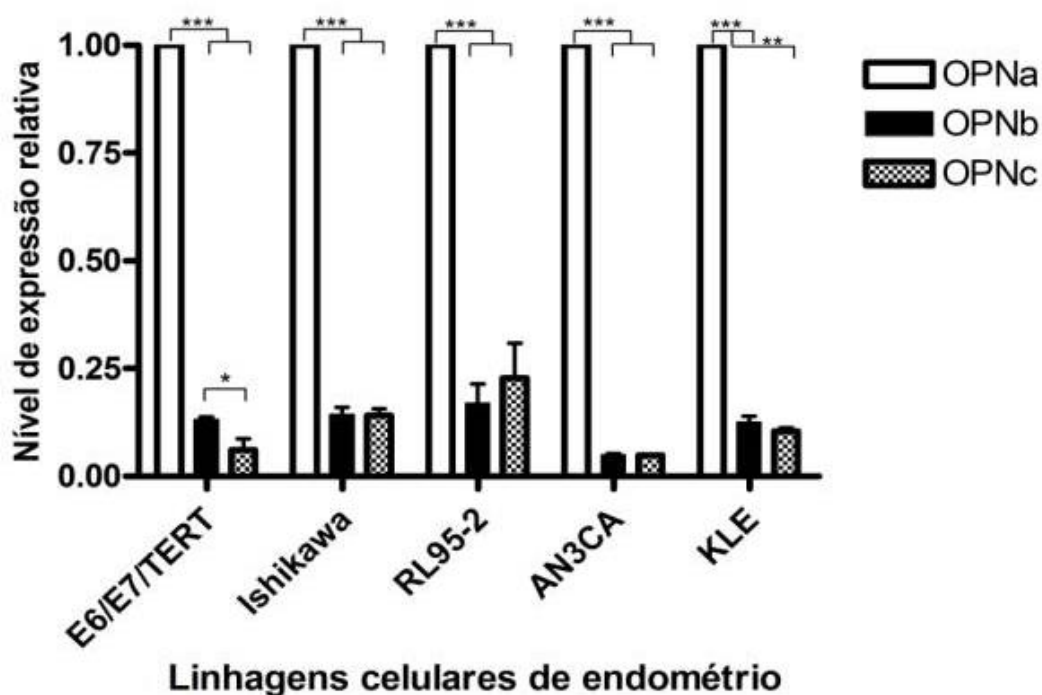


Figura 6.1 - Nível de expressão relativa das isoformas de *splicing* da osteopontina em linhagens celulares de endométrio. O nível de expressão das isoformas de *splicing* da osteopontina foi avaliado em linhagens celulares tumorais (Ishikawa, RL95-2, AN3CA, KLE), bem como na linhagem não tumoral E6/E7/TERT. No eixo da ordenada está representado o nível de expressão relativa das isoformas OPNa, OPNb ou OPNc. O nível de expressão relativa das diferentes isoformas nas linhagens foi analisado utilizando a OPNa como referência e o GAPDH como gene constitutivo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Em seguida, o nível de expressão das isoformas da OPN foi comparado entre linhagens celulares tumorais representativas de tumores de endométrio do Tipo I (Ishikawa,

RL95-2 e AN3CA) e do Tipo II (KLE). A expressão das isoformas OPNa e OPNc é maior na linhagem KLE do que naquelas representativas dos tumores do Tipo I, independente do grau histopatológico ($p < 0,05$). A expressão da OPNb é maior na linhagem celular KLE do que naquelas do Tipo I, G2 e G3, mas não na G1 ($p = 0,06$). Notavelmente, o nível de expressão das três isoformas da OPN é capaz de diferenciar entre as linhagens celulares representativas do grau histopatológico 3 (AN3CA e KLE) (Figura 6.2).

Visando comparar o nível de expressão das três isoformas entre as linhagens celulares representativas de tumores do Tipo I, de distintos graus, utilizamos o nível de expressão da linhagem celular com menor grau histopatológico (Ishikawa) como referência. A expressão das OPN-SI é maior nas linhagens celulares com graus histopatológicos mais diferenciados. Especificamente as linhagens celulares do Tipo I/G1 e do Tipo I/G2 apresentam maior nível de expressão das OPNs que a do Tipo I/G3, embora não haja diferença estatisticamente significativa entre todas essas comparações. Nas linhagens celulares Tipo I/G1 e do Tipo I/G2 o nível de expressão da OPNb e da OPNc não é significativamente maior que na linhagem celular do Tipo I/G3 ($p = 0,0649$; para ambas as OPNs). A linhagem celular representativa do Tipo I/G1 apresenta maior nível de expressão das OPNs que a do Tipo I/G2 ($p < 0,01$) (Figura 6.3).

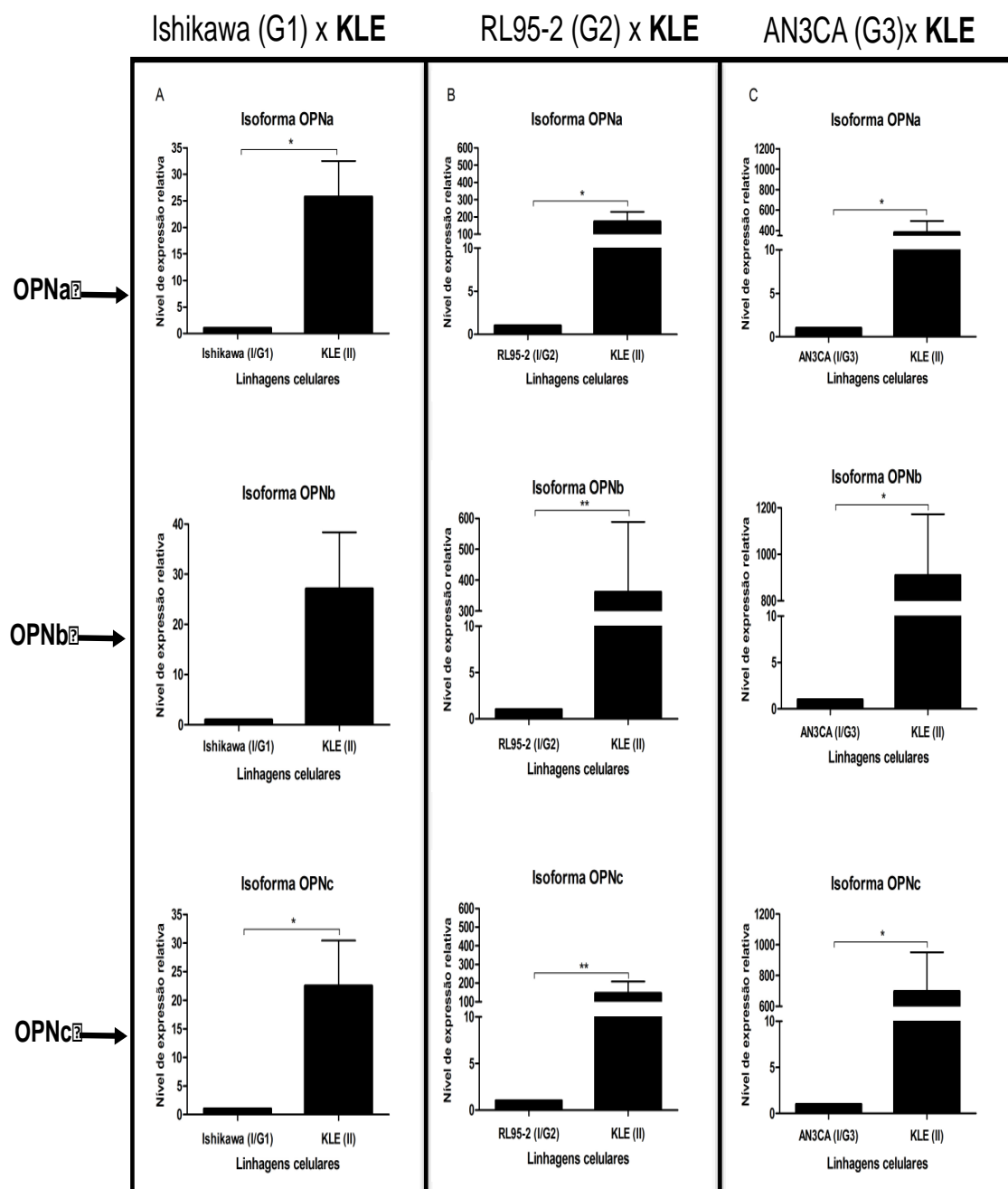


Figura 6.2 - Nível de expressão relativa das variantes de *splicing* da OPN na linhagem celular representativa dos tumores do Tipo II, em comparação com as linhagens celulares de CE do Tipo I com diferentes graus histopatológicos. O nível de expressão relativa (NER) das diferentes isoformas nas linhagens estudadas foi obtido utilizando a linhagem celular Ishikawa (Tipo I/G1) ou RL95-2 (Tipo I/G2) ou AN3CA (Tipo I/G3) como referência e o GAPDH foi usado como gene constitutivo. As colunas (A) (B) e (C) comparam o NER da OPNa, OPNb e OPNc na linhagem celular representativa dos tumores do Tipo II (KLE), com as linhagens celulares representativas dos tumores do Tipo I G1 (Ishikawa), G2 (RL95-2) e G3 (AN3CA), respectivamente. G1: grau histopatológico 1, G2: grau histopatológico 2, G3: grau histopatológico 3. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

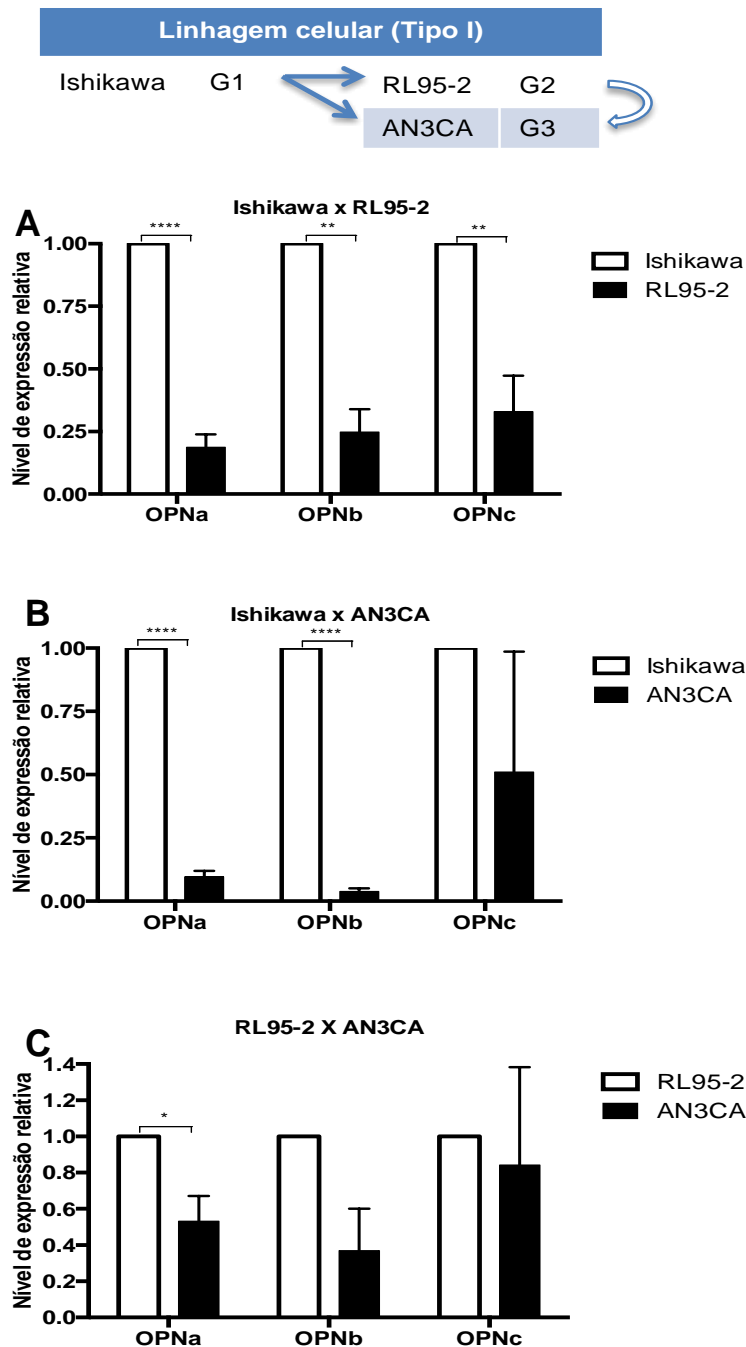


Figura 6.3 - Nível de expressão relativa das isoformas da OPN nas linhagens celulares tumorais Ishikawa, RL95-2, AN3CA. O nível de expressão relativa da OPNa, OPNb e OPNc nas linhagens celulares tumorais Ishikawa, RL95-2 e AN3CA representativas dos tumores do Tipo I, respectivamente de graus histopatológicos 1, 2 e 3 foram comparados entre si. Para isso, o ΔC_t das três isoformas da OPN na linhagem celular com menor grau histopatológico foram utilizados como referência. O GAPDH foi usado como gene constitutivo. (A) Comparação do NER da OPNa, OPNb e OPNc entre a linhagem celular tumoral Ishikawa e RL95-2, (B) Comparação do NER da OPNa, OPNb e OPNc entre a linhagem celular tumoral Ishikawa e AN3CA, (C) Comparação do NER da OPNa, OPNb e OPNc entre a linhagem celular tumoral RL95-2 e AN3CA. Acima demonstramos o grau histopatológico de cada uma das linhagens celulares representativas dos tumores do Tipo 1 de endométrio. As setas representam como as distintas linhagens celulares foram comparadas entre si. G1: grau histopatológico 1, G2: grau histopatológico 2, G3: grau histopatológico 3. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Demonstramos que as OPN-SI são expressas na linhagem não tumoral de endométrio E6/E7/TERT, bem como nas linhagens de CE. Nessas linhagens, o nível de expressão da OPNa mostrou-se maior que o da OPNb e da OPNc. Especificamente nas linhagens tumorais, a KLE apresentou nível de expressão das OPN-SI maior que as linhagens celulares Ishikawa, RL95-2 e AN3CA. Dentre as linhagens representativas dos tumores do Tipo I o nível de expressão das OPN-SI é maior nas linhagens com GH mais diferenciado.

6.2 Análise da expressão das variantes de *splicing* do PTEN em linhagens celulares tumorais e não tumorais do endométrio

Uma vez que foi previamente demonstrado que a expressão da OPN relaciona-se com o status do PTEN e modula sua atividade (KIM et al., 2005; SHAO et al., 2007), o passo seguinte de nosso estudo foi de avaliar o perfil de expressão das variantes do PTEN nas mesmas linhagens celulares. Como primeiro passo para caracterização do perfil de expressão transcricional das isoformas do PTEN em linhagens celulares de endométrio, avaliamos o perfil de amplificação das nove isoformas do PTEN por meio de ensaios de PCR em tempo real. O PTEN-FL, bem como as oito variantes de *splicing* adicionais são expressas nas linhagens tumorais e nas não tumorais de endométrio E6/E7/TERT e EM42. Todas as linhagens celulares de endométrio exibem padrão de expressão semelhante entre elas, em que a variante completa, PTEN-FL é significativamente mais expressa que as demais isoformas. Ademais, a variante de *splicing* Del E6 é a segunda isoforma de expressão predominante (Figura 6.4).

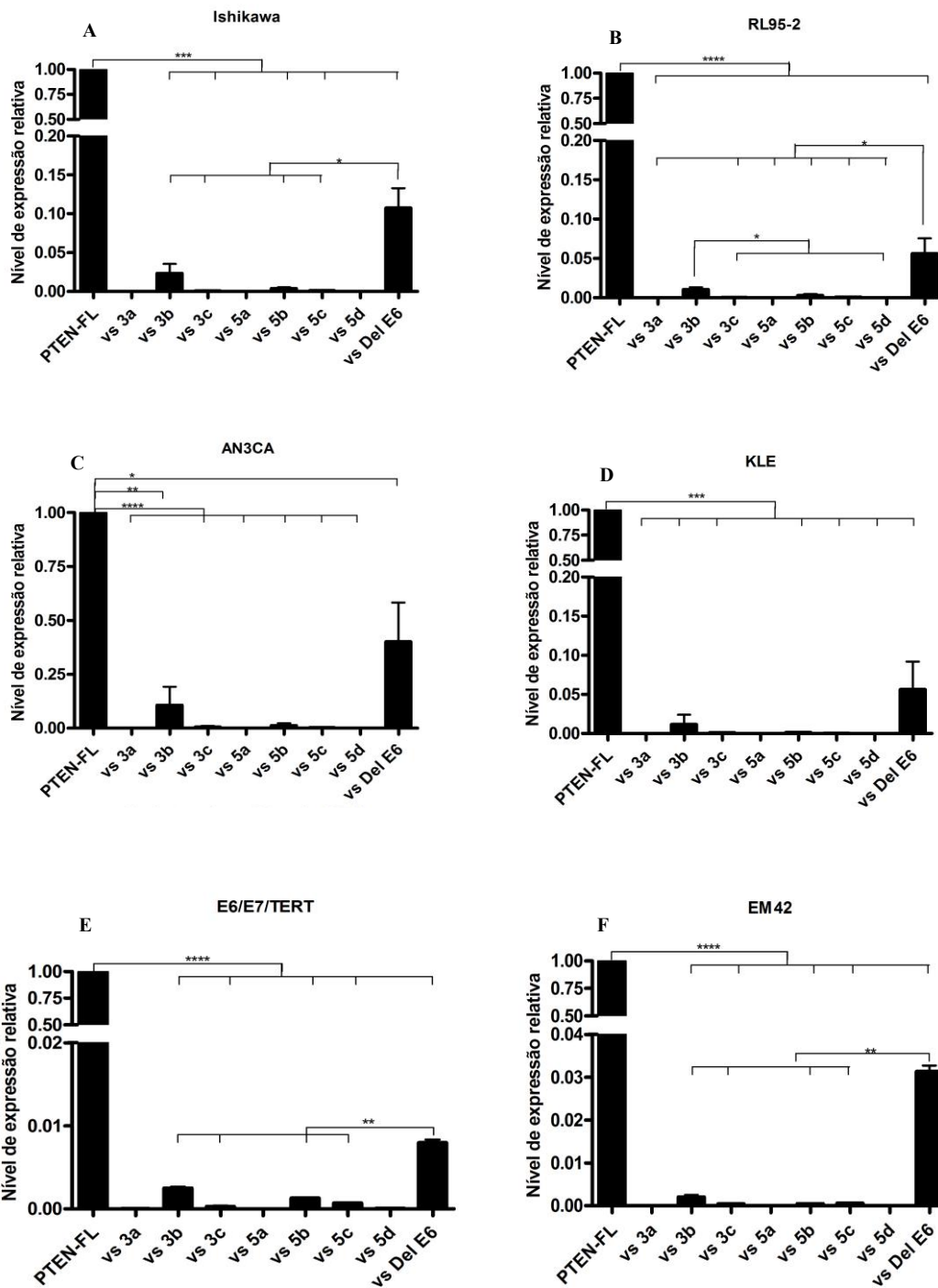


Figura 6.4 - Nível de expressão relativa das variantes de *splicing* do PTEN nas linhagens celulares de endométrio. O nível de expressão relativa das diferentes isoformas nas linhagens estudadas foi obtido utilizando o PTEN-FL como referência. O GAPDH foi usado como gene constitutivo. (A) Ishikawa, (B) RL95-2, (C) AN3CA, (D) KLE, (E) E6/E7/TERT, (F) EM42. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Visando ratificar a amplificação das PTEN-SI com menor nível de expressão, realizamos a eletroforese de produtos de amplificação das isoformas do PTEN em gel de agarose 2% (Figura 6.5) e demonstramos em tabelas o valor de Fold, dos três experimentos, de cada PTEN-SI em cada linhagem celular estudada (Tabelas 6.1 e 6.2).

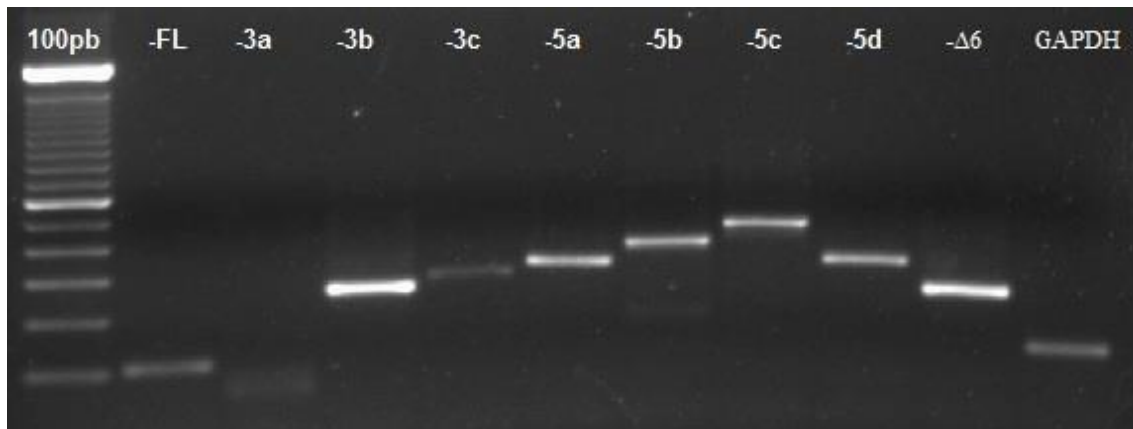


Figura 6.5-Análise do perfil eletroforético de produtos de amplificação das isoformas do PTEN na linhagem celular EM42 em gel de agarose 2%. São demonstrados os produtos de amplificação das nove isoformas do PTEN (-FL, -3a, -3b, -3c, -5a, -5b, -5c, -5d, -Δ6) utilizando pares de oligonucleotídeos isoforma específicos e também o produto de amplificação do gene GAPDH, utilizado como gene constitutivo. Padrão de peso molecular de 100pb.

Tabela 6.1 -Valores de Fold das PTEN-SI com menor nível de expressão, nas linhagens não tumorais de endométrio.

A. Linhagem celular E6/E7/TERT			
PTEN-SI	Nível de expressão relativa		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
VS-3a	0,000102577	0,000004	0,000003
VS-3b	0,002797	0,002226	0,002495
VS-3c	0,000495	0,000149	0,000272
VS-5a	0,000003	0,000005	0,000003
VS-5b	0,001376	0,001247	0,00131
VS-5c	0,000574	0,00082	0,000686
VS-5d	0,000003	0,000217963	0,000003

B. Linhagem celular EM42			
PTEN-SI	Nível de expressão relativa		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
VS-3a	0,000004	0,000008	0,000004
VS-3b	0,001274	0,002866	0,001911
VS-3c	0,000376	0,000533	0,000306
VS-5a	0,000008	0,000006	0,000126
VS-5b	0,000441	0,00045	0,000445
VS-5c	0,000512	0,000606	0,000557
VS-5d	0,000004	0,000008	0,000004

As Tabelas A e B demonstram o nível de expressão relativa das PTEN-SI, excetuando a PTEN-FL e a Del E6, nas linhagens celulares E6/E7/TERT e EM42, respectivamente.

Tabela 6.2- Valores de Fold das PTEN-SI com menor nível de expressão, nas linhagens tumorais de endométrio

A. Linhagem celular Ishikawa			
PTEN-SI	Nível de expressão relativa		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
VS-3a	0,0000064	0,0000028	0,0000054
VS-3b	0,0155634	0,0375428	0,0162749
VS-3c	0,0016209	0,0001821	0,0006822
VS-5a	0,000005	0,0000073	0,0000076
VS-5b	0,0053288	0,0023926	0,0038883
VS-5c	0,0007565	0,0016142	0,0007943
VS-5d	0,0000031	0,0000076	0,0000085

B. Linhagem celular RL95-2			
PTEN-SI	Nível de expressão relativa		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
VS-3a	0,0000024	0,0000034	0,0000042
VS-3b	0,0076438	0,0137713	0,0096194
VS-3c	0,0003511	0,0002476	0,0002105
VS-5a	0,0000045	0,0000048	0,0000018
VS-5b	0,0051873	0,0020514	0,0014737
VS-5c	0,0007426	0,0012631	0,0002113
VS-5d	0,0000081	0,0000052	0,0000008

C. Linhagem celular AN3CA			
PTEN-SI	Nível de expressão relativa		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
VS-3a	0,000424	0,002913	0,000508
VS-3b	0,060533	0,205937	0,055382
VS-3c	0,002787	0,010791	0,001691
VS-5a	0,0000085	0,000221	0,0000044
VS-5b	0,010906	0,024081	0,004375
VS-5c	0,003133	0,002762	0,002345
VS-5d	0,000717	0,00111	0,000153

D. Linhagem celular KLE			
PTEN-SI	Nível de expressão relativa		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
VS-3a	0,000001	0,0000013	0,0000004
VS-3b	0,0051784	0,025988	0,0033311
VS-3c	0,0004408	0,0012684	0,0016369
VS-5a	0,000001	0,0000013	0,0000004
VS-5b	0,0013931	0,0016558	0,000766
VS-5c	0,0008942	0,0002267	0,0000058
VS-5d	0,0000036	0,000003	0,000002

As tabelas A, B, C e D demonstram o nível de expressão relativa das PTEN-SI, excetuando a PTEN-FL e a Del E6, nas linhagens celulares Ishikawa, RL95-2, AN3CA e KLE, respectivamente.

Ao comparar o nível de expressão transcricional das distintas variantes do PTEN dentre as diversas linhagens de endométrio, observamos que a expressão das variantes PTEN-FL, da VS-5a, VS-5c é menor nas linhagens tumorais de CE, que nas não tumorais E6/E7/TERT e EM42. Ressalta-se que o nível de expressão da VS-5c mostrou-se significativamente menor nas quatro linhagens tumorais em relação à linhagem não tumoral E6/E7/TERT ($p < 0,05$), mas não em relação à linhagem EM42 (Figura 6.6).

Em seguida, comparamos a expressão das variantes PTEN-FL e VS-Del E6, que se apresentam como as isoformas de expressão predominante em linhagens de endométrio, entre linhagens do Tipo I e II. Observamos maior expressão das variantes PTEN-FL e VS-Del-E6 na linhagem do Tipo II (KLE) que nas linhagens celulares representativas de CE do Tipo I G1 e G2 (Ishikawa e RL95-2) ($p = 0,22$ e $p = 0,51$ para a PTEN-FL; $p = 0,22$ e $p = 0,71$ para a VS-Del E6). A linhagem KLE, apresenta maior expressão da PTEN-FL que a linhagem AN3CA (Tipo I/G3) ($p = 0,22$). Os níveis transcripcionais da variante VS-Del E6 são semelhantes entre a linhagem do Tipo II KLE e a linhagem do Tipo I/G3 AN3CA (Figura 6.7).

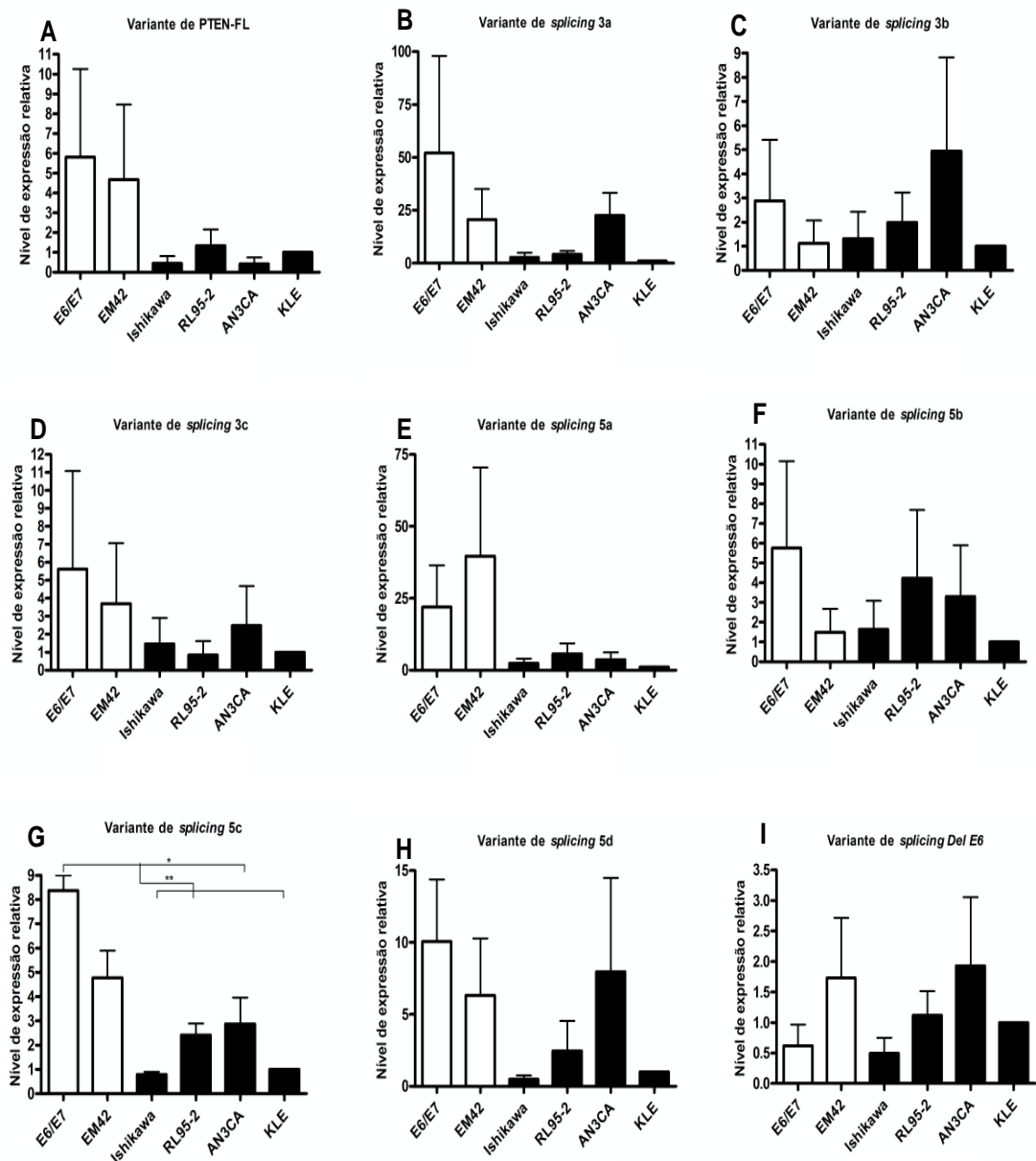
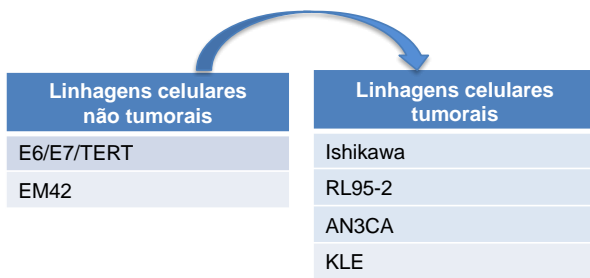


Figura 6.6 - Nível de expressão das isoformas de *splicing* do PTEN nas linhagens celulares de endométrio. O nível de expressão relativa das diferentes isoformas nas linhagens estudadas foi obtido utilizando a linhagem celular KLE como referência. O GAPDH foi usado como gene constitutivo. Acima demonstramos a comparação realizada entre as linhagens celulares não tumorais (E6/E7/TERT e EM42), e as linhagens tumorais de endométrio (Ishikawa, RL-952, AN3CA e KLE) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

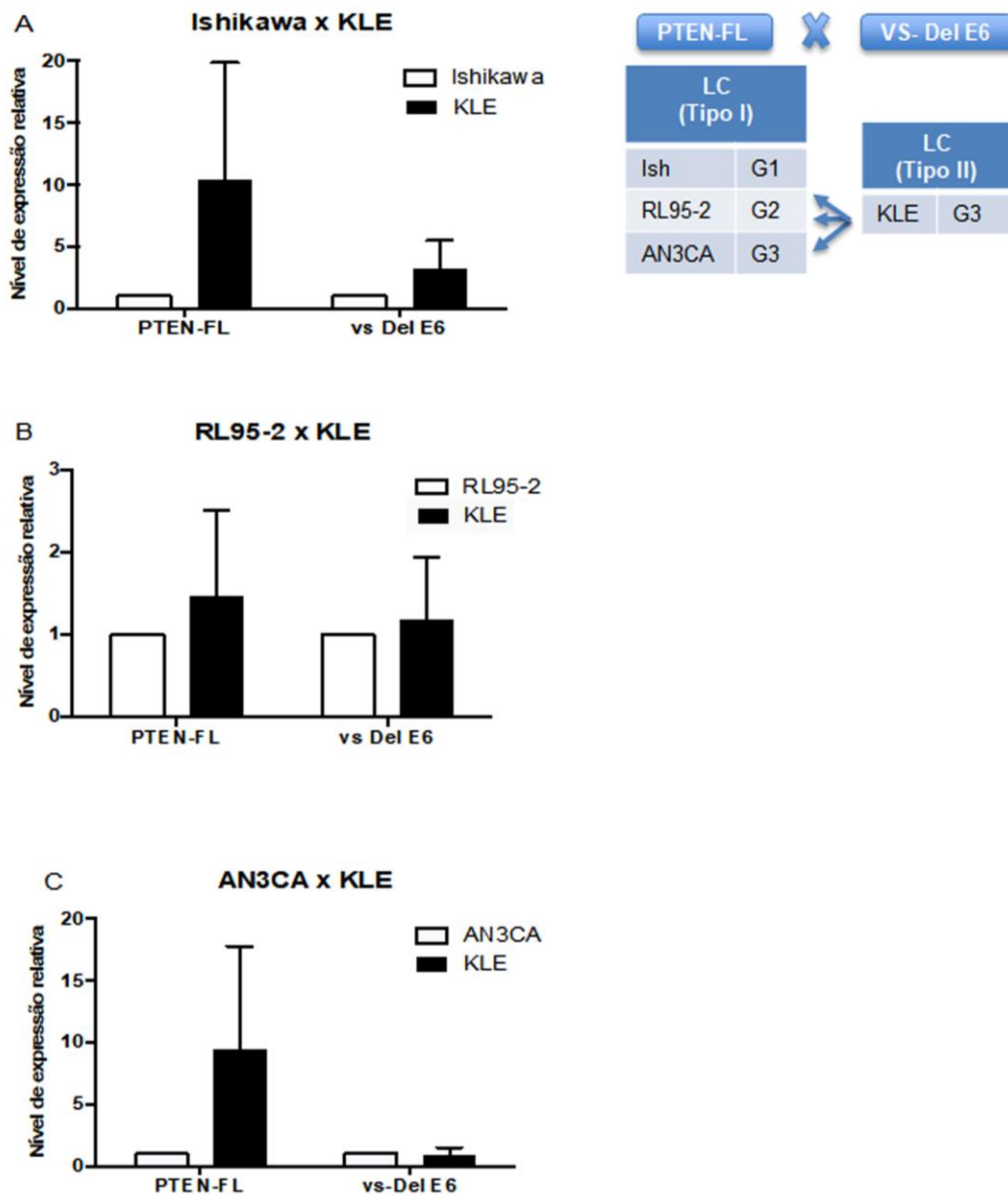


Figura 6.7 - Nível de expressão das VS-PTEN-FL e -Del E6 nas linhagens celulares tumorais de endométrio. O nível de expressão relativa das VS-PTEN-FL e -Del E6 nas linhagens celulares tumorais Ishikawa, RL95-2 e AN3CA representativas dos tumores do Tipo I, respectivamente de graus histopatológicos 1, 2 e 3 foram comparados com o nível de expressão dessas isoformas na linhagem celular KLE, representativa dos tumores do Tipo II. Para isso, o ΔC_t do PTEN-FL ou da VS-Del E6 nas linhagens celulares Ishikawa, RL95-2 e AN3CA, foram utilizados para o cálculo do nível de expressão relativa dessa mesma isoforma e comparado com o nível de expressão da KLE. O GAPDH foi usado como gene constitutivo. À direita demonstramos o grau histopatológico de cada uma das linhagens celulares de CE. As setas representam como as distintas linhagens celulares foram comparadas entre si. LC: linhagem celular. G1: grau histopatológico 1, G2: grau histopatológico 2, G3: grau histopatológico 3.

Posteriormente, comparamos o nível de expressão dessas isoformas entre as linhagens celulares representativas dos tumores do Tipo I do endométrio. Encontramos que o nível de expressão do PTEN-FL, é significativamente maior na linhagem celular RL95-2 (Tipo I/G2) quando comparado com a linhagem celular AN3CA (Tipo I/G3). Entretanto, a expressão do PTEN-FL não foi diferente entre as linhagens Ishikawa (Tipo I/G1) e as linhagens do Tipo I/G2 ($p=0,11$) e do Tipo I/G3 ($p=0,71$). Além disso, a VS-Del E6 mostrou-se mais expressa nas linhagens de maior grau histopatológico quando comparadas com a linhagem Ishikawa (Tipo I/G1), embora não haja diferença estatisticamente significativa entre todas essas comparações. O nível de expressão da VS-Del E6 mostrou-se maior na linhagem celular AN3CA (Tipo I/G3) que nas linhagens celulares RL95-2 (Tipo I/G2) ($p=0,31$) e Ishikawa (Tipo I/G1) ($p=0,03$) e maior na linhagem celular do Tipo I/G2 que na linhagem celular do Tipo I/G1 ($p=0,06$) (Figura 6.8).

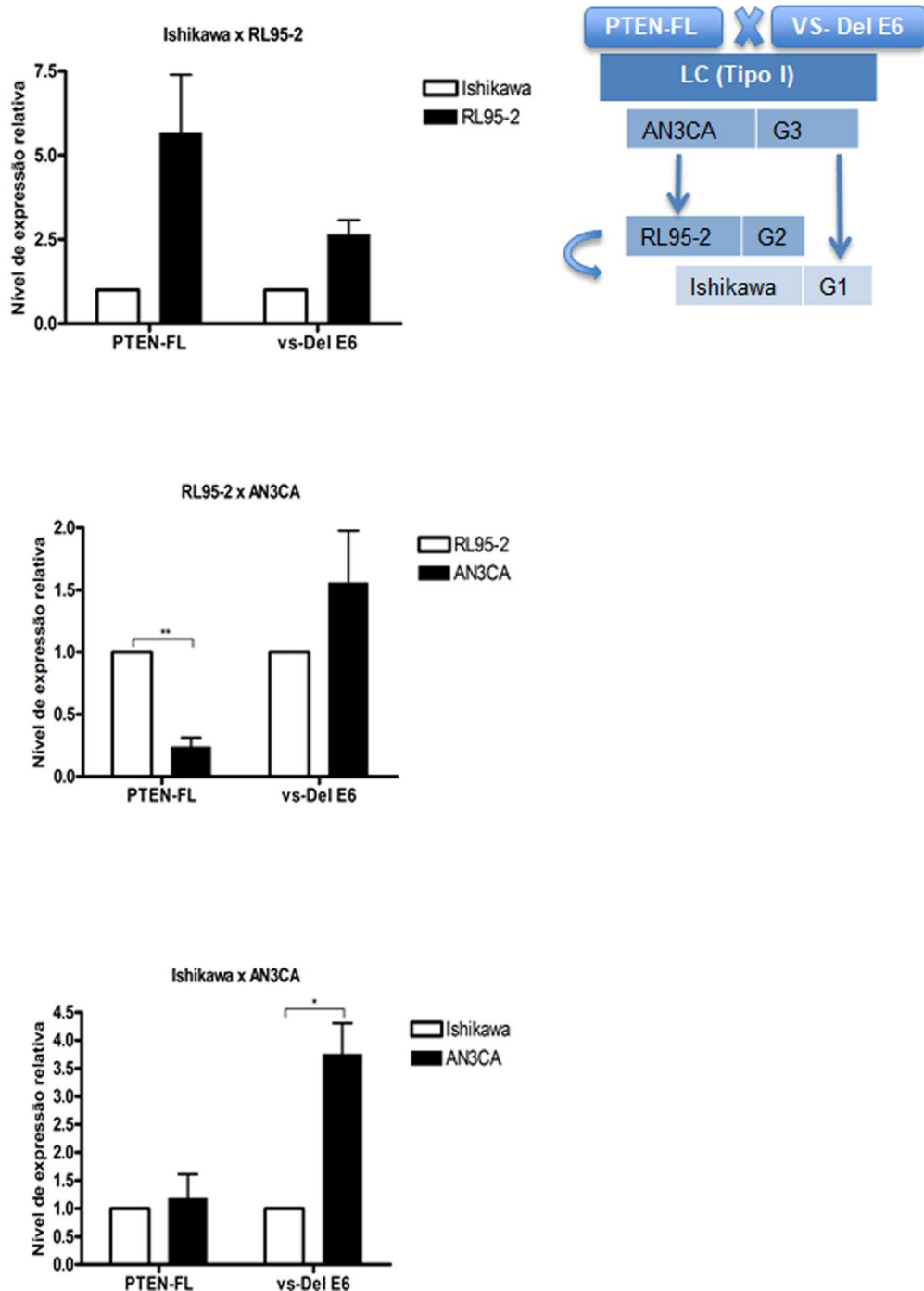


Figura 6.8 - Nível de expressão das VS-PTEN-FL e -Del E6 nas linhagens celulares tumorais Ishikawa, RL95-2, AN3CA. O nível de expressão relativa das VS-PTEN-FL e -Del E6 nas linhagens celulares tumorais Ishikawa, RL95-2 e AN3CA representativas dos tumores do Tipo I, respectivamente de graus histopatológicos 1, 2 e 3 foram comparados entre si. Para isso, o ΔC_t do PTEN-FL ou da VS-Del E6 nas linhagens celulares Ishikawa e RL95-2 foram utilizados como referência. O GAPDH foi usado como gene constitutivo. A direita demonstramos o grau histopatológico de cada uma das linhagens celulares representativas dos tumores do Tipo I, de CE. As setas representam como as distintas linhagens celulares foram comparadas entre si. LC: linhagem celular, G1: grau histopatológico 1, G2: grau histopatológico 2, G3: grau histopatológico 3, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6.3 Expressão protéica das isoformas completas da OPN e do PTEN e da via PI3K

Objetivando avaliar o perfil de expressão protéico da OPN, realizamos ensaios de imunoblot com o anticorpo O17, o qual reconhece a OPN total (reunião de todas as isoformas, não distinguindo as isoformas da OPN). A OPN total apresenta-se expressa nas linhagens não tumorais E6/E7/TERT e EM42, bem como nas linhagens tumorais Ishikawa, RL-95-2, AN3CA e KLE (Figura 6.9).

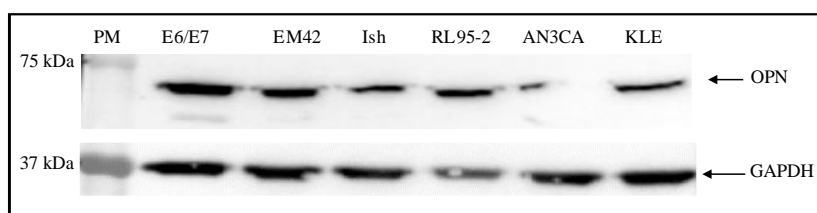


Figura 6.9 - Análise da expressão protéica da OPN total por imunoblot em linhagens de endométrio. A expressão protéica endógena da OPN foi analisada utilizando 60µg de cada extrato protéico e um anticorpo específico para a OPN, o O17. A expressão do GAPDH foi utilizada como controle constitutivo endógeno. Ensaio único.

Com a finalidade de avaliar a expressão protéica do PTEN, utilizamos o anticorpo monoclonal do PTEN, o qual reconhece a região carboxi-terminal dessa proteína. A expressão da proteína PTEN-FL mostrou-se expressa em ambas as linhagens não tumorais de endométrio (E6/E7/TERT e EM42), mas não nas linhagens celulares tumorais (Figura 6.10). Visando melhor compreender a via de PI3K, na qual a proteína PTEN está envolvida, analisamos a expressão de AKT e AKT fosforilada (pAKT) com anticorpos específicos. As linhagens tumorais, assim como as não tumorais de endométrio, em nível protéico, expressam AKT. Entretanto, o pAKT está exclusivamente expressa nas linhagens tumorais e principalmente na linhagem Ishikawa (Figura 6.10).

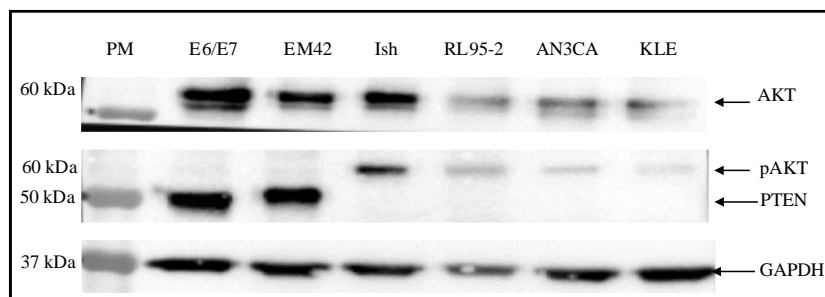


Figura 6.10 - Análise da expressão protéica do AKT total, pAKT e PTEN-FL por imunoblot em linhagens de endométrio. A expressão protéica endógena do AKT, pAKT e PTEN-FL foi analisada utilizando 47µg de cada extrato protéico. A expressão protéica do PTEN, foi analisada utilizando o anticorpo monoclonal do PTEN, o qual reconhece a região carboxi terminal da proteína. A expressão do GAPDH foi utilizada como controle constitutivo endógeno. Estes resultados são representativos de 4 experimentos independentes para o anticorpo monoclonal anti-PTEN, e 2 experimentos independentes com os anticorpos anti-AKT e anti-pAKT.

6.4 Resposta celular ao tratamento com extratos de tomate contendo licopeno

Com base no perfil de expressão observado para as distintas isoformas do PTEN e com o objetivo de ter indício do potencial papel funcional destas variantes, avaliamos seus perfis de expressão em resposta ao tratamento com distintos extratos de tomate contendo licopeno, agente com conhecida ação citotóxica sobre células tumorais de endométrio (NAHUM et al., 2001; JEONG et al., 2009). Utilizamos a linhagem celular tumoral KLE, uma linhagem celular de fácil cultivo, com o meio de cultura acessível e comumente utilizada nos ensaios de CE. Avaliamos a viabilidade celular da linhagem celular KLE ao tratamento de extratos de tomate contendo licopeno.

Uma vez que extratos contendo licopeno também apresentam função no bloqueio da fosforilação de AKT e atividade citotóxica (TANG *et al.*, 2008; JEONG *et al.*, 2009), avaliamos a viabilidade celular da linhagem celular KLE mediante ao tratamento de extratos de tomate contendo licopeno. Esta abordagem também visou, através da avaliação do perfil de expressão das variantes do PTEN, propor seus papéis biológicos neste tipo tumoral.

Objetivando eleger o extrato de tomate a ser utilizado nos ensaios de citotoxicidade bem como sua concentração ideal, avaliamos a viabilidade celular da linhagem KLE. Fizemos análise colorimétrica através de ensaio de MTT, por 48, 72 e 96 h após o tratamento com diversos extratos de tomate contendo licopeno. O tratamento com distintos extratos de tomate (molho de tomate, polpa de tomate, extrato de tomate e catchup) promoveu redução na viabilidade celular da linhagem celular KLE. Especialmente o uso de 2,5 mg/ml de extrato obtido a partir de molho de tomate promoveu uma inibição de 50% na viabilidade celular, 96 h após o tratamento (Figura 6.11). Por esta razão, o extrato de molho de tomate foi

selecionado para os ensaios seguintes, que objetivam avaliar a expressão das variantes de *splicing* do PTEN em resposta à ação citotóxica de extratos de tomate contendo licopeno.

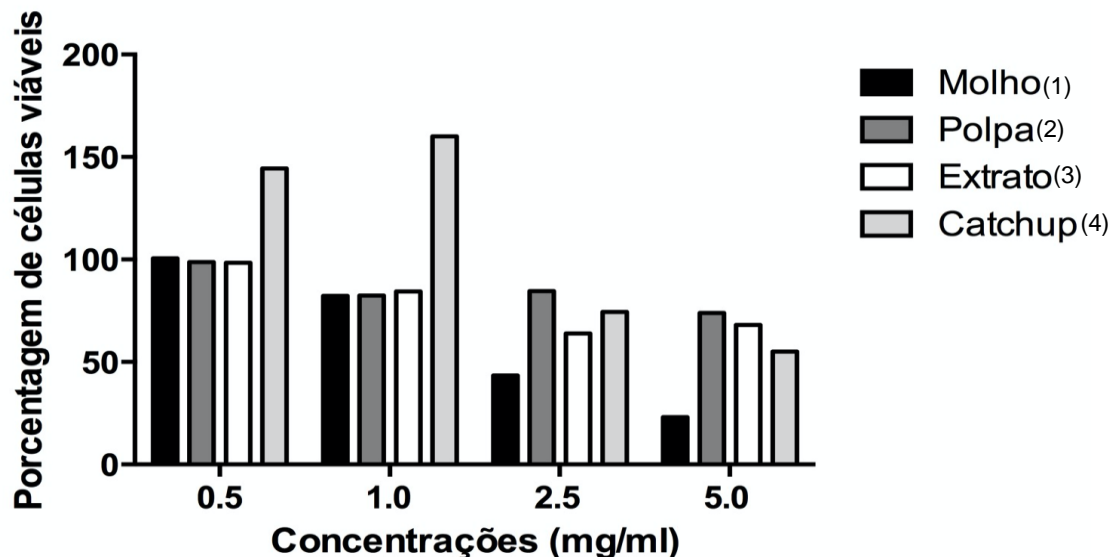


Figura 6.11 - Ensaio colorimétrico com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolio (MTT). Nesse ensaio, 1×10^5 células KLE foram plaqueadas por poço, em uma placa de 96 poços. O tratamento foi feito durante 96 h com 0,5, 1, 2,5 ou 5 mg/ml de extratos de tomate (molho, polpa, extrato e catchup) contendo licopeno. Os resultados apresentados foram realizados em quadruplicata em 3 ensaios independentes. No gráfico foram plotados as porcentagens de inibição da viabilidade celular em relação ao controle não tratado. (1): extrato obtido a partir de molho de tomate, (2): extrato obtido a partir de polpa de tomate, (3): extrato obtido a partir de extrato de tomate, (4): extrato obtido a partir de catchup.

6.5 Expressão de isoformas do PTEN em resposta ao tratamento com extrato de molho de tomate contendo licopeno

Uma vez que o extrato de molho de tomate promoveu diminuição da viabilidade celular nas linhagens de endométrio e que o PTEN é um conhecido gene supressor tumoral envolvido na carcinogênese do CE, avaliamos em seguida se tratamento com este extrato seria capaz de modular a expressão de isoformas do PTEN em células de CE. Analisamos a expressão das variantes de *splicing* do PTEN que apresentaram com maior nível de expressão nas linhagens de CE (PTEN-FL, da VS-DelE6 e da VS-3b), utilizando 5 mg/ml de extrato obtido a partir de molho de tomate. Nessa condição experimental, o nível de expressão das isoformas PTEN-FL, da VS-DelE6 e da VS-3b mostraram-se maiores na linhagem celular tumoral tratada com o extrato de molho de tomate do que aquelas tratadas com a suspensão

controle. Especialmente o nível de expressão isoforma da VS-3b, mostrou-se significativamente maior na linhagem celular tumoral tratada (Figura 6.12).

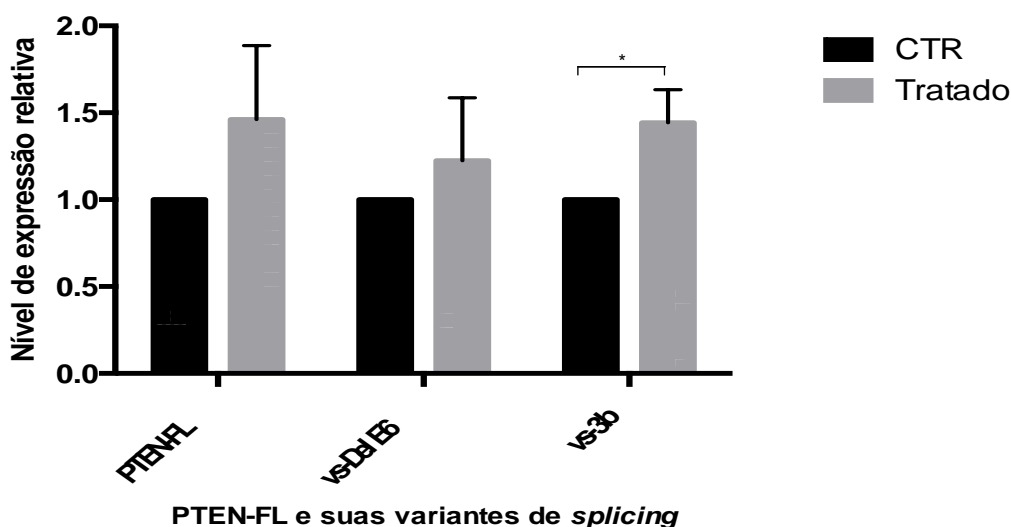


Figura 6.12 - Nível de expressão das isoformas do PTEN (VS-PTEN-FL, VS-Del E6 e VS-3b) na linhagem celular tumoral KLE tratada com extrato de molho de tomate. O nível de expressão relativa das VS-PTEN-FL, -Del E6 e -3b na linhagem celular tumoral KLE, representativa dos tumores do Tipo II, tratada com 5 mg/ml de extrato obtido a partir de molho de tomate foi comparada com as amostras controle, tratadas apenas com a solução controle. Para isso, o ΔC_T do PTEN-FL ou da VS-Del E6 ou da VS-3b na linhagem celular KLE não tratada, foram utilizados como referência. O GAPDH foi usado como gene constitutivo. * $p < 0,05$.

6.6 Expressão protéica da via PI3K em resposta ao tratamento com extrato de tomate contendo licopeno

Objetivando avaliar a expressão da via de PI3K, na qual a proteína PTEN está envolvida, em resposta ao tratamento com extrato de molho de tomate, analisamos a expressão de AKT e AKT fosforilada (pAKT) com anticorpos específicos. A linhagem tumoral KLE tratada com o extrato de molho de tomate contendo licopeno, bem como as células controle, expressam AKT e pAKT. Interessantemente, a expressão pAKT está discretamente menos expressa na linhagem tumoral submetida ao tratamento com o extrato de molho de tomate (Figura 6.13).

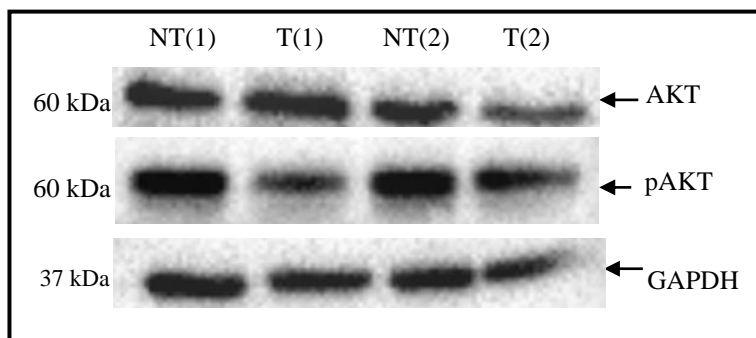


Figura 6.13- Análise da expressão protéica do AKT total, pAKT e PTEN-FL por imunoblot em linhagem tumoral de endométrio tratada com extrato de molho de tomate. A expressão protéica endógena do AKT, pAKT e PTEN-FL foi analisada utilizando 70 μ g do extrato protéico da linhagem celular KLE. A expressão protéica do PTEN, foi analisada utilizando o anticorpo monoclonal do PTEN, o qual reconhece a região carboxi terminal da proteína. A expressão do GAPDH foi utilizada como controle constitutivo endógeno. NT: não tratada, amostra controle, tratada apenas com solução diluente, T: tratada. Experimento em duplicata.

Assim, o tratamento da linhagem celular tumoral KLE com o extrato obtido a partir de molho de tomate promove diminuição da viabilidade celular e maior nível de expressão das isoforma predominantes do PTEN. O perfil de expressão protéica evidencia que o licopeno atua na via de PI3K diminuindo a expressão de pAKT.

7. DISCUSSÃO

O CE é um tumor com incidência em ascensão no nosso meio e o tratamento dos estadiamentos avançados representa um desafio clínico. A melhor caracterização dos mecanismos de carcinogênese e progressão dessa neoplasia, pode contribuir no desenvolvimento de tratamentos mais efetivos e representar ganho de sobrevida.

Diversos genes demonstraram estar envolvidos na carcinogênese do CE (PRAT et al., 2007; DOLL et al., 2008), dentre eles a OPN. A OPN, uma proteína encontrada em diversos tipos celulares, teve sua expressão demonstrada no tecido endometrial normal, nas hiperplasias endometriais, nas células tumorais do adenocarcinoma de endométrio e em macrófagos do tecido tumoral endometrial (BROWN et al., 1994; BRIESE et al., 2006). Mostrou-se envolvida no ciclo celular, na promoção da angiogênese, proliferação, migração e invasão celular (DU et al., 2009; LI et al., 2015; RAMACHANDRAN et al., 2013). No modelo tumoral de CE, esses estudos referem-se a isoforma completa da OPN. Entretanto, em diversos tipos tumorais, que não o CE, as isoformas de *splicing* da OPN foram descritas e apresentam papel tecido e tumor-específicos (HE; MIRZA; WEBER, 2006; MIRZA et al., 2008; IVANOV et al., 2009; SULLIVAN et al., 2009; BLASBERG et al., 2010; TILLI et al., 2011; SAROSIEK et al., 2014; SIDDIQUI et al., 2014; LIN et al., 2014; ZDUNIAK et al., 2015; BOGUSLAWSKA et al., 2016; FERREIRA et al., 2016; NAKAMURA et al., 2016; SUN et al., 2016). Estudos tem mostrado que a expressão da OPN se relaciona com o *status* do PTEN e modula sua atividade (KIM et al., 2005; SHAO et al., 2007). No modelo colorretal, a OPN é mais expressa em camundongos heterozigotos para o PTEN, os quais apresentam adenomas de alto grau e adenocarcinomas em maior número e tamanho, em relação aos adenomas colônicos de baixo grau do PTEN-WT (SHAO et al., 2007). No modelo de glioma humano, a motilidade celular induzida pelo ácido hialurônico requer a expressão da OPN, a qual é inibida pelo PTEN, modulando assim a atividade celular (KIM et al., 2005). Entretanto, as isoformas do PTEN no câncer, foram analisadas exclusivamente no modelo tumoral renal e no modelo tumoral e não tumoral de mama (BREUKSCH et al., 2018).

Neste cenário, este trabalho objetivou avaliar a expressão de isoformas da OPN e do PTEN no modelo tumoral de endométrio. Além disso, como forma de ter indícios do papel das isoformas do PTEN neste tumor, avaliamos o perfil de expressão destas isoformas mediante o efeito citotóxico de extratos de tomate contendo licopeno. Utilizamos linhagens celulares de endométrio normal e tumoral e descrevemos, pela primeira vez, a expressão de

isoformas de *splicing* da OPN e do PTEN em linhagens celulares de endométrio. Mostramos que todas as linhagens tumorais e a não-tumoral E6/E7/TERT de endométrio expressam as três isoformas da OPN, com distintos níveis de expressão. A OPNa, é a variante com maior nível de expressão em cada uma das linhagens. Igualmente, no mesotelioma, a OPNa é a isoforma com maior nível de expressão no tecido tumoral, a qual se apresenta aumentada após a recidiva do tumor e *in vitro*, promove migração e invasão celular (IVANOV et al., 2009). Entretanto, no câncer de mama, a expressão da OPNa é semelhante à dos tecidos adjacentes ao tumor, bem como aos tecidos normais analisados (MIRZA et al., 2008). No carcinoma pulmonar não pequenas células, esta mesma isoforma aumenta a quantidade de túbulos endoteliais e duplica a expressão do VEGF (BLASBERG et al., 2010). Já no modelo de carcinoma de tireóide, nosso grupo demonstrou que a OPNa está expressa no carcinoma papilar clássico (CPT_c), no carcinoma folicular (CFT), na variante folicular do carcinoma papilar (CPT_{vf}) e no tecido tireoideano adjacente. A expressão da OPNa, no CPT_c, mostrou-se significativamente relacionada com um maior tamanho tumoral, com a extensão extra-tireoideana, com a presença de invasão vascular e com a mutação de *BRAF*^{V600E} e aumenta a taxa de proliferação, migração, invasão e a atividade das MMP-2 e -9 (FERREIRA et al., 2016). Entretanto, no câncer de próstata, encontramos que a superexpressão da OPNa promove menor crescimento celular do que aquele da OPNb e OPNc (NAKAMURA et al., 2016). Nosso grupo também encontrou que a OPNa é expressa no carcinoma epitelial do ovário, bem como nos tumores "borderline" do ovário além dos tumores benignos e do tecido ovariano normal, embora não apresente características de biomarcador neste modelo. Assim como no carcinoma pulmonar não pequenas células, a superexpressão da OPNa, no modelo ovariano, promoveu aumento do VEGF, um marcador de progressão tumoral (TILLI et al., 2011). Contrariamente, a expressão OPNa está ausente nos indivíduos com adenocarcinoma de pâncreas ou com neoplasia mucinosa papilar intraductal, assim como nos voluntários saudáveis. (SAROSIEK et al., 2015). Já nos adenocarcinomas de esôfago, as cinco variantes de *splicing* da OPN já descritas são co-superexpressas na maioria desses tumores. Nesses tumores, a OPNa e OPNb atuam através da via de sinalização das integrinas e promovem aumento da migração celular. Entretanto, a OPNc é independente dessa via e leva a diminuição da migração (LIN et al., 2015).

Mais recentemente, em linhagens celulares de CE nosso grupo demonstrou que as VS OPN4 e OPN5 são expressas em níveis variados nas distintas linhagens celulares. A linhagem celular representativa de CE do Tipo I G1 apresenta maior nível de expressão da OPN4 em

relação a OPN5, e linhagens celulares representativas de CE Tipo I G3 apresentam padrão oposto de expressão (dados não publicados- monografia de bacharelado, Gabriela Ribeiro Silva, 2019). Observamos também as que diversas linhagens tumorais testadas expressam as três variantes da OPN, achado esse corroborado por outros autores como Mirza et al. (2008) no câncer de mama, Siddiqui et al. (2014) no adenocarcinoma de pâncreas e Lin et al. (2015) no câncer de esôfago. No modelo de câncer de pulmão, Sun et al. (2016) demonstraram que há inibição do crescimento celular da linhagem CL1-5, mas não da A549, quando tratadas com o meio condicionado da célula transfectada com o plasmídeo que contém clonado a OPNa. Além disso, a integrina β_3 é necessária para a inibição de crescimento promovida pela OPNa, a qual reduz a fosforilação de FAK, um efetor “downstream” da integrina. O nosso grupo também demonstrou que as três variantes de *splicing* da OPN são expressas no câncer de tireóide e no câncer de próstata (FERREIRA et al., 2016; NAKAMURA et al., 2016). Contrariamente, demonstramos que a expressão da OPNc está ausente no tecido ovariano normal e no tecido tumoral benigno do ovário (TILLI et al., 2011). A expressão dessa mesma variante de *splicing* está ausente no tecido de mama normal (ZDUNIAK et al., 2015). Em conjunto, esses dados sugerem que no câncer de ovário e no câncer de mama, mas não no modelo endometrial, a expressão da OPNc tem papel como biomarcador de diagnóstico. A superexpressão da OPNa no mesotelioma maligno e da OPNa e OPNb na recidiva do tumor demonstra uma possível modulação de uma VS sobre a outra promovendo um fenótipo mais agressivo (IVANOV et al., 2009). Conforme observado no presente estudo, dentre as VS da OPN com menor expressão, a OPNb e OPNc mostram-se diferencialmente expressas exclusivamente na linhagem celular não tumoral E6/E7/TERT. Assim, podemos especular se essas duas variantes de *splicing* poderiam modular a atividade da OPNa, contribuindo para o fenótipo não tumoral. A expressão diferencial da OPNb e OPNc poderia direcionar futuras abordagens no sentido de incluir a análise destas variantes para auxiliar na caracterização molecular do endométrio normal, o que poderia contribuir no conhecimento de mecanismos que envolvam a carcinogênese nesse tumor.

Exclusivamente entre as linhagens celulares tumorais, a KLE, linhagem celular representativa dos agressivos CE do Tipo II, que possui grau histopatológico 3 e não é dependente de estrogênio, expressa as três variantes da OPN em níveis mais elevados que as linhagens celulares representativas dos tumores do Tipo I, quer seja do G1, 2 ou 3. Esses achados podem sugerir mecanismos de carcinogênese distintos entre o CE do Tipo I e do Tipo II. Especificamente a OPNc, no câncer de mama, não se relaciona com o receptor de

estrogênio e progesterona. Ademais, a OPNc, mas não a OPN total se relaciona com o prognóstico e apresenta marcação preferencialmente nuclear (ZDUNIAK et al., 2015). Assim, no CE, ensaios funcionais poderiam auxiliar no esclarecimento das funções biológicas das distintas OPN-SI e especialmente no envolvimento da OPNc no desenvolvimento dos tumores do Tipo II, não estrogênio dependentes. Em linhagens celulares de CE, demonstramos também, que naquelas representativas de tumores do Tipo I, a expressão da OPNa, OPNb e OPNc é maior nos tumores mais diferenciados G1 do que naqueles de grau histopatológico 2 e 3. Entretanto, no câncer de mama, OPNc é um preditor do carcinoma G3 por aumentar do G1 para o G3 (MIRZA et al., 2008).

Mostramos no presente estudo que as VS OPNa, OPNb e OPNc estão expressas em linhagens celulares representativas de CE, achado esse que se assemelha à expressão dessas variantes de *splicing* no mesotelioma maligno, no carcinoma de esôfago, próstata, tireóide, epitelial de ovário e mama (MIRZA et al., 2008; IVANOV et al., 2009; TILLI et al., 2011; LIN et al., 2015; ZDUNIAK et al., 2015; FERREIRA et al., 2016; NAKAMURA et al., 2016). Neste tumor, a expressão das OPNc aumenta do G1 para o G3, porém, em linhagens celulares representativas de CE, as OPN-SI apresentam padrão oposto de expressão (MIRZA et al., 2008). A OPNa é a isoforma de *splicing* com maior nível de expressão em linhagens celulares representativas de endométrio tumoral, assim como no carcinoma pulmonar e no mesotelioma maligno (IVANOV et al., 2009; SUN et al., 2016). A expressão da OPNa, OPNb e OPNc na linhagem celular representativa de endométrio normal se assemelha ao peritônio normal, mas não ao tecido normal ovariano, mamário e pancreático onde a expressão da VS-OPNc, assim como no modelo tumoral pulmonar, está ausente (MIRZA et al., 2008; IVANOV et al., 2009; BLASBERG et al., 2010; TILLI et al., 2011; SIDDIQUI et al., 2014; ZDUNIAK et al., 2015). Assim, a OPNc, apresenta expressão tumor específica no tecido ovariano, mamário e pancreático, e constitui um biomarcador de diagnóstico nesses tecidos. No entanto, não observamos o mesmo no modelo endometrial. Observamos também que em linhagens celulares representativas de endométrio normal ocorre padrão de expressão oposto ao endotélio brônquico pulmonar e ao soro de indivíduos saudáveis, sem lesão pancreática e sem obesidade e/ou hipertensão, nos quais a OPNa, OPNb e OPNc não são expressas (BLASBERG et al., 2010; SAROSIEK et al., 2015).

No endométrio, não avaliamos o tecido inflamatório e nem as lesões precursoras do CE. Entretanto, no modelo pancreático, há ausência da expressão da OPNc na pancreatite, e da OPNa no adenocarcinoma e na neoplasia mucinosa pancreática intraductal (SIDDIQUI et

al., 2014; SAROIESK et al., 2015). Descrevemos pela primeira vez que a isoforma completa da OPN e sua variante com deleção no exón 5 são expressas em linhagens tumorais e não tumoral E6/E7/TERT de endométrio. Além disso, a VS OPNc encontra-se expressa na linhagem não tumoral E6/E7/TERT, bem como na linhagem tumoral Ishikawa, RL95-2 e KLE, além da AN3CA descrita por Hahne et al. (2013). Validar esses achados em amostras teciduais normais e tumorais de endométrio, bem como adicionar a avaliação das OPN-SI nas lesões precursoras do endométrio poderia auxiliar na melhor compreensão da biologia molecular desse tumor. Interessantemente, a VS OPNc apresenta funções antagônicas à da OPNa e à da OPNb, no mesotelioma maligno, no adenocarcinoma de pulmão não pequenas células e no carcinoma de esôfago. Entretanto, no modelo endometrial, não fizemos ensaios funcionais das OPN-SI, o que representa outra limitação desse trabalho. Assim, a realização de ensaios de migração, proliferação e invasão permitiriam a caracterização do papel funcional dessas OPN-SI no modelo endometrial.

Quanto à expressão das isoformas do PTEN, em nosso estudo observamos que em todas as linhagens avaliadas, quer sejam representativas de CE ou de endométrio normal, ocorre expressão das nove isoformas do PTEN analisadas. Igualmente, especificamente a PTEN-FL é amplamente expressa em diversos tecidos humanos normais como o cérebro, coração, rim, baço, fígado, leucócitos, musculatura intestinal, músculos, pulmão, próstata, testículo, ovário e na linhagem celular de mama, MCF-7. Além disso, as VS do PTEN, -3a, -3b, -3c, -5a, -5b, -5c e DelE6 mostraram-se expressas no endométrio normal, além do tumoral, mas a VS-3a e -5a não foram detectadas nos tecidos normais investigados. Interessantemente, a expressão da VS-3c é ausente no tecido tumoral de mama, sugerindo que a expressão dessa VS é tecido e tumor específico. A expressão da VS-3b mostrou-se ausente em 7 tecidos, mas a VS-5b encontra-se superexpressa em 9 desses casos, sugerindo possível modulação fina entre essas VS (AGRAWAL; ENG, 2006). No presente trabalho mostramos que a variante completa do PTEN também apresentou os maiores níveis de expressão em todas as linhagens representativas de CE bem como naquelas de endométrio normal. Contudo, na Síndrome de Cowden (SC) e na Síndrome Bannayan-Ritley-Ruvalcaba (SRRB), essa variante é mais expressa que nos indivíduos saudáveis sem mutação do PTEN (SARQUIS et al., 2006).

Em nosso estudo, a expressão das variantes de *splicing* com deleção no éxon 6 e a VS-3b são as duas variantes mais expressas, após a VS-Del E6, em todas as linhagens testadas. Assim, à luz do conhecimento atual, propomos um avanço nos dados já gerados pelo Atlas do

Genoma Humano (TCGA) (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2013). As VS_s PTEN-FL, -Del E6 e -3b seriam as PTEN-SI mais expressas em cada um dos quatro grupos tumorais, embora essa expressão seja rara no grupo mais agressivo. Uma vez que a OPNa é a isoforma mais expressa em cada uma das linhagens tumorais, é possível que o mesmo aconteça em cada um dos grupos do TCGA. Ademais, as três OPN-SI são mais expressas na linhagem celular KLE, representativa dos tumores do Tipo II, assim, é possível que a OPNa, OPNb e OPNc tenham maior expressão no grupo com alto número de cópias aberrantes (Figura 7.1). Alterações moleculares que possam auxiliar na classificação progressivamente mais individualizada do tumor favorece a uso de terapias direcionadas. O TCGA por exemplo, ao permitir classificar um tumor EI G3 como uma lesão do grupo POLE, de bom prognóstico, auxilia no direcionamento desse paciente ao controle em detrimento a realização de tratamento adjuvante (MURALI., SOSLOW., WEIGELT, 2014). Dado que as variantes vs-3a, vs-5a e vs-5d apresentam expressão semelhante e de menor nível de expressão dentre todas as isoformas do PTEN, nas linhagens celulares Ishikawa, RL95-2, AN3CA e KLE, é possível que ocorra perfil semelhante de expressão nos tumores do Tipo I e II de endométrio, abrindo perspectivas de que essas variantes de *splicing* possam modular a função daquelas mais expressas. Igualmente, a linhagem germinativa dos descendentes da Síndrome de Cowden apresentaram menor expressão da VS-5a, mas superexpressão da VS-3a (AGRAWAL; ENG, 2006). As VS_s PTEN-FL, -5a e -5c apresentam maiores níveis de expressão em linhagens celulares representativas de endométrio não tumoral que tumorais. Igualmente, Agrawal e Eng, 2006 demonstraram maiores níveis de expressão das VS_s PTEN-FL e -5c no tecido normal adjacente que no câncer de mama esporádico. No carcinoma de células renais, a PTEN-Δ e a PTEN atuam como supressores tumorais. Pacientes com superexpressão do PTEN e do PTEN-Δ, apresentam sobrevida significativamente maior. Ademais, essas VS diminuem a fosforilação de AKT, a expressão de integrinas e a atividade de MAPK e JNK (BREUSKSCH et al., 2018). Esses achados sugerem que variantes de *splicing* do PTEN atuam de forma complementar ao PTEN-FL e apresentam papel tecido e tumor-específicos. Assim, no carcinoma de endométrio, as VS-5a e -5c, além da PTEN-FL são mais expressas nas linhagens celulares E6/E7/TERT e EM42 e podem estar contribuindo para o fenótipo não tumoral dessas linhagens. Especificamente a VS-5c apresenta expressão diferencial significativa entre as linhagens não tumorais e tumorais de endométrio. Contudo, na Síndrome de Cowden (SC) e na Síndrome Bannayan-Ritley-Ruvalcaba (SRRB), as variantes diferencialmente expressas entre os pacientes e o grupo dos indivíduos saudáveis

sem mutação do PTEN são as VS-3a, -3b e -5b. O perfil de expressão das VS é distinto entre a CS, CS-like e BRRS, mas o mecanismo através do qual as VS do PTEN modulam o fenótipo, ainda é desconhecido (SARQUIS et al., 2006).

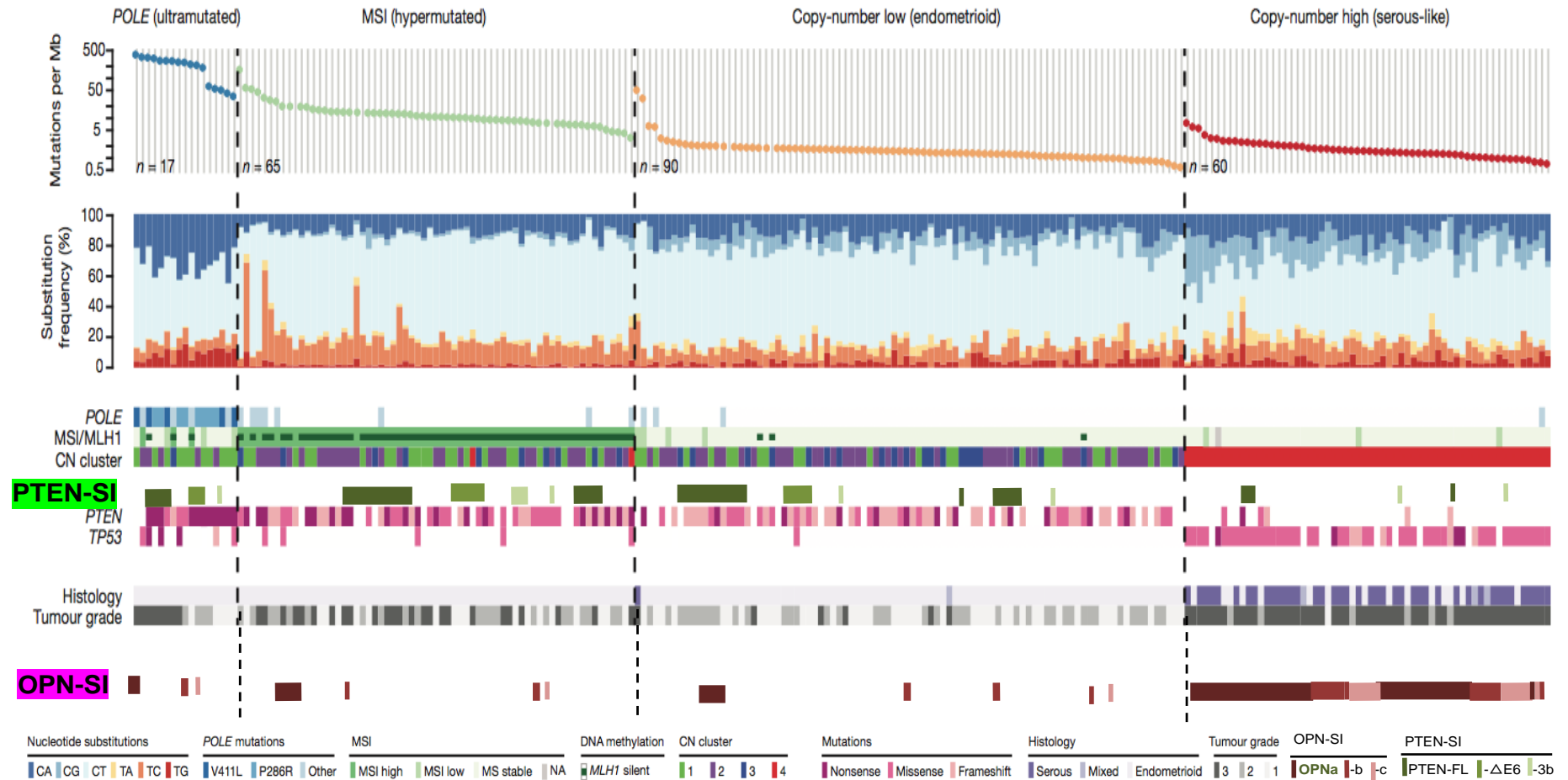


Figura 7.1- Expressão da OPN e do PTEN e suas variantes de *splicing*, nos quatro grupos de CE descritos pelo atlas do genoma humano. Expressão das variantes de *splicing* da OPN e do PTEN no grupo POLE (ultramutado), grupo de instabilidade de microssatélite (hipermutado), grupo dos tumores endometrióides com baixo número de cópias aberrantes e o grupo dos tumores com alto número de cópias aberrantes. As VSs PTEN-FL, -Del E6 e -3b são as mais expressas em cada um dos quatro grupos tumorais, embora essa expressão seja rara no grupo mais agressivo. A OPNa é a isoforma mais expressa em cada um dos grupos do TCGA e as OPN-SI tem maior expressão no grupo com alto número de cópias aberrantes (Modificado de CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2013).

No presente trabalho, ambas as linhagens G3, AN3CA (Tipo I) e KLE (Tipo II), apresentam níveis de expressão semelhantes da Del E6, embora a variante completa do PTEN seja mais expressa na KLE. Interessantemente, embora o carcinoma de endométrio do tipo endometrióide (tumor do Tipo I), tenha uma alta prevalência de PTEN mutado, no carcinoma de endométrio do tipo seroso (tumor do Tipo II), o gene mutado em alta frequência é o *TP53*. Entretanto, quando o carcinoma de endométrio do tipo endometrióide é G3, existe algum grau de sobreposição de suas características moleculares (MURALI; SOSLOW; WEIGELT, 2014). Além disso, demonstramos que as VS, PTEN-FL e Del E6, apresentam maiores níveis de expressão na linhagem celular KLE, contendo PTEN WT, que nas linhagens G1 e G2, as quais carregam mutação no PTEN. Papa et al. (2014) demonstraram que o PTEN mutante, cataliticamente inativo, forma heterodímeros com o PTEN selvagem e reprime sua função. Ademais, a associação do PTEN heterozigoto com a mutação desse gene promove hiperativação de AKT. Além disso, na hiperplasia endometrial que evoluiu para o CE, a presença de glândulas com PTEN inativo, mostrou-se relativamente alta (50%) e semelhante aos que não progrediram para o câncer. Logo, o *status* da PTEN na biópsia apresenta baixa sensibilidade como marcador de progressão. Por outro lado, as mutações do PTEN em três casos que progrediram da hiperplasia endometrial para o carcinoma de endométrio, foram conservadas (LACEY et al., 2008). Ensaios funcionais são necessários para a melhor caracterização da regulação das VS-PTEN-FL e -Del E6, nos diversos tumores e no CE, e sua relação com o *status* do PTEN. Encontramos que a isoforma completa do PTEN, é mais expressa na linhagem celular RL95-2 (Tipo I/G2) que na AN3CA (Tipo I/G3). Contrariamente as OPN-SI, a VS-Del E6 é mais expressa nas linhagens G2 e G3 que na linhagem Ishikawa (Tipo I/G1) e na linhagem AN3CA (Tipo I/G3) que na linhagem G2, achados esses descritos pela primeira vez na literatura pelo nosso grupo.

O éxon 6 do PTEN, além dos éxons 7 e 8, codificam o domínio C2 do PTEN, o qual contém o sítio de ligação ao p53 (MESTER; ENG, 2013; HOPKINS et al., 2015). O p53 é o mais importante fator transcricional com regulação positiva do PTEN (AGRAWAL; ENG, 2006). Ademais, o centro catalítico do PTEN constituído pelo domínio fosfatase e pelo domínio C2 interagem com o PIP3 na membrana plasmática (LESLIE; FOTI, 2011; VAZQUEZ et al., 2001). Logo, especulamos que a deleção do éxon 6 encontrada na variante de *splicing* Del E6 poderia interferir na atividade do PTEN em desfosforilar o PIP3 em PIP2 e, portanto, na sua atuação como regulador negativo da via de PI3K. Kim (2005) descreveu que o PTEN tem capacidade de inibir a OPN. Assim, estudos futuros que contemplem a VS

com deleção do éxon 6 podem auxiliar no esclarecimento da regulação do PTEN sobre a OPN e seu papel na carcinogênese do CE. Conforme demonstrado em nível transcricional no presente trabalho, a OPN total mostra-se expressa na linhagem celular não tumoral E6/E7/TERT bem como nas linhagens tumorais Ishikawa, RL-95-2, AN3CA e KLE. Entretanto, diferentemente do observado através dos ensaios de qRT-PCR, encontramos expressão protéica da OPN na linhagem celular não tumoral EM42, além da E6/E7/TERT. Outros estudos demonstraram que em nível transcricional, bem como em nível protéico, a linhagem tumoral Ishikawa, Hec-1A e a AN3CA, expressam a OPN total (RAMACHANDRAN et al., 2013; HAHNE et al., 2013). Entretanto, a linhagem celular tumoral RL95 e a linhagem celular não tumoral THESC não expressaram a OPN total (RAMACHANDRAN et al., 2013). Neste presente trabalho, diferentemente do observado em nível transcricional, a proteína PTEN-FL mostrou-se expressa exclusivamente nas linhagens não tumorais de endométrio (E6/E7/TERT e EM42). Achados de ensaios de imunohistoquímica, corroboram com nossos dados transcricionais, já que há marcação do PTEN nos carcinomas de endométrio do tipo endometrióide, bem como nos carcinomas de endométrio não endometrióides (DJORDJEVIC et al., 2012). Especificamente nos carcinomas de endométrio não endometrióides, a positividade do PTEN relaciona-se com pacientes do grupo de instabilidade de microssatélite (hipermutado) (DJORDJEVIC et al., 2013).

Demonstramos também que embora todas as linhagens expressem AKT, o pAKT está exclusivamente expressa nas linhagens tumorais e principalmente na linhagem celular Ishikawa. Nessa linhagem, a sinalização E2/RE α aumenta a fosforilação de AKT através de ações regulatórias negativas sobre o PTEN (SCULLY et al., 2014). Ademais, Memarzadeh et al. (2010), demonstraram que a ativação de AKT ou a perda exclusiva da PTEN epitelial, são suficientes para iniciar o CE no epitélio uterino adulto. A expressão do PTEN-FL e a ausência do pAKT nas linhagens não tumorais de endométrio indica papel importante dessa variante de *splicing* no endométrio. Este conjunto de dados sugere que a expressão do PTEN nas linhagens celulares não tumorais E6/E7/TERT e EM42 pode promover a inibição da fosforilação da proteína AKT, como previamente descrito (LEEVERS; VANHAESEBROECK; WATERFIELD, 1999; LIM et al., 2015; THORPE; YUZUGULLU; ZHAO, 2015). Contrariamente ao observado em nível transcricional, em nível protéico não encontramos expressão da proteína inibidora tumoral PTEN. Dados da literatura ratificam que o nível transcricional não é suficiente para predizer o nível protéico. A taxa de tradução e sua modulação são significativamente influenciadas pelas sequências do RNA, bem como

pela interação das proteínas aos elementos de regulatórios no transcrito. Além disso, o atraso na síntese proteica e sua exportação desconectam temporalmente e espacialmente a proteína do seu transcrito. Ademais, a autofagia e a meia vida proteica, a qual é influenciada pelo complexo ubiquitina-proteassomo podem influenciar na concentração proteica, independente do transcrito (LIU; BEYER; AEBERSOL, 2016). Demonstramos que a ausência da PTEN, nas linhagens celulares tumorais de carcinoma de endométrio (Ishikawa, RL95-2, AN3CA e KLE) permite a ativação da via de AKT aqui evidenciada pela detecção da proteína AKT fosforilada, o que favorece o fenótipo tumoral. Estudos descreveram que a interação do p53 ao domínio C2 do PTEN promove o aumento da sua transcrição, o qual é importante para a apoptose induzida pelo p53 e o PTEN inibe a expressão da OPN (STAMBOLIC et al., 2001; KIM et al., 2005; HOPKINS et al., 2014). Ademais, conforme descrito pela primeira pelo nosso grupo, a linhagem celular não tumoral E6/E7/TERT apresenta alta expressão da VS $\Delta 40p53$ (SANTOS et al., 2019). Assim, podemos sugerir que especificamente na linhagem celular não tumoral E6/E7/TERT, a expressão da VS $\Delta 40p53$ induz a transcrição de altos níveis de expressão do PTEN-FL o qual inibe especialmente a OPNc. Demonstramos também, que o efeito citotóxico induzido por extratos de tomate contendo licopeno na linhagem celular tumoral de endométrio promove redução na viabilidade celular, o que corrobora com os dados apresentados por Jeong; Lim e Kim (2019) utilizando licopeno isolado, no câncer de pâncreas. Ademais, demonstramos que o tratamento da linhagem tumoral representativa de CE com o extrato de molho de tomate contendo licopeno promove aumento das VS PTEN-FL, VS-Del E6, VS-3b, bem como diminuição da expressão de pAKT. Tang et al. (2014) no modelo tumoral de CCR, mostraram que o licopeno suprime além da proliferação celular, a fosforilação de AKT. Ademais, a inibição de mTOR, proteína *downstream* a AKT, promove redução da severidade da lesão endometrial, induzida pelo tamoxifeno, nos camundongos (MIRANTES et al, 2013). Esses achados podem indicar que a superexpressão de isoformas específicas de *splicing* do PTEN inibem a via de PI3K diminuindo a viabilidade celular. Todavia, o uso dos extratos de tomate, contém além do licopeno, outras moléculas como luteína, β -caroteno e fenóis (SZABO et al., 2019). Assim, para uma análise fidedigna dos efeitos citotóxicos do licopeno na linhagem de endométrio seria interessante o uso dessa molécula pura, uso esse limitado pelo seu alto custo. Resumidamente, demonstramos pela primeira vez, que linhagens celulares não tumorais de endométrio, bem como aquelas representativas de CE, expressam as nove PTEN-IS e as três OPN-IS estudadas. A isoforma completa da OPN e do PTEN são as variantes com maior nível

de expressão nessas linhagens. O nível de expressão das OPN-SI é maior na linhagem celular representativa dos tumores do Tipo II. Além disso, é capaz de diferenciar as duas linhagens celulares de grau histopatológico 3. Especificamente nos tumores do Tipo I, este nível de expressão é maior nas linhagens com grau histopatológico mais diferenciados. Dentre as PTEN-SI, a Del E6 é a segunda variante com maior expressão, seguida pela VS-3b. Especificamente a VS-5c é significativamente mais expressa na linhagem celular não tumoral E6/E7/TERT que nas linhagens celulares representativas de CE. O nível de expressão da VS PTEN-FL é maior na linhagem celular representativa dos CE do Tipo II (KLE) do que naquelas que representam os CE do Tipo I e VS-Del E6 é mais expressa nas linhagens celulares com maior GH. Em nível proteico, a OPN mostrou-se expressa nas seis linhagens avaliadas. A fosforilação de AKT é evidente nas linhagens celulares representativas de CE e ausente nas não tumorais, padrão oposto a expressão proteica do PTEN. Esses achados corroboram o papel do PTEN, como regulador negativo da via de PI3K. Além disso, o aumento da expressão de isoformas específicas do PTEN, promovido pelos extratos contendo licopeno, leva a redução na viabilidade celular através da diminuição da fosforilação AKT (Figura 7.2).

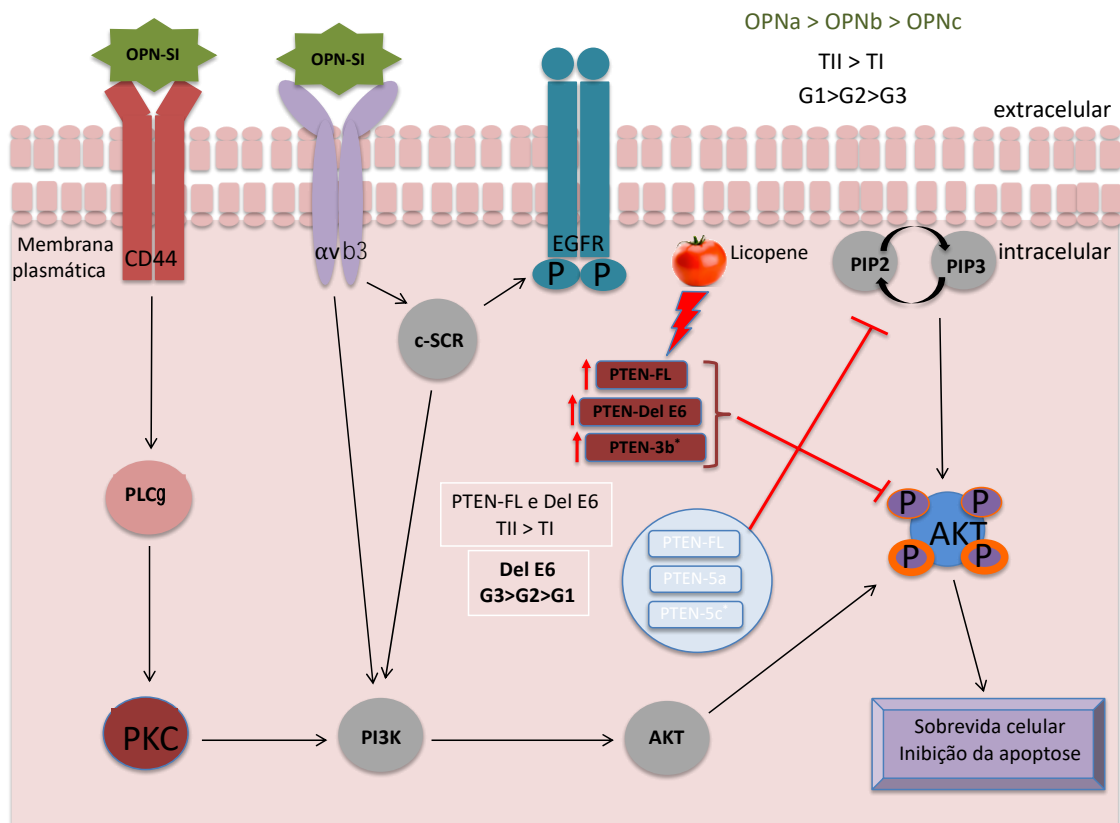


Figura 7.2- Modelo proposto para ação da OPN, PTEN e suas variantes de *splicing* na ativação da via de PI3K. Em células tumorais, a OPN total e de suas isoformas de *splicing* (OPN-SI), expressas de forma aberrante, interagem a receptores de integrinas e CD44 e ativando a via de sinalização de PI3-cinase (PI3K) e PLC- γ /PKC/PI3K, respectivamente. Por outro lado, a superexpressão da PTEN, antagoniza a sinalização de PI3K e suprime a fosforilação de AKT induzida pela OPN, por meio da desfosforilação do PIP3 em PIP2. Nesse cenário e segundo os dados obtidos em nosso estudo em linhagens de células de endométrio tumorais e não tumorais, as três isoformas da OPN (-a, -b e -c) são expressas tanto em células tumorais quanto não tumorais de endométrio, sendo a isoforma OPNa a de expressão predominante nessas células. Além disso, as OPN-SI são mais expressas em linhagens celulares representativas de tumores do Tipo II e mais expressas em linhagens de tumores de endométrio mais diferenciados (G1). O tratamento com o extrato de molho de tomate contendo licopeno, promove diminuição de pAKT. Por outro lado, as isoformas de *splicing* do PTEN também são expressas nestas mesmas linhagens. Especialmente as isoformas PTEN-FL, -5a e -5c são mais expressas nas linhagens não tumorais de endométrio, indicando que elas podem ser as principais isoformas que contribuem para a função supressora tumoral, em células de endométrio. Especialmente a isoforma PTEN Del E6, que é mais expressa em linhagens representativas de tumores TII, e nas Tipo I G3, poderia favorecer o fenótipo reverso. Créditos da Figura: Etel RP Gimba & Luciana B Ferreira, 2019.

8. CONCLUSÕES

Concluimos que nesse modelo experimental, as linhagens celulares não tumorais e tumorais de CE expressam as distintas isoformas testadas da OPN e do PTEN. Dentre estas testadas, as linhagens representativas de tumores do Tipo II e a linhagem celular não tumoral demonstraram expressão diferencial das OPN-SI e da VS-5c, respectivamente, indicando papel oposto entre elas. O tratamento com extratos contendo licopeno diminuem a viabilidade celular, modulam a expressão de PTEN-SI e inibem a fosforilação de AKT. Esses achados contribuem no conhecimento da biologia dos tumores de endométrio.

9. PERSPECTIVAS

Nossos achados propiciam novas expectativas para melhor conhecimento da biologia molecular do CE. Assim, avaliar a expressão das OPN-SI e das PTEN-SI a partir dos mesmos experimentos, permite correlacionar a expressão dessas VS, auxiliando na compreensão da modulação entre elas, bem como dos seus papéis funcionais. Validar o perfil de expressão das OPN-SI e das PTEN-SI em amostras teciduais de CE, bem como nas hiperplasias endometriais e no tecido endometrial normal pode auxiliar na compreensão da carcinogênese do CE. Além disso, estudos futuros para analisar o fenótipo celular de linhagens tumorais de endométrio mediante a superexpressão das PTEN-FL, VS- Del E6 e VS-3b e de linhagens não tumorais de endométrio mediante a superexpressão PTEN-FL, VS-5a e VS-5c e investigar os mecanismos moleculares que medeiam suas funções, poderão auxiliar na compreensão do efeito supressor tumoral dessas PTEN-SI no carcinoma de endométrio. Investigar o silenciamento da OPNa, OPNb e OPNc e os mecanismos celulares e as vias de sinalização que medeiam as inter-relações entre ações da OPN e suas isoformas sobre a expressão do PTEN-FL, VS- Del E6, VS-3b, VS-5a e VS-5c poderão auxiliar no desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas de aplicação clínica no CE.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBARYA, A. et al. Natural Products as Potential Cancer Therapy Enhancers: A Preclinical Update. **SAGE open medicine**, v. 2, p. 2050312114546924, 2014.

AGNIHOTRI, R. et al. Osteopontin, a Novel Substrate for Matrix Metalloproteinase-3 (Stromelysin-1) and Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 30, p. 28261–28267, 27 jul. 2001.

AGRAWAL, D. et al. Osteopontin Identified as Lead Marker of Colon Cancer Progression, Using Pooled Sample Expression Profiling. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 7, p. 513–521, 3 abr. 2002.

AGRAWAL, S.; ENG, C. Differential Expression of Novel Naturally Occurring Splice Variants of PTEN and Their Functional Consequences in Cowden Syndrome and Sporadic Breast Cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 5, p. 777–787, 1 mar. 2006.

ANTONSEN, S. L. et al. MRI, PET/CT and Ultrasound in the Preoperative Staging of Endometrial Cancer - a Multicenter Prospective Comparative Study. **Gynecologic Oncology**, v. 128, n. 2, p. 300–308, fev. 2013.

ASCENSO, A. et al. The Effect of Lycopene Preexposure on UV-B-Irradiated Human Keratinocytes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 8214631, 2016.

BARRY, S. T. et al. A Regulated Interaction between Alpha5beta1 Integrin and Osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 267, n. 3, p. 764–769, 27 jan. 2000a.

BARRY, S. T. et al. Analysis of the Alpha4beta1 Integrin-Osteopontin Interaction. **Experimental Cell Research**, v. 258, n. 2, p. 342–351, 1 ago. 2000b.

BAYLESS, K. J. et al. Osteopontin Is a Ligand for the Alpha4beta1 Integrin. **Journal of Cell Science**, v. 111 (Pt 9), p. 1165–1174, maio 1998.

BELLAHCÈNE, A. et al. Small Integrin-Binding Ligand N-Linked Glycoproteins (SIBLINGs): Multifunctional Proteins in Cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 8, n. 3, p. 212–226, mar. 2008.

BLASBERG, J. D. et al. Lung Cancer Osteopontin Isoforms Exhibit Angiogenic Functional Heterogeneity. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 139, n. 6, p. 1587–1593, jun. 2010.

BOGUSLAWSKA, J. et al. microRNAs target SRSF7 splicing factor to modulate the expression of osteopontin splice variants in renal cancer cells. **Gene**, v. 595, n. 2, p. 142-149, Dec 31 2016.

BOKHMAN, J. V. Two Pathogenetic Types of Endometrial Carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 15, n. 1, p. 10–17, fev. 1983.

BONONI, A.; PINTON, P. Study of PTEN Subcellular Localization. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 77–78, p. 92–103, maio 2015.

BRAKORA, K. A. et al. Utility of Osteopontin as a Biomarker in Recurrent Epithelial Ovarian Cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 93, n. 2, p. 361–365, maio 2004.

BREUKSCH, I. et al. In Renal Cell Carcinoma the PTEN Splice Variant PTEN-Δ Shows Similar Function as the Tumor Suppressor PTEN Itself. **Cell communication and signaling: CCS**, v. 16, n. 1, p. 35, 28 2018.

BEREK S. J., H. F. N. Gynecologic Oncology - Capitulo 10. In: **Gynecologic Oncology**. Fifth Edition ed. [s.l.] Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams &Wilkins, 2009. p. 396–442.

BRIESE, J. et al. Expression Pattern of Osteopontin in Endometrial Carcinoma: Correlation with Expression of the Adhesion Molecule CEACAM1. **International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists**, v. 25, n. 2, p. 161–169, abr. 2006.

BRIONES-ORTA, M. A. et al. Osteopontin Splice Variants and Polymorphisms in Cancer Progression and Prognosis. **Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 1, p. 93- 108.A, ago. 2017.

BROWN, L. F. et al. Osteopontin Expression and Distribution in Human Carcinomas. **The American Journal of Pathology**, v. 145, n. 3, p. 610–623, set. 1994.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, Obesity and Cancer: Epidemiological Evidence and Proposed Mechanisms. **Nature Reviews. Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579–591, ago. 2004.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. Integrated Genomic Characterization of Endometrial Carcinoma. **Nature**, v. 497, n. 7447, p. 67–73, 2 maio 2013.

CASSON, A. G. et al. Ras Mutation and Expression of the Ras-Regulated Genes Osteopontin and Cathepsin L in Human Esophageal Cancer. **International Journal of Cancer**, v. 72, n. 5, p. 739–745, 4 set. 1997.

CHALHOUB, N.; BAKER, S. J. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. **Annual Review of Pathology**, v. 4, p. 127–150, 2009.

CHEN, P. et al. Lycopene and Risk of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Medicine**, v. 94, n. 33, p. e1260, ago. 2015.

CHO, H. et al. Clinical Significance of Osteopontin Expression in Cervical Cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 134, n. 8, p. 909–917, ago. 2008.

CHOI, S. T. et al. Osteopontin Might Be Involved in Bone Remodelling Rather than in Inflammation in Ankylosing Spondylitis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 47, n. 12, p. 1775–1779, dez. 2008.

CHRISTENSEN, B. et al. Post-Translationally Modified Residues of Native Human Osteopontin Are Located in Clusters: Identification of 36 Phosphorylation and Five O-Glycosylation Sites and Their Biological Implications. **The Biochemical Journal**, v. 390, n. Pt 1, p. 285–292, 15 ago. 2005.

COLLABORATIVE GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL STUDIES ON ENDOMETRIAL CANCER. Endometrial Cancer and Oral Contraceptives: An Individual Participant Meta-Analysis of 27 276 Women with Endometrial Cancer from 36 Epidemiological Studies. **The Lancet. Oncology**, v. 16, n. 9, p. 1061–1070, set. 2015.

COLOMBO, N. et al. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: Diagnosis, Treatment and Follow-Up. **International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society**, v. 26, n. 1, p. 2–30, jan. 2016.

COPPOLA, D. et al. Correlation of Osteopontin Protein Expression and Pathological Stage across a Wide Variety of Tumor Histologies. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 1 Pt 1, p. 184–190, 1 jan. 2004.

CREASMAN, W. T. et al. Carcinoma of the Corpus Uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 95 Suppl 1, p. S105-143, nov. 2006.

CUI, X. et al. Antioxidant Intake and Risk of Endometrial Cancer: Results from the Nurses' Health Study. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 5, p. 1169–1178, 1 mar. 2011.

DAS, R.; MAHABELESWAR, G. H.; KUNDU, G. C. Osteopontin Induces AP-1-Mediated Secretion of Urokinase-Type Plasminogen Activator through c-Src-Dependent Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation in Breast Cancer Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 12, p. 11051–11064, 19 mar. 2004.

DENHARDT, D. T.; GIACHELLI, C. M.; RITTLING, S. R. Role of Osteopontin in Cellular Signaling and Toxicant Injury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 723–749, 2001.

DENHARDT, D. T.; NODA, M. Osteopontin Expression and Function: Role in Bone Remodeling. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 72 Suppl 30–31, n. S30-31, p. 92–102, 1998.

DEY, N. et al. The Protein Phosphatase Activity of PTEN Regulates SRC Family Kinases and Controls Glioma Migration. **Cancer Research**, v. 68, n. 6, p. 1862–1871, 15 mar. 2008.

DIJKHUIZEN, F. P. et al. The Accuracy of Endometrial Sampling in the Diagnosis of Patients with Endometrial Carcinoma and Hyperplasia: A Meta-Analysis. **Cancer**, v. 89, n. 8, p. 1765–1772, 15 out. 2000.

DOLL, A. et al. Novel Molecular Profiles of Endometrial Cancer-New Light through Old Windows. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 108, n. 3–5, p. 221–229, fev. 2008.

DONATI, V. et al. Osteopontin Expression and Prognostic Significance in Non-Small Cell Lung Cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 18, p. 6459–6465, 15 set. 2005.

DOSSUS, L. et al. Reproductive Risk Factors and Endometrial Cancer: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 2, p. 442–451, 15 jul. 2010.

DU, X. et al. Inhibition of Osteopontin Suppresses in Vitro and in Vivo Angiogenesis in Endometrial Cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 115, n. 3, p. 371–376, dez. 2009.

ENG, C. PTEN: One Gene, Many Syndromes. **Human Mutation**, v. 22, n. 3, p. 183–198, set. 2003.

FEDARKO, N. S. et al. Factor H Binding to Bone Sialoprotein and Osteopontin Enables Tumor Cell Evasion of Complement-Mediated Attack. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 22, p. 16666–16672, 2 jun. 2000.

FENG, Z. et al. Aberrant Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 α , TWIST and E-Cadherin Is Associated with Aggressive Tumor Phenotypes in Endometrioid Endometrial Carcinoma. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 43, n. 4, p. 396–403, abr. 2013.

FERREIRA, L. B. et al. Osteopontin-a Splice Variant Is Overexpressed in Papillary Thyroid Carcinoma and Modulates Invasive Behavior. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 52003–52016, 9 ago. 2016.

FOO, W. C. et al. Loss of Phosphatase and Tensin Homolog Expression Is Associated with Recurrence and Poor Prognosis in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Human Pathology**, v. 44, n. 6, p. 1024–1030, jun. 2013.

FORBES, S. A. et al. COSMIC: Mining Complete Cancer Genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Database issue, p. D945-950, jan. 2011.

GALAAL, K. et al. Adjuvant Chemotherapy for Advanced Endometrial Cancer. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 5, p. CD010681, 15 maio 2014.

GANN, P. H. et al. A Phase II Randomized Trial of Lycopene-Rich Tomato Extract Among Men with High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia. **Nutrition and Cancer**, v. 67, n. 7, p. 1104–1112, 2015.

GERSTER, H. The Potential Role of Lycopene for Human Health. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 109–126, abr. 1997.

GHIGNA, C.; VALACCA, C.; BIAMONTI, G. Alternative Splicing and Tumor Progression. **Current Genomics**, v. 9, n. 8, p. 556–570, dez. 2008.

GIMBA, E. R.; TILLI, T. M. Human Osteopontin Splicing Isoforms: Known Roles, Potential Clinical Applications and Activated Signaling Pathways. **Cancer Letters**, v. 331, n. 1, p. 11–17, 30 abr. 2013.

GIMBA, E. R. P.; BRUM, M. C. M.; NESTAL DE MORAES, G. Full-Length Osteopontin and Its Splice Variants as Modulators of Chemoresistance and Radioresistance (Review). **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 2, p. 420–430, fev. 2019.

GUO, L. et al. Genetic Variations in the PI3K/AKT Pathway Predict Platinum-Based Neoadjuvant Chemotherapeutic Sensitivity in Squamous Cervical Cancer. **Life Sciences**, v. 143, p. 217–224, 15 dez. 2015.

HASHIGUCHI, Y. et al. Comparison of Osteopontin Expression in Endometrioid Endometrial Cancer and Ovarian Endometrioid Cancer. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, v. 23, n. 2, p. 205–212, 2006.

HAHNE, J. C. et al. Studies on the Role of Osteopontin-1 in Endometrial Cancer Cell Lines. **Strahlentherapie Und Onkologie: Organ Der Deutschen Rontgengesellschaft [et Al]**, v. 189, n. 12, p. 1040–1048, dez. 2013.

HE, B.; MIRZA, M.; WEBER, G. F. An Osteopontin Splice Variant Induces Anchorage Independence in Human Breast Cancer Cells. **Oncogene**, v. 25, n. 15, p. 2192–2202, 6 abr. 2006.

HIGASHIYAMA, M. et al. Prognostic Significance of Osteopontin Expression in Human Gastric Carcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 14, n. 12, p. 3419–3427, dez. 2007.

HIGGINS, C. L. et al. Distribution of Alkaline Phosphatase, Osteopontin, RANK Ligand and Osteoprotegerin in Calcified Human Carotid Atheroma. **The Protein Journal**, v. 34, n. 5, p. 315–328, out. 2015.

HINSHAW, S. J. et al. Endometrial Carcinoma: The Perioperative and Long-Term Outcomes of Robotic Surgery in the Morbidly Obese. **Journal of Surgical Oncology**, v. 114, n. 7, p. 884–887, dez. 2016.

HOPKINS, B. D. et al. PTEN Function: The Long and the Short of It. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 4, p. 183–190, abr. 2014.

HUR, E. M. et al. Osteopontin-Induced Relapse and Progression of Autoimmune Brain Disease through Enhanced Survival of Activated T Cells. **Nature Immunology**, v. 8, n. 1, p. 74–83, jan. 2007.

IP, B. C. et al. Lycopene Attenuated Hepatic Tumorigenesis via Differential Mechanisms Depending on Carotenoid Cleavage Enzyme in Mice. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 7, n. 12, p. 1219–1227, dez. 2014.

IVANOV, S. V. et al. Tumorigenic Properties of Alternative Osteopontin Isoforms in Mesothelioma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 382, n. 3, p. 514–518, 8 maio 2009.

JAIN, A. et al. Three SIBLINGs (Small Integrin-Binding Ligand, N-Linked Glycoproteins) Enhance Factor H's Cofactor Activity Enabling MCP-like Cellular Evasion of Complement-Mediated Attack. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13700–13708, 19 abr. 2002.

JEONG, N.-H. et al. Preoperative Levels of Plasma Micronutrients Are Related to Endometrial Cancer Risk. **Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica**, v. 88, n. 4, p. 434–439, 2009.

JEONG, Y.; LIM, J. W.; KIM, H. Lycopene Inhibits Reactive Oxygen Species-Mediated NF- κ B Signaling and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. **Nutrients**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2019.

KALE, S. et al. Osteopontin Signaling Upregulates Cyclooxygenase-2 Expression in Tumor-Associated Macrophages Leading to Enhanced Angiogenesis and Melanoma Growth via A β 1 Integrin. **Oncogene**, v. 34, n. 42, p. 5408–5410, 16 out. 2015.

KHANDEKAR, M. J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Molecular Mechanisms of Cancer Development in Obesity. **Nature Reviews. Cancer**, v. 11, n. 12, p. 886–895, 24 2011.

KIM, M. J.; KIM, H. Anticancer Effect of Lycopene in Gastric Carcinogenesis. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 2, p. 92–96, jun. 2015.

KIM, M.-S. et al. Hyaluronic Acid Induces Osteopontin via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway to Enhance the Motility of Human Glioma Cells. **Cancer Research**, v. 65, n. 3, p. 686–691, 1 fev. 2005.

KLOPP, A. et al. The Role of Postoperative Radiation Therapy for Endometrial Cancer: Executive Summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Guideline. **Practical Radiation Oncology**, v. 4, n. 3, p. 137–144, jun. 2014.

KORETS, S. B. et al. Dual MTORC1/2 Inhibition in a Preclinical Xenograft Tumor Model of Endometrial Cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 132, n. 2, p. 468–473, fev. 2014.

KYO, S. et al. Successful immortalization of Endometrial Glandular Cells with Normal Structural and Functional Characteristics. **The American Journal of Pathology**, v. 163, n. 6, p. 2259–2269, dez. 2003.

LAVORATO-ROCHA, A. M. et al. Immunohistochemical Assessment of PTEN in Vulvar Cancer: Best Practices for Tissue Staining, Evaluation, and Clinical Association. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 77–78, p. 20–24, maio 2015.

LEEVERS, S. J.; VANHAESEBROECK, B.; WATERFIELD, M. D. Signalling through Phosphoinositide 3-Kinases: The Lipids Take Centre Stage. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 219–225, abr. 1999.

LESLIE, N. R.; FOTI, M. Non-Genomic Loss of PTEN Function in Cancer: Not in My Genes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 131–140, mar. 2011.

LI, J. et al. PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 275, n. 5308, p. 1943–1947, 28 mar. 1997.

LI, Y. et al. Osteopontin Promotes Invasion, Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Endometrial Carcinoma Cell HEC-1A Through AKT and ERK1/2 Signaling. **Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**, v. 37, n. 4, p. 1503–1512, 2015.

LIN, C.-S. et al. Antitumor Effects and Biological Mechanism of Action of the Aqueous Extract of the Camptotheca Acuminata Fruit in Human Endometrial Carcinoma Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2014, p. 564810, 2014.

LIN, J. et al. Osteopontin (OPN/SPP1) isoforms collectively enhance tumor cell invasion and dissemination in esophageal adenocarcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 22239–57, Sep 08 2015.

LINKOV, F. et al. Endometrial Cancer: Multiplexed Luminex Approaches for Early Detection. **Expert Opinion on Medical Diagnostics**, v. 2, n. 5, p. 527–537, maio 2008.

LIU, Q.; XIE, Q.-Z. [Osteopontin and male reproduction]. **Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology**, v. 18, n. 5, p. 446–449, maio 2012.

LIU, Y.-P. et al. Oncolytic Measles and Vesicular Stomatitis Virotherapy for Endometrial Cancer. *Gynecologic Oncology*, v. 132, n. 1, p. 194–202, jan. 2014.

LIU, Y.; BEYER, A.; AEBERSOLD, R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 535–550, 21 abr. 2016.

MAKI, M. et al. Expression of Osteopontin Messenger RNA by Macrophages in Ovarian Serous Papillary Cystadenocarcinoma: A Possible Association with Calcification of Psammoma Bodies. **Pathology International**, v. 50, n. 7, p. 531–535, jul. 2000.

MESTER, J.; ENG, C. When Overgrowth Bumps into Cancer: The PTEN-Opathies. **American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics**, v. 163C, n. 2, p. 114–121, maio 2013.

MEYER, L. A. et al. Postoperative Radiation Therapy for Endometrial Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Guideline. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 26, p. 2908–2913, 10 set. 2015.

MILELLA, M. et al. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. **Frontiers in Oncology**, v. 5, p. 24, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ESTIMATIVA/2018 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) - Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ESTIMATIVA/2020 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) - Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2019.

MIRZA, M. et al. Osteopontin-c Is a Selective Marker of Breast Cancer. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 4, p. 889–897, 15 fev. 2008.

MÜNSTEDT, K. et al. Cancer of the Endometrium: Current Aspects of Diagnostics and Treatment. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 2, p. 24, 21 jul. 2004.

MURALI, R.; SOSLOW, R. A.; WEIGELT, B. Classification of Endometrial Carcinoma: More than Two Types. **The Lancet. Oncology**, v. 15, n. 7, p. e268-278, jun. 2014.

MURPHY-ULLRICH, J. E.; SAGE, E. H. Revisiting the Matricellular Concept. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 37, p. 1–14, jul. 2014.

MYERS, S. A.; CLEMENTS, J. A. Kallikrein 4 (KLK4), a New Member of the Human Kallikrein Gene Family Is up-Regulated by Estrogen and Progesterone in the Human Endometrial Cancer Cell Line, KLE. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 5, p. 2323–2326, maio 2001.

NAGATOMO, T. et al. Microarray Analysis of Human Milk Cells: Persistent High Expression of Osteopontin during the Lactation Period. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 1, p. 47–53, out. 2004.

NAGUIB, A. et al. PTEN Functions by Recruitment to Cytoplasmic Vesicles. **Molecular Cell**, v. 58, n. 2, p. 255–268, 16 abr. 2015.

NAHUM, A. et al. Lycopene Inhibition of Cell Cycle Progression in Breast and Endometrial Cancer Cells Is Associated with Reduction in Cyclin D Levels and Retention of P27(Kip1) in the Cyclin E-Cdk2 Complexes. **Oncogene**, v. 20, n. 26, p. 3428–3436, 7 jun. 2001.

NAKAE, M. et al. Preoperative Plasma Osteopontin Level as a Biomarker Complementary to Carbohydrate Antigen 125 in Predicting Ovarian Cancer. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 32, n. 3, p. 309–314, jun. 2006.

NAKAMURA, K. D. M. et al. Osteopontin Splice Variants Expression Is Involved on Docetaxel Resistance in PC3 Prostate Cancer Cells. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 37, n. 2, p. 2655–2663, fev. 2016.

NOU, R. A. et al. Vaginal Brachytherapy versus Pelvic External Beam Radiotherapy for Patients with Endometrial Cancer of High-Intermediate Risk (PORTEC-2): An Open-Label, Non-Inferiority, Randomised Trial. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9717, p. 816–823, 6 mar. 2010.

OGBUREKE, K. U. E.; FISHER, L. W. SIBLING Expression Patterns in Duct Epithelia Reflect the Degree of Metabolic Activity. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 55, n. 4, p. 403–409, abr. 2007.

O'NEILL, C. J. et al. An Immunohistochemical Comparison between Low-Grade and High-Grade Ovarian Serous Carcinomas: Significantly Higher Expression of P53, MIB1, BCL2, HER-2/Neu, and C-KIT in High-Grade Neoplasms. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 29, n. 8, p. 1034–1041, ago. 2005.

PAJARES, M. J. et al. Alternative Splicing: An Emerging Topic in Molecular and Clinical Oncology. **The Lancet. Oncology**, v. 8, n. 4, p. 349–357, abr. 2007.

PECORELLI, S. Revised FIGO Staging for Carcinoma of the Vulva, Cervix, and Endometrium. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 105, n. 2, p. 103–104, maio 2009.

PRAT, J. et al. Endometrial Carcinoma: Pathology and Genetics. **Pathology**, v. 39, n. 1, p. 72–87, fev. 2007.

RAMACHANDRAN, S. et al. Regulatory Role of Osteopontin in Malignant Transformation of Endometrial Cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 5, p. 3623–3629, maio 2013.

RAO, G.; DU, L.; CHEN, Q. Osteopontin, a Possible Modulator of Cancer Stem Cells and Their Malignant Niche. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 5, p. e24169, 1 maio 2013.

RENAUD, M.-C. et al. Epidemiology and Investigations for Suspected Endometrial Cancer. **Journal of obstetrics and gynaecology Canada: JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada: JOGC**, v. 35, n. 4, p. 380–381, abr. 2013.

RODRIGUES, L. R. et al. The Role of Osteopontin in Tumor Progression and Metastasis in Breast Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 16, n. 6, p. 1087–1097, jun. 2007.

RONG, R. et al. Induction of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Peritoneal Mesothelial and Endometrial Cells by Oxidized Low-Density Lipoprotein and Peritoneal Fluid from Women with Endometriosis. **Fertility and Sterility**, v. 78, n. 4, p. 843–848, out. 2002.

SAITOH, Y. et al. Expression of Osteopontin in Human Glioma. Its Correlation with the Malignancy. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 72, n. 1, p. 55–63, jan. 1995.

SAROSIEK, K. et al. Osteopontin (OPN) isoforms, diabetes, obesity, and cancer; what is one got to do with the other? A new role for OPN. **J Gastrointest Surg**, v. 19, n. 4, p. 639-50, Apr 2015.

SARQUIS, M. S. et al. Distinct Expression Profiles for PTEN Transcript and Its Splice Variants in Cowden Syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. 1, p. 23–30, jul. 2006.

SCHORGE, J. O. et al. Osteopontin as an Adjunct to CA125 in Detecting Recurrent Ovarian Cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 10, p. 3474–3478, 15 maio 2004.

SENOL, S. et al. Immunohistochemical Profile of Tumor Pathways and Prognostic Significance in Colon Adenocarcinomas. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 36, n. 1, p. 29–41, 2017.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227–236, jun. 2004.

SHAO, J. et al. Heterozygous Disruption of the PTEN Promotes Intestinal Neoplasia in APC^{min/+} Mouse: Roles of Osteopontin. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 12, p. 2476–2483, dez. 2007.

SHEVDE, L. A.; SAMANT, R. S. Role of Osteopontin in the Pathophysiology of Cancer. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 37, p. 131–141, jul. 2014.

SHINDE, S. R.; MADDIKA, S. PTEN Modulates EGFR Late Endocytic Trafficking and Degradation by Dephosphorylating Rab7. **Nature Communications**, v. 7, p. 10689, 12 fev. 2016.

SHROFF, S. et al. The Expression of PTEN Is Associated with Improved Prognosis in Patients with Ampullary Adenocarcinoma after Pancreaticoduodenectomy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 137, n. 11, p. 1619–1626, nov. 2013.

SIDDIQUI, A. A. et al. Osteopontin splice variant as a potential marker for metastatic disease in pancreatic adenocarcinoma. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 29, n. 6, p. 1321-7, Jun 2014.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. **Cancer Statistics**, 2020. CA: a cancer journal for clinicians, v. 70, n. 1, p. 7–30, jan. 2020.

SJÖGREN, L. L.; MØRCH, L. S.; LØKKEGAARD, E. Hormone Replacement Therapy and the Risk of Endometrial Cancer: A Systematic Review. **Maturitas**, v. 91, p. 25–35, set. 2016.

SOARES, N. D. C. P. **Efeito do licopeno isolado e de extratos de produtos à base de tomate em linhagens celulares hiperplásicas e tumorigênicas da próstata humana**. 2016. 191 f. Tese (Doutorado). Instituto de Química- Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.

SOARES, N. da C. P. et al. Comparative Analysis of Lycopene Content from Different Tomato-Based Food Products on the Cellular Activity of Prostate Cancer Cell Lines. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 6, 10 jun. 2019.

SOBIN L. H.; GOSPODAROWICZ M. K.; WITTEKIND C. **TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition**. 7th. ed. [s.l: s.n.]

SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The Functions and Regulation of the PTEN Tumour Suppressor. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 283–296, 4 abr. 2012.

STAMBOLIC, V. et al. Regulation of PTEN transcription by p53. **Mol Cell**, v. 8, n. 2, p. 317-25, Aug 2001.

STECK, P. A. et al. Identification of a Candidate Tumour Suppressor Gene, MMAC1, at Chromosome 10q23.3 That Is Mutated in Multiple Advanced Cancers. **Nature Genetics**, v. 15, n. 4, p. 356–362, abr. 1997.

STOKES, G. N. et al. Association of CD44 Isoform Immunohistochemical Expression with Myometrial and Vascular Invasion in Endometrioid Endometrial Carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 84, n. 1, p. 58–61, jan. 2002.

SULLIVAN, J. et al. Expression of a prometastatic splice variant of osteopontin, OPNC, in human pancreatic ductal adenocarcinoma. **Surgery**, v. 146, n. 2, p. 232-40, Aug 2009.

SUN, S. J. et al. Integrin beta3 and CD44 levels determine the effects of the OPN-a splicing variant on lung cancer cell growth. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55572-55584, Aug 23 2016.

SZABO, K. et al. Screening of Ten Tomato Varieties Processing Waste for Bioactive Components and Their Related Antioxidant and Antimicrobial Activities. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 8, 8 ago. 2019.

TABOR, A.; WATT, H. C.; WALD, N. J. Endometrial Thickness as a Test for Endometrial Cancer in Women with Postmenopausal Vaginal Bleeding. **Obstetrics and Gynecology**, v. 99, n. 4, p. 663–670, abr. 2002.

TANAKA, Y. et al. Prognostic impact of EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression in endometrial cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 14, n. 1, p. 13–19, 1 jan. 2013.

TANG, F.-Y. et al. Lycopene Inhibits Growth of Human Colon Cancer Cells via Suppression of the Akt Signaling Pathway. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 6, p. 646–654, jun. 2008.

TANG, F.-Y. The silver bullet for cancer prevention: Chemopreventive effects of carotenoids. **BioMedicine**, v. 2, p. 117-121, 2012.

THALMANN, G. N. et al. Osteopontin: Possible Role in Prostate Cancer Progression. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 5, n. 8, p. 2271–2277, ago. 1999.

THORPE, L. M.; YUZUGULLU, H.; ZHAO, J. J. PI3K in Cancer: Divergent Roles of Isoforms, Modes of Activation and Therapeutic Targeting. **Nature Reviews. Cancer**, v. 15, n. 1, p. 7–24, jan. 2015.

TILLI, T. M. et al. Osteopontin-c Splicing Isoform Contributes to Ovarian Cancer Progression. **Molecular cancer research: MCR**, v. 9, n. 3, p. 280–293, mar. 2011.

VAZQUEZ, F. et al. Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. **J Biol Chem**, v. 276, n. 52, p. 48627-30, Dec 28 2001.

VIHINEN, P.; KÄHÄRI, V.-M. Matrix Metalloproteinases in Cancer: Prognostic Markers and Therapeutic Targets. **International Journal of Cancer**, v. 99, n. 2, p. 157–166, 10 maio 2002.

VILORIA, K.; HILL, N. J. Embracing the Complexity of Matricellular Proteins: The Functional and Clinical Significance of Splice Variation. **Biomolecular Concepts**, v. 7, n. 2, p. 117–132, 1 maio 2016.

VORDERMARK, D. et al. Plasma Osteopontin Levels in Patients with Head and Neck Cancer and Cervix Cancer Are Critically Dependent on the Choice of ELISA System. **BMC cancer**, v. 6, p. 207, 15 ago. 2006.

WANG, B.-D.; LEE, N. H. Aberrant RNA Splicing in Cancer and Drug Resistance. **Cancers**, v. 10, n. 11, 20 nov. 2018.

WAY, D. L. et al. Characterization of a New Human Endometrial Carcinoma (RL95-2) Established in Tissue Culture. **In Vitro**, v. 19, n. 3 Pt 1, p. 147–158, mar. 1983.

WEBER, G. F.; ASHKAR, S. Molecular Mechanisms of Tumor Dissemination in Primary and Metastatic Brain Cancers. **Brain Research Bulletin**, v. 53, n. 4, p. 421–424, 1 nov. 2000.

WONG, A. T. et al. Utilization of Adjuvant Therapies and Their Impact on Survival for Women with Stage III C Endometrial Adenocarcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 142, n. 3, p. 514–519, 2016.

WORBY, C. A.; DIXON, J. E. PTEN. **Annual Review of Biochemistry**, v. 83, p. 641–669, 2014.

YANG, Y.; GUO, J.-X.; SHAO, Z.-Q. MiR-21 Targets and Inhibits Tumor Suppressor Gene PTEN to Promote Prostate Cancer Cell Proliferation and Invasion: An Experimental Study. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 87–91, jan. 2017.

YANG, Z.-Y. et al. The Prognostic Value of Phosphatase and Tensin Homolog Negativity in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of 32 Studies with 4393 Patients. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 101, p. 40–49, maio 2016.

YE, B. et al. Proteomic-Based Discovery and Characterization of Glycosylated Eosinophil-Derived Neurotoxin and COOH-Terminal Osteopontin Fragments for Ovarian Cancer in Urine. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 2, p. 432–441, 15 jan. 2006.

YOKOSAKI, Y. et al. The Integrin Alpha (9) Beta (1) Binds to a Novel Recognition Sequence (SVVYGLR) in the Thrombin-Cleaved Amino-Terminal Fragment of Osteopontin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 51, p. 36328–36334, 17 dez. 1999.

YUAN, J.-M. et al. Prediagnostic Levels of Serum Micronutrients in Relation to Risk of Gastric Cancer in Shanghai, China. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 13, n. 11 Pt 1, p. 1772–1780, nov. 2004.

ZAINO, R. J. et al. The Utility of the Revised International Federation of Gynecology and Obstetrics Histologic Grading of Endometrial Adenocarcinoma Using a Defined Nuclear

Grading System. A Gynecologic Oncology Group Study. **Cancer**, v. 75, n. 1, p. 81–86, 1 jan. 1995.

ZDUNIAK, K. et al. Nuclear osteopontin-c is a prognostic breast cancer marker. **Br J Cancer**, v. 112, n. 4, p. 729-38, Feb 17 2015