SUELLEN DA SILVA GOMES HERBSTER

ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA RECK NO PROCESSO DE
TUMORIGÊNESE MEDIADO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

TÍTULO EM INGLÊS: THE ROLE OF RECK SUPER EXPRESSION IN HPV
ASSOCIATED TUMORIGENESIS

SUELLEN DA SILVA GOMES HERBSTER

ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA RECK NO PROCESSO DE
TUMORIGÊNESE MEDIADO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2018

SUELLEN DA SILVA GOMES HERBSTER

ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA RECK NO PROCESSO DE
TUMORIGÊNESE MEDIADO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Enrique Mario Boccardo
Pierulivo

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Lepique

Versão original

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

da Silva Gomes Herbster, Suellen

ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA RECK NO PROCESSO DE
TUMORIGÊNESE MEDIADO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO /
Suellen da Silva Gomes Herbster; orientador Enrique
Mario Boccardo Pierulivo; coorientadora Ana Paula
Lepique. -- São Paulo, 2018.

106 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Papilomavírus humano. 2. Câncer de colo de
útero. 3. RECK. 4. Tumorigênese mediada pelo HPV.
5. Microambiente tumoral. I. Boccardo Pierulivo,
Enrique Mario, orientador. II. Lepique, Ana Paula,
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Suellen da Silva Gomes Herbst

Título da Tese: Estudo do papel da proteína RECK no processo de tumorigênese mediado pelo papilomavírus humano.

Orientador(a): Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo

Coorientador(a): Dra. Ana Paula Lepique

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **138** nas fls. **13** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Enrique Mario Boccardo Pierulivo**, Coordenador (a) da "*Estudo do papel da proteína reck no processo de carcinogênese mediado pelo papilomavírus humano*" do qual participam o(s) aluno(s) **Suellen Herbster** e a pesquisadora **Ana Paula Lepique**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **07.01.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 08 de janeiro de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada aos meus pais, Marina e Júlio, ao meu eterno pai no coração, Chagas, a minha segunda mãe, Mazinha, e a Vovó Maria Conga da Bahia. Por todo o amor que multiplicam em minha vida, cada um a sua maneira, e por representarem a minha fortaleza incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai Oxalá por toda a luz, todo o amor e toda a força que emana em minha vida e por todas as vezes em que eu encontrei a paz em momentos difíceis durante esta tese.

A Vovó Maria Conga da Bahia por todos os ensinamentos de vida, por me mostrar que somente o amor constrói e por sempre me acalantar com os seus conselhos.

A minha família (Marina, Júlio, Chagas, Juliana e Marcelo) por todo o sacrifício, todo o apoio e todo o amor que vocês me oferecem e por serem a razão pela qual eu estou de pé hoje caminhando esta jornada na Ciência.

Ao Prof. Dr. Enrique Boccardo, por ter aberto as portas do seu laboratório e do seu grupo de pesquisa. Eu jamais poderei lhe agradecer o suficiente pela paciência, pelas lições aprendidas, pelas oportunidades de crescimento e pelo seu zelo como orientador durante este doutorado.

A Profa. Dra. Ana Paula Lepique, por ter me recebido “como se fosse de casa” em seu laboratório durante quase todo o período deste doutorado. Obrigada por todo o ensinamento prático e teórico, por todas as vezes que discutiu comigo os resultados, por me permitir participar das atividades do seu grupo de pesquisa e por ser o meu grande exemplo de mulher forte na Ciência.

A Profa. Dra. Luisa Villa e ao INCT do HPV, obrigada pelo investimento, pelas discussões de dados e por todas as oportunidades que estes geraram para este doutorado.

A Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar pela grande oportunidade de colaboração material, metodológica e de infraestrutura do NUCEL sem as quais este projeto não seria viável.

A Dra. Marina Trombetta Lima, pela grande amizade, cumplicidade e por toda a ajuda prática e filosófica neste projeto. Ma, eu agradeço sempre ao universo por você ter cruzado o meu caminho e por não rir do projeto RECKets!

Ao Caio por toda a ajuda metodológica e pela grande importância imaterial da sua amizade na minha vida. Obrigada por nunca me deixar sozinha, pelo ouvido amigo e pela cantoria alegre!

A Vanesca por toda a amizade, apoio e por tornar os dias no laboratório muito mais alegres com a sua presença!

Ao Victor por toda a amizade dentro e fora da vida científica e por todo o apoio e papos cabeça durante o doutorado. Meu amigo, você é muito fixe e mora no meu coração!

A Andressa pela amizade e por realizar muitos dos experimentos a quatro mãos comigo. Obrigada por acreditar no potencial do projeto e pela sua dedicação ao mesmo.

Aos colegas de laboratório (Aline Amorim, José Carlos, Bruna/Luna, Bruninha, Filipe, Mirian e Walason) pela boa convivência e momentos pré-sal de grande alegria!

Ao meu grande amigo Paulo Thiago (Leão) pela amizade ímpar e resistente à distância. Pelos ensinamentos e contribuições vitais para este projeto e por acreditar em mim muitas vezes mais do que eu mesma.

Aos amigos Isabela, Ester e Adilson por manterem acesas a nossa amizade e as nossas discussões de ciência independente da distância e por sempre perdoarem as minhas ausências/atrasos nos nossos encontros.

A extensão da minha família que sempre me ampara e com quem eu renovo o meu ânimo: Miguel, Cristiano, Bárbara, Caio, Silvano, Flávia, Mazinha, Jéssica, Thiago e Eloá.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto de tese.

Aos membros da banca por aceitarem ler, contribuir e discutir esta tese.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Universidade de São Paulo e aos órgãos de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos: 2017/02997-3; 2013/27006-9; 2010/20002-0) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças Associadas ao Papilomavírus (INCT-HPV - Processos: FAPESP 2008/57889-1 / CNPq 573799/2008-3), sem os quais este estudo não seria realizado.

EPÍGRAFE

*“Se desejo, o meu desejo faz subir marés de sal e sortilégio.
Eu ando de cara pra o vento, na chuva,
e quero me molhar...
Sou como a haste fina, qualquer brisa verga,
nenhuma espada corta.”*

Carta de amor, Maria Bethânia.

RESUMO

HERBSTER, S. S. G. **Estudo do papel da proteína reck no processo de tumorigênese mediado pelo papilomavírus humano**. 106 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O desenvolvimento do câncer cervical está associado à infecção por alguns tipos de Papilomavírus Humano (HPV). Entre os mecanismos de carcinogênese associados ao HPV incluem-se alterações em moléculas que modulam a manutenção de componentes da matriz extracelular (MEC), como as metaloproteínas de matriz (MMP) e alguns de seus reguladores. A proteína RECK (*reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs*) apresenta função essencial na remodelação tecidual e na angiogênese fisiológica ou tumoral, através da regulação pós-transcricional da atividade de MMP-2, MMP-9 e MMP-14 (MT1-MMP). Resultados publicados previamente por nosso grupo apontam para a correlação entre a expressão da oncoproteína E7 de HPV16, a alta expressão e atividade de MMP-9 e a baixa expressão de seus reguladores, TIMP-2 e RECK. A expressão de RECK também é baixa em lesões do colo uterino de alto grau e em amostras de câncer cervical, quando comparadas a amostras de pacientes com cervicite. O presente estudo visa determinar o papel de RECK no processo de tumorigênese mediado por HPV. Para isto, estabelecemos linhagens derivadas de tumor de colo de útero (SiHa, SW756 e C33A) que superexpressam RECK a partir de transdução com lentivírus. Os efeitos da superexpressão de RECK sobre o potencial tumorigênico de SiHa, SW756 e C33A foram avaliados em modelos de estudo *in vivo* e *in vitro*. De maneira geral, a superexpressão de RECK foi associada com a capacidade reduzida de invasão em câmara de Matrigel® e de formação de colônia independente de ancoragem. Ainda, camundongos *nude* inoculados s.c. com células tumorais superexpressando RECK apresentaram atraso no estabelecimento e crescimento tumoral e sobrevida global estendida quando comparados aos controles. Ambos tumores derivados de SiHa RECK e SW756 RECK apresentaram redução na frequência de células tumorais e endoteliais, ao passo que mostraram aumento no infiltrado inflamatório. Esta observação foi acompanhada de redução na população de neutrófilos e potenciais células mieloderivadas supressoras em tumores de ambas as linhagens. Em tempo, analisamos séries de dados de expressão de CIN e carcinomas cervicais do banco de dados GEO e verificamos que a hipermetilação do gene RECK e a inibição da expressão de mRNA de RECK são eventos precoces no desenvolvimento do câncer de colo de útero. Avaliamos que a baixa expressão de RECK foi associada a progressão de lesões CIN3+ e ao aumento de metástases em linfonodo pélvico em pacientes com câncer de colo de útero. Ademais, notamos que o tratamento com quimio radioterapia levou ao aumento dos níveis de mRNA de RECK em um outro grupo de pacientes com câncer de colo de útero. Concluímos que a superexpressão de RECK (i) reduz o potencial tumorigênico de linhagens celulares derivadas de colo de útero independente do status de infecção por HPV e que (ii) o seu efeito sobre as populações intratumorais se mostrou específico para as linhagens infectadas por HPV. Estes resultados apontam para uma possível interação entre as alterações no microambiente tumoral associadas ao HPV e a função de RECK. Finalmente, a regulação negativa da expressão de RECK é um evento precoce na história natural do câncer cervical.

Palavras-chave: Papilomavírus humano, câncer cervical, RECK, tumorigênese mediada pelo HPV, microambiente tumoral.

ABSTRACT

HERBSTER, S. S. G. **The role of RECK super expression in HPV associated tumorigenesis.** 106 p. Thesis (PhD in Microbiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Persistent infection with high-risk Human Papillomavirus (HPV) types is the main etiologic factor for the development of cervical cancer. The HPV carcinogenic mechanisms include alterations in extracellular matrix (ECM) components, as matrix metalloproteinases (MMP) and its regulators. The Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) plays a central role on tissue remodeling, tumor angiogenesis and exert inhibitory effects on the transcription, synthesis, activation and activity of MMP-2, MMP-9 e MMP-14 (MT1-MMP). As previously published by our group, it has been observed a correlation between the HPV16 E7 oncoprotein expression, the up-regulation of MMP-9 and the down-regulation of its inhibitors, RECK and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2). Also, RECK expression was downregulated in cervical intraepithelial neoplasias grades 2 and 3 (CIN2/3) and invasive carcinoma samples levels when compared with clinical samples of patients diagnosed with cervicitis. The present study aims to determine the role of RECK in HPV mediated tumorigenesis. In order to do so, we generated cervical tumors derived cell lines (SiHa, SW756 e C33A) superexpressing RECK by lentiviral transduction followed by FACS. We assessed the effects of RECK superexpression in the tumorigenic potential of SiHa, SW756 e C33A using both *in vitro* and *in vivo* protocols. Overall, RECK superexpression is associated with reduced chamber invasion and reduced anchorage independent colony formation. Moreover, *nude* mice injected s.c. with RECK superexpressing tumor cells presented (i) delayed tumor establishment and (ii) increased overall survival, when compared with controls. Both SiHa and SW756 superexpressing RECK presented decreased frequency of tumor and endothelial cells, whilst showed increase in inflammatory infiltrate population. This observation was followed by a decrease in potential myeloid derived suppressor cell and neutrophil populations in both SiHa RECK and SW756 RECK tumors. Additionally, we observed hipermethylation and premature and consistent downregulation of RECK mRNA expression in CIN and cervical cancer expression datasets from GEO database. We observed that reduced RECK expression was associated with CIN3+ progression and increased pelvic lymph node metastasis in cervical cancer patients. Furthermore, we found that chemo radiotherapy treatment led to increased levels of mRNA in another set of cervical cancer patients. We conclude that RECK superexpression reduces the tumorigenic potential of cervical cancer derived cell lines regardless of HPV infection status. However, we found that the effect of RECK over the intratumoral cells populations is specific to HPV infected tumor cell lines. These results points to a possible interaction between HPV associated tumor microenvironment alterations and RECK. Finally, RECK downregulation is an early event in the natural history of cervical cancer.

Key words: Human papillomavirus, cervical cancer, RECK, HPV mediated tumorigenesis, tumor micro environment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Compilação de alterações celulares e teciduais observadas em patologias associadas ao HPV	23
Figura 2. Representação esquemática das isoformas da proteína RECK	29
Figura 3. Validação da superexpressão da proteína RECK nas linhagens SiHa, SW756 e C33A.....	48
Figura 4. Análise do efeito da superexpressão de RECK na cinética de crescimento das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A.....	49
Figura 5. Análise do efeito da superexpressão de RECK na capacidade de formação de colônias, migração e invasão em câmara das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A.....	51
Figura 6. Análise do efeito da superexpressão de RECK na capacidade de crescimento independente de ancoragem e de formação de esferoides das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A.....	53
Figura 7. Análise do efeito da superexpressão de RECK no estabelecimento e na cinética de crescimento tumoral de células SiHa, SW756 e C33A em camundongos <i>nude</i>	55
Figura 8. Análise do efeito da superexpressão de RECK na cinética de crescimento tumoral de células SiHa, SW756 e C33A em camundongos <i>nude</i>	57
Figura 9. Análise do efeito da superexpressão de RECK na sobrevida global dos camundongos <i>nude</i> injetados com células SiHa, SW756 e C33A	59
Figura 10. Análise do efeito da superexpressão de RECK no volume tumoral dos camundongos <i>nude</i> injetados com células SiHa, SW756 e C33A	60
Figura 11. Identificação da população de células tumorais e seu conteúdo de DNA a partir do uso de DAPI seguido de citometria de fluxo.....	62
Figura 12. Identificação da população de células endoteliais e seu conteúdo de DNA a partir de imunomarcagem e uso de DAPI seguido de citometria de fluxo.....	64
Figura 13. Identificação do infiltrado inflamatório e seu conteúdo de DNA a partir de imunomarcagem e uso de DAPI seguido de citometria de fluxo.....	66
Figura 14. Caracterização do infiltrado inflamatório intratumoral a partir de imunomarcagem seguida de citometria de fluxo.....	68
Figura 15. A análise de séries de dados de expressão global da plataforma GEO demonstra que o mRNA de RECK sofre regulação negativa em CIN e em carcinomas invasivos de colo de útero	70
Figura 16. A análise de séries de dados de expressão global da plataforma GEO demonstra que a regulação negativa do mRNA de RECK observada no processo de transformação da cérvix uterina pode ser preditiva de aspectos clínicos das pacientes com CIN ou carcinomas inavassivos	72
Figura 17. A análise da série de dados de metilação global da plataforma GEO demonstra um aumento no nível de metilação do gene RECK em CIN e em carcinomas invasivos de colo de útero	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo.	44
Tabela 2. Determinação do enriquecimento da população de células dissociadas EGFP+ das linhagens SiHa, HeLa, C33A, SW756 e CasKi por citometria de fluxo com leitura de fluorescência no espectro FITC.	47
Tabela 3. Análise do efeito da superexpressão de RECK sobre o tempo de estabelecimento tumoral após a injeção s.c. de células tumorais em camundongos <i>nude</i>	54
Tabela 4. Análise do efeito da superexpressão de RECK na sobrevivência de animais injetados s.c. com células tumorais em camundongos <i>nude</i>	58
Tabela 5. Compilação dos dados <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> e <i>in silico</i> relativos ao papel de RECK e RECK B no potencial tumorigênico das linhagens tumorais SiHa, SW756, C33A e em amostras clínicas de CIN e carcinomas invasivos de colo de útero.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDK – quinases dependentes de ciclinas

CIN – do inglês cervical intraepithelial neoplasia

CIS – carcinoma in situ

CKI – inibidores de CDK

D10 – meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino

EGF – fator de Crescimento Epidermal

FACS – do inglês Fluorescence-activated cell sorting

G-CSF – do inglês granulocyte colony-stimulating factor

GEO – Gene Expression Omnibus

HDAC – histona deacetilase

HDAC1 – histona deacetilase tipo 1

HPV – Papilomavírus humano

HSIL – do inglês High grade Squamous Intra-epithelial Lesion

HSPC – do inglês hematopoietic stem and progenitor cells

IFN- β – interferon β

M10 – meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino

MEC – matriz extracelular

MMP – metaloproteinases de matriz

ORF – regiões codificadoras

PRb – proteína do retinoblastoma

pRbAp46 – proteína associada à pRb

QRT – quimioradioterapia

RECK – proteína indutora de reversão rica em cisteína com motivos Kazal

SPI – motivo de inibição de serinoprotease

TAM – Macrófagos associados a tumores

TIMP – do inglês tissue inhibitor of metalloproteinase

TLR9 – Toll-like receptor 9

TNF – fator de necrose tumoral

UBE3A – ubiquitina ligase E6AP

URR –do inglês upstream regulatory region

LISTA DE SÍMBOLOS

α – letra grega alfa

β – letra grega beta

κ – letra grega kappa

® – marca registrada

SUMÁRIO

Introdução	20
Papilomavírus humanos (HPV) e patologias associadas	20
Matriz extracelular (MEC) e Metaloproteínases de matriz (MMP)	25
Inibidores teciduais de MMP (TIMP)	26
RECK	27
Mecanismos de regulação da expressão de RECK	28
Papéis fisiopatológicos da proteína RECK	30
Alterações da expressão/atividade de MMP em tumores de colo de útero	32
Justificativa	34
Objetivo principal:	36
Objetivos específicos:	36
Material e Métodos	37
Transformação bacteriana	37
Extração de DNA plasmidial	38
Eletroforese em gel de agarose	38
Cultura de células	38
Obtenção de células que superexpressam RECK	39
Transfecção com o uso de plasmídeos para produção de lentivírus	39
Obtenção de partículas lentivirais	39
Infecção das linhagens tumorais a partir de lentivírus	39
Obtenção de células expressando RECK através de FACS (<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)	40
Análise de expressão protéica: Western blot	40
Ensaio clonogênico	41
Ensaio clonogênico em soft ágar	41
Cinética de crescimento	41
Capacidade de migração em câmara e de invasão em Matrigel	42
Capacidade de formação de esferoides tumorais	42
Medida da capacidade das linhagens que superexpressam RECK de gerar tumores em camundongos imunodeficientes	43
Cinética de crescimento tumoral em camundongos nude	43
Análise de populações celulares intratumorais por citometria de fluxo	43
Análise estatística	44
Análise de expressão global de conjuntos de dados (datasets) da plataforma GEO	44
Resultados	46
Aquisição de células puras positivas para a marcação de EGFP por FACS	46
Detecção de proteínas RECK por Western blot	47
Análise do efeito da superexpressão de RECK na cinética de crescimento das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A	48
Análise do efeito da superexpressão de RECK na capacidade de formação de colônias, de migração em câmara e de invasão em câmara de Matrigel® das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A	50
Análise do efeito da superexpressão de RECK na capacidade de formação de colônias independente de ancoragem e na formação de esferóides das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A	52
Análise do efeito da superexpressão de RECK no estabelecimento tumoral e na cinética de crescimento tumoral em camundongos nude injetados com células das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A	54

Análise do efeito da superexpressão de RECK na sobrevida global e no volume tumoral de camundongos nude injetados com células das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A..	58
Análise do efeito da superexpressão de RECK na frequência e viabilidade de células tumorais em camundongos nude	61
Análise do efeito da superexpressão de RECK na frequência e viabilidade de células endoteliais em camundongos nude	63
Análise do efeito da superexpressão de RECK na frequência e ciclo celular de células do infiltrado inflamatório em tumores SiHa, SW756 e C33A de camundongos nude.....	65
Análise do efeito da superexpressão de RECK no perfil de células do infiltrado inflamatório em tumores SiHa, SW756 e C33A de camundongos nude	67
Avaliação in silico da expressão de RECK em amostras clínicas de CIN e carcinomas invasivos de colo de útero	69
Resumo dos resultados apresentados.....	74
Discussão	76
Efeito da superexpressão de RECK nos parâmetros tumorigênicos de SiHa, SW756 e C33A: ensaios in vitro	77
Efeito da superexpressão de RECK nos parâmetros tumorigênicos de SiHa, SW756 e C33A: Potencial tumorigênico, cinética de crescimento e o efeito na sobrevida.....	78
Efeito da superexpressão de RECK nos parâmetros tumorigênicos de SiHa, SW756 e C33A: Frequência e viabilidade de células tumorais e endoteliais	79
Efeito da superexpressão de RECK nos parâmetros tumorigênicos de SiHa, SW756 e C33A: Frequência e viabilidade de células do infiltrado inflamatório local	83
Avaliação da expressão de mRNA de RECK em amostras clínicas: análises in silico dos bancos de dados depositados na plataforma GEO.....	86

Introdução

Papilomavírus humanos (HPV) e patologias associadas

Os papilomavírus humanos (HPV) são vírus não envelopados, com capsídeo de simetria icosaédrica de aproximadamente 55 nm, com genoma de DNA dupla fita circular de aproximadamente oito kpb. Estes vírus pertencem à família *Papillomaviridae*, estão distribuídos em dezesseis gêneros de Papilomavírus e são classificados em função da semelhança de sua sequência de nucleotídeos do gene L1. Os HPV são vírus mucoepiteliotrópicos e espécie-específicos, que infectam epitélios em regiões anatómicas específicas causando uma variedade de proliferações benignas como verrugas, cistos epidérmicos, neoplasias intraepiteliais, papilomas anogenitais, oro - laríngeos ou faríngeos e outros tipos de hiperqueratoses (IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2007; FORMAN et al., 2012).

Até o momento, foram identificados 210 tipos de HPV (VAN DOORSLAER et al., 2017), dos quais cerca de 40 tipos são capazes de infectar as regiões anogenital e orofaríngea e causar verrugas genitais, cistos epidérmicos e neoplasias intraepiteliais classificadas como lesões displásicas de baixo e alto grau. Os HPV são classificados como “baixo risco” ou “alto risco” oncogênico segundo o tipo de prognóstico clínico das lesões associadas a esta infecção (VILLA, 1997). Os HPV de baixo risco (ex. tipos 6 e 11) estão associados a lesões hiperproliferativas benignas com baixa tendência à malignização. Por outro lado, os HPV de alto risco (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66) são classificados como carcinógenos de tipo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC, 2007) devido à sua associação etiológica com o câncer da cérvix uterina (IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2007).

Mundialmente, a infecção por HPV está associada a 5,2% dos casos de câncer (PARKIN; BRAY, 2006; DE MARTEL et al., 2012; FORMAN et al., 2012; OH; WEIDERPASS, 2014). A infecção por HPV de alto risco em mulheres também apresenta associação com uma porcentagem significativa de carcinomas de vulva e vagina. Além disso, esses vírus estão associados a cerca de 90% dos casos de carcinomas anais e a uma fração dos casos de câncer de cabeça e pescoço em homens e mulheres. Finalmente, 25 a 33% dos tumores de pênis estão relacionados à infecção por esses vírus (ALEMANY et al., 2016).

Diversos estudos epidemiológicos têm mostrado que 20 a 25% das mulheres entre 18 e 30 anos estão infectadas com algum tipo de HPV oncogênico (MCMURRAY et al., 2001; IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2007; MARTEL et al., 2012; FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013). Estes estudos mostram que a maioria das infecções é transiente e somente uma pequena proporção das mesmas progride para lesões pré-malignas graves, como HSIL (*High grade Squamous Intra-epithelial Lesion*) (SCHLECHT et al., 2001). Todavia, as infecções por HPV de alto risco são responsáveis por quase a totalidade dos cânceres da cérvix uterina, uma das principais causas de morte em mulheres jovens no mundo (IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2007). O carcinoma da cérvix uterina é um dos tumores malignos mais frequentes entre as mulheres nos países em desenvolvimento (FERLAY et al., 2015a).

Mundialmente, este tumor é o terceiro tipo de neoplasia mais comum entre as mulheres com mais de 530.000 novos casos diagnosticados anualmente. Sabe-se ainda que mais de 86% dos casos são diagnosticados em países em desenvolvimento, onde corresponde a 11% de todas as neoplasias femininas. A alta taxa de mortalidade associada a este tumor (50,3% dos casos) o posiciona entre os dez tipos de câncer mais letais do mundo, com uma estimativa de cerca de 270.000 mortes por ano de acordo com o GLOBOCAN (2012) (FERLAY et al., 2015b). É importante ressaltar que mais de 88% da mortalidade associada ao câncer de colo de útero ocorre em países em desenvolvimento (TOTA et al., 2011).

As regiões consideradas de alto risco para o câncer de cérvix uterina englobam África Ocidental e Oriental, África do Sul, Centro-Sul da Ásia, América Central e América do Sul. Por outro lado, são observadas baixas taxas de incidências nas áreas da Ásia Ocidental, Oriente Médio, Europa Ocidental, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia (FERLAY et al., 2015b). No Brasil, o carcinoma cervical é o terceiro tipo de tumor mais comum entre as mulheres, com a estimativa de 15.590 novos casos em 2014. Esta neoplasia é a mais incidente na região Norte, segunda mais incidente nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, e quarta e quinta em incidências nas regiões Sudeste e Sul, respectivamente (INCA, 2016).

A infecção pelo HPV é o principal fator de risco para o câncer cervical com a presença deste vírus sendo detectada em quase a totalidade destes tumores. Além disso, outros fatores são apontados como importantes para o processo de carcinogênese do colo do útero: atividade

sexual precoce, paridade, gravidez, imunossupressão, fumo, número parceiros sexuais e ainda uso de contraceptivos (ZUR HAUSEN, 2002).

A história natural do desenvolvimento do câncer cervical ocorre a partir da evolução de lesões precursoras denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (CIN). CIN1 e um subgrupo de lesões CIN2 são classificados como lesões produtivas, nas quais o ciclo viral é completo. Por outro lado, um subgrupo de CIN2 e todas as lesões CIN3 são denominadas precursoras de câncer cervical. Estas lesões precursoras estão principalmente associadas a infecções persistentes por HPV de alto risco oncogênico. As lesões produtivas apresentam alterações histológicas de baixas a moderadas e regredem espontaneamente no período de 1 a 2 anos. No caso de infecções persistentes de HPV de alto risco, lesões pré-cancerosas de alto grau (um subgrupo de CIN 2 e todas as CIN 3) podem se desenvolver em 3 a 5 anos. Morfologicamente, o CIN 3 (carcinoma *in situ* - CIS) representa uma doença heterogênea e pode ser considerado uma lesão precursora para um câncer cervical invasivo mais avançado (STEENBERGEN et al., 2014) (Figura 1).

A infecção produtiva por HPV ocorre preferencialmente em células não diferenciadas de epitélios escamosos (queratinócitos) a partir de lesões teciduais que exponham as células basais ao vírus. O ciclo de vida do HPV depende do processo de diferenciação dos queratinócitos para a regulação tanto da replicação de seu genoma quanto para a expressão de proteínas virais cruciais para este evento. Estas proteínas virais apresentam funções tanto na replicação do genoma viral quanto na regulação do ciclo da célula hospedeira, permitindo superar diferentes pontos de controle do ciclo celular, possibilitando divisão celular contínua mesmo em células que abandonaram a camada basal e iniciaram o processo de diferenciação (ZUR HAUSEN, 2002) (Figura 1).

O genoma do HPV encontra-se no núcleo das células na forma de epissomos que possuem oito ou nove regiões codificadoras (ORF), uma região regulatória *upstream* (URR do inglês “*upstream regulatory region*”) e dois sítios de poliadenilação. Os genes precoces compreendem os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 que são expressos nas primeiras etapas do ciclo viral, e os genes tardios, L1 e L2, que codificam proteínas estruturais para a formação do capsídeo (HEBNER; LAIMINS, 2006). Os tipos de HPV compreendem mais de 200 genótipos diferentes e são classificados pelo tipo de células epiteliais infectadas, pela avaliação de regiões hipervariáveis de seu genoma e pela capacidade de transformação celular (DE VILLIERS et al., 2004; IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF

CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2007; BZHALAVA et al., 2013). Esta última distingue os tipos virais que infectam a mucosa anogenital em “alto risco” e “baixo risco oncogênico”. Os tipos de “baixo risco” frequentemente levam ao surgimento de lesões benignas, como verrugas, enquanto que infecções pelos tipos de “alto risco” estão associadas ao processo de carcinogênese (FEHRMANN; LAIMINS, 2003) (Figura 1).

Figura 1 Compilação de alterações celulares e teciduais observadas em patologias associadas ao HPV. Infecções por HPV apresentam uma associação importante com o desenvolvimento de verrugas genitais e de pele, além de lesões precursoras do câncer de colo de útero. As partículas virais de HPV alcançam a camada basal do epitélio, onde iniciam o processo de infecção produtiva, através de microlesões ou microabrasões no tecido. As verrugas associadas à infecção por HPV são caracterizadas pelo aumento da proliferação celular (não associada à transformação) de células epiteliais, mediante a uma infecção produtiva por parte do vírus. O epitélio e as verrugas infectadas por HPV podem apresentar papilomatose, acantose (aumento no número de camadas celulares do epitélio), hiperqueratose e paraqueratose. Frequentemente, verrugas associadas à infecção por HPV apresentam cristas epiteliais alongadas direcionadas de forma grosseira para o centro da lesão e aumento da vascularização na área da derme contígua. Em verrugas e em neoplasias intraepiteliais cervicais de baixo grau (CIN1), o genoma de HPV é frequentemente encontrado em sua forma episomal. Por outro lado, a integração do genoma de HPV e a consequente maior expressão dos oncogenes virais E6 e E7 são eventos comuns em neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau (CIN2-3) e em carcinomas invasivos de colo de útero. De maneira geral, lesões associadas à infecção por HPV apresentam queratinócitos com morfologia atípica, denominados coilocitos, que exibem (i) aumento do tamanho celular e (ii) núcleo picnótico, delimitado por um halo perinuclear e localizado na periferia da célula (adaptado de Herbst *et al.*, 2018 – manuscrito aceito para publicação).

As proteínas E6 e E7 de HPV de alto risco se destacam quanto às funções associadas à transformação celular *in vitro* e à tumorigênese (TOMMASINO, 2014). Ambas as proteínas têm a capacidade independente de imortalizar vários tipos celulares em cultura, porém quando são expressas concomitantemente realizam esta função com eficiência aumentada (BOULET

et al., 2007; KLINGELHUTZ; ROMAN, 2012). A proteína E6 interage e forma um complexo proteico com a ubiquitina ligase E6AP (UBE3A) que transfere resíduos de ubiquitina à proteína p53. Isto determina a degradação de p53, afetando o controle do ciclo celular, alterando diversos mecanismos de regulação/execução de apoptose e promovendo instabilidade genômica (SCHEFFNER et al., 1990; WERNES; LEVINE; HOWLEY, 1990; CROOK; TIDY; VOUSDEN, 1991; LECHNER et al., 1992; KESSIS et al., 1993; THOMAS; PIM; BANKS, 1999; LIU et al., 2007).

Outras funções de E6 englobam a indução de expressão da subunidade catalítica da telomerase, hTERT, e a inibição da degradação da família de proteínas Src quinases, envolvidas no estímulo proliferativo e no desenvolvimento do fenótipo maligno associado ao HPV (ZUR HAUSEN, 2002; HOWIE; KATZENELLENBOGEN; GALLOWAY, 2009; FORMAN et al., 2012; KLINGELHUTZ; ROMAN, 2012). Além disso, a proteína E6 pode afetar a adesão, polaridade e diferenciação celular para permitir a proliferação e a replicação viral em células infectadas por HPV. A ligação de E6 com proteínas do citoesqueleto e de sinalização entre a célula e a matriz extracelular (MEC), como a paxilina, também leva a desestruturação das fibras de actina (TONG; HOWLEY, 1997). A proteína E6 de HPV16 ainda regula a expressão de proteínas envolvidas na resposta imune inata ao alterar a resposta ao interferon β (IFN- β) (RONCO et al., 1998) e citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) (HUANG; MCCANCE, 2002). Além disso, esta proteína, em conjunto com a oncoproteína E7, é capaz de inibir as vias de sinalização associadas ao TLR9 (Toll-like receptor 9) (HASAN et al., 2007, 2013).

Por sua vez, a proteína E7 é capaz de unir-se e inativar a proteína do retinoblastoma (pRb), uma das principais proteínas supressoras de tumor, ao induzir a sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina (DYSON et al., 1989; MÜNGER et al., 1989; BARBOSA et al., 1990; TOMMASINO, 2014). Além disso, a proteína E7 é capaz de interagir com vários fatores que regulam a proliferação celular, especialmente os que atuam na transição entre as fases G1 e S do ciclo celular. Isto inclui interações com outras proteínas da família do pRb (p107 e p130), Histona Deacetilase (HDAC), o fator de transcrição AP-1, ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (CDKs), e inibidores de CDK (CKI) (FUNK et al., 1997; THOMAS; LAIMINS, 1998; MCLAUGHLIN-DRUBIN; MÜNGER, 2009; SPARDY et al., 2009; KLINGELHUTZ; ROMAN, 2012). Além disso, foi observado que a proteína E7 é capaz de induzir aneuploidia, erros de segregação cromossômica e perda de fidelidade mitótica através da indução da amplificação dos centríolos e da indução de quebras no DNA

(DUENSING et al., 2000; DUENSING; MÜNGER, 2002, 2003; GHITTONI et al., 2010; KORZENIEWSKI et al., 2011; KORZENIEWSKI; TREAT; DUENSING, 2011; FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013).

Apesar do papel determinante do HPV em várias neoplasias humanas, observa-se que a infecção pelo vírus e a expressão permanente dos oncogenes virais não são suficientes para o desenvolvimento de um tumor maligno. Portanto, é necessária a ocorrência de eventos genéticos adicionais, tanto do vírus quanto da célula hospedeira, para promover a transformação celular (ZUR HAUSEN, 2002; TOMMASINO, 2014).

Matriz extracelular (MEC) e Metaloproteinases de matriz (MMP)

Diante da observação de que o microambiente é capaz de exercer um importante papel na homeostase tecidual, a matriz extracelular deixou de ser considerada apenas um suporte mecânico. De fato, a MEC atua como uma importante fonte de informações e reservatório de fatores de crescimento. Assim, os elementos da matriz extracelular e as células cooperam para regular uma ampla variedade de processos tanto sobre as células normais como as tumorais (BISSELL; LABARGE, 2005). As metaloproteinases de matriz (MMP) são enzimas-chave que regulam uma grande variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização, fato que as torna moléculas fundamentais de comunicação também entre células tumorais e o estroma. Estas metaloproteinases são responsáveis pela degradação de elementos chave da MEC. O aumento de sua expressão exerce um papel essencial na invasão, progressão e recorrência tumorais. Além disso, a desregulação de sua atividade está associada ao desenvolvimento de metástases e baixa taxa de sobrevida entre os pacientes (MYSLIWIEC; ORNSTEIN, 2002; SHEU et al., 2003).

As MMP compreendem um grupo de enzimas proteolíticas dependentes de Zn^{2+} (CHANG; WERB, 2001; STERNLICHT; WERB, 2001; EGEBLAD; WERB, 2002). Estas enzimas são divididas em duas classes, as MMP secretadas e as MMP de membrana, MT-MMP. As MMP secretadas são ativadas extracelularmente por outras MMP ativas ou por serinaproteinases, enquanto as MT-MMP são ativadas intracelularmente através do sítio de furina presente no domínio catalítico destas proteínas (EGEBLAD; WERB, 2002; NABESHIMA et al., 2002; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006). De forma geral, as MMP possuem três domínios em sua estrutura, um domínio pró-peptídico (80 aminoácidos) e um

domínio catalítico (170 aminoácidos) ligado por um peptídeo de tamanho variável ao domínio hemopexina (200 aminoácidos) em sua região N-terminal. A maior parte das MMP é sintetizada como zimogênio inativo. A conversão para a enzima ativa geralmente ocorre por clivagem proteolítica da região de interação entre o sítio ativo de ligação a zinco do domínio catalítico de MMP e seu resíduo cisteína da região do pró-peptídeo.

Proteínas como a MMP-2 e MMP-9 exercem sua função após serem ativadas no ambiente extracelular por outros membros da família de metaloproteinases ou ainda por serina-proteinases (WOODHOUSE; CHUAQUI; LIOTTA, 1997; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006). Em condições fisiológicas, a expressão das MMP é regulada em nível de transcrição. Além disso, a atividade dessas enzimas é regulada em nível de ativação dos zimogênios precursores pró-MMP e pela ação de proteínas inibidoras em diferentes tecidos (NAGASE; WOESSNER, 1999; STERNLICHT; WERB, 2001). Entre estes inibidores estão os TIMP1-4, do inglês *tissue inhibitor of metalloproteinase* e RECK (CHANG; WERB, 2001; MURPHY; NAGASE, 2008).

Inibidores teciduais de MMP (TIMP)

As proteínas da família TIMP são inibidores endógenos de MMP e por consequência regulam a renovação da MEC e o remodelamento tecidual (CAWSTON et al., 1981; MURPHY; NAGASE, 2008; BREW; NAGASE, 2010). Os genes TIMP codificam quatro tipos diferentes de proteínas (TIMP 1-4). Todos os tipos de TIMP inibem MMP, porém com afinidades diferentes por seus substratos. Além de sua função inibitória da atividade de metaloproteinase, as TIMP têm diversas atividades biológicas que podem ser independentes de MMP, como a promoção da proliferação celular, função anti angiogênica, atividade pró e anti apoptótica e atividade de plasticidade sináptica (BREW; DINAKARPANDIAN; NAGASE, 2000; BREW; NAGASE, 2010).

Todas as isoformas de TIMP em mamíferos têm um domínio N-terminal com aproximadamente 125 aminoácidos e um domínio C-terminal formado por cerca de 65 aminoácidos. A conformação de cada domínio é mantida por três pontes dissulfeto e os complexos TIMP-MMP são estabilizados por interações dos domínios C-terminais de TIMP e os domínios hemopexina do zimogênio de MMP (WILLIAMSON et al., 1990). As moléculas TIMP inibem MMP de forma seletiva através da ligação entre o seu domínio N-terminal e

seus resíduos de valina e cisteína com o sítio catalítico das MMP, quelando o átomo de zinco (MURPHY; NAGASE, 2008).

O balanço entre estas proteases e seus inibidores determina o potencial proteolítico dessas enzimas. A diminuição nos níveis proteicos de TIMP está frequentemente associada ao processo de carcinogênese. Por exemplo, já foi observado que baixas concentrações de TIMP-2 estão associadas indiretamente com uma maior ativação de MMP-2 através da ação MT1-MMP. Enquanto que, altas concentrações de TIMP-2 levam a inibição direta tanto de MMP-2 quanto de MT1-MMP. Por fim, foi reportada uma correlação entre o aumento na razão MMP/TIMP e um pior prognóstico de pacientes diagnosticados com tumores malignos cervicais, o que sugere uma capacidade de invasão aumentada destes tumores (OVERALL; LÓPEZ-OTÍN, 2002; LAFLEUR; TESTER; THOMPSON, 2003; MURPHY; NAGASE, 2008).

Em um estudo anterior, nosso grupo avaliou a expressão e atividade de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP e seu inibidor TIMP-2 em três linhagens celulares derivadas de carcinomas cervicais invasivos. Neste estudo foi observada uma maior expressão de MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 em linhagens celulares derivados de carcinomas de cérvix uterina positivas para HPV quando comparadas a uma linhagem HPV negativa. Estes resultados sugerem que a presença de HPV está associada ao aumento de expressão de MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2 em carcinoma de cérvix uterina (DA SILVA CARDEAL et al., 2006).

RECK

O gene RECK foi identificado na região cromossômica 9p13 → p12 e inclui 21 éxons, 20 íntrons e 13 SNPs conhecidos. RECK foi inicialmente descoberto a partir de uma biblioteca de cDNA em fibroblastos humanos, diante da sua capacidade de reversão da transformação de células NIH 3T3 vki-ras, e codifica uma proteína com 971 aminoácidos (TAKAHASHI et al., 1998b).

A estrutura geral da proteína RECK consiste de uma região hidrofóbica em ambas as extremidades, cinco repetições de cisteína próxima à região N-terminal, duas regiões com atividade similar ao Fator de Crescimento Epidermal (EGF) localizadas na região central da proteína e por fim três regiões com atividade de inibição de serinoprotease com a

identificação de motivos de Kazal. A região C-terminal permite a ancoragem à membrana celular através de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (TAKAHASHI et al., 1998b; NODA et al., 2003) (Figura 2).

Mecanismos de regulação da expressão de RECK

O primeiro estudo sobre a regulação da expressão de RECK foi publicado no ano seguinte a sua identificação (SASAHARA; TAKAHASHI; NODA, 1999). É importante destacar que, quando o gene foi identificado, os autores deste trabalho também demonstraram que a expressão do mRNA de RECK é reduzida pela atividade exacerbada de Ras (TAKAHASHI et al., 1998b). Assim, Sasahara e colaboradores (1999) descreveram o mecanismo pelo qual Ras se associava a esta regulação da expressão do gene RECK murino.

Os autores discutem que a ativação da via ERK, em consequência da ação proteína oncogênica Ras, pode facilitar a fosforilação e outras modificações de fatores de transcrição como Sp1. Estas alterações em Sp1 aumentam sua afinidade por pelo sítio de ligação na região promotora de RECK, reduzindo a sua expressão. Este trabalho ainda destacou que uma interação entre Histonas Deacetilases e Sp1 pode contribuir para a repressão gênica de RECK.

Em tempo, Sasahara e colaboradores (1999) discutem que os mecanismos de regulação da expressão de RECK podem ser específicos para cada tipo de tumor, com frequente ativação da região responsiva a Sp1 em seu promotor. De fato, já foi observado que Sp1 sofre regulação positiva em diversas neoplasias humanas e que esta proteína contribui para a transformação celular (LOU et al., 2005; KANAI et al., 2006).

RECK também pode sofrer regulação negativa pela proteína LMP-1 do vírus Epstein Barr, que atua sobre a região responsiva a Sp1 de seu promotor, mimetizando o efeito de Sp1 de inibição da expressão de RECK. Também foi visto que LMP -1 pode levar a ativação da via de sinalização ERK e que diante do uso de um inibidor desta via, observou-se uma menor repressão gênica de RECK. Estes achados implicam que proteínas virais podem regular a expressão de RECK de forma direta e indireta, embora os mecanismos pelos quais os vírus atuem nestes fenômenos exijam uma observação individual (LIU et al., 2003).

Trabalhos anteriores estabeleceram que TIMP-2 regula a expressão de RECK em células endoteliais. O tratamento destas células com TIMP-2 levou a indução da expressão de

RECK. Foi observado que esta indução está associada a níveis reduzidos da proteína Src e inativação de Rac1, o que resulta em uma inibição da migração celular e prejuízo na capacidade de deslocamento celular (OH et al., 2006).

Achados recentes demonstram que o RNAm de RECK pode sofrer *splicing* alternativo, gerando entre outras uma sequência variante, denominada de isoforma RECK B (TROMBETTA-LIMA et al., 2015). RECK B codifica uma proteína de massa teórica de 37kDa, na qual a região com atividade de inibição serinoprotease foi perdida e cujo papel fisiopatológico ainda não foi esclarecido (Figura 2). Por fim, Simizu e colaboradores (2005) demonstraram ainda que a glicosilação do resíduo específico Asn297 de RECK é essencial para a sua ação inibitória sobre MMP-9 (SIMIZU et al., 2005).

Figura 2. Representação esquemática das isoformas da proteína RECK. O número de aminoácidos está identificado acima das barras. A estrutura geral da proteína RECK consiste de uma região hidrofóbica em ambas as extremidades, cinco repetições de cisteína (6-cys repeat) próxima à região N-terminal, duas regiões com atividade similar ao fator de crescimento epidermal (EGF-like) localizadas na região central da proteína e por fim três regiões com atividade de inibição serina-protease (SPI) com a identificação de motivos de Kazal. A região C-terminal permite a ancoragem do glicosilfosfatidilinositol (GPI anchor) à membrana celular (adaptado de Takahashi et al., 1998; Noda et al., 2003; Trombetta-Lima et al., 2015).

No estudo realizado anteriormente por nosso grupo foi observado que a expressão de E7 de HPV16 em queratinócitos primários está associada à diminuição na expressão de RECK tanto em nível de RNAm quanto da proteína (CARDEAL et al., 2012). Um estudo recente descreveu que E7 de HPV16 pode induzir a formação de um complexo composto pelos fatores NFκB-p50-p65, ERα, HDAC1 e JARID1B capaz de regular negativamente a expressão de TLR9 (HASAN et al., 2013). Este complexo quando ligado ao promotor de

TLR9 reduz a metilação e acetilação de histonas a montante do sítio de início de transcrição de TLR9, levando à repressão da expressão deste gene. Esta regulação de TLR9 a partir desta formação de complexo de repressão via E7 foi ainda observada em amostras de pacientes com tumores cervicais (HASAN et al., 2013).

A partir de uma análise inicial da região promotora de RECK, observamos que o mesmo apresenta algumas sequências de ligação para NF κ B, ER, Sp1, HIF1 α e E2F entre outros fatores de regulação de transcrição gênica. A presença de sequências alvo para proteínas da família E2F no promotor de RECK é de particular interesse devido ao fato que a atividade destes fatores está alterada em células infectadas por HPV como consequência da atividade da proteína E7 sobre pRb.

De fato, uma proteína associada à pRb, pRbAp46, foi recentemente identificada como um fator de regulação de expressão de RECK em um modelo experimental de tumor de pulmão. Este estudo observou que pRbAp46 é um dos genes alvos regulados positivamente pela expressão de H-ras com a mutação na Val12. pRbAp46 se mostrou capaz de se ligar à Histona Deacetilase 1 (HDAC1) e ao fator Sp1 formando um complexo capaz de reprimir o promotor de RECK (YEH et al., 2015). Em conjunto, as observações descritas acima apoiam a hipótese de que E7 de HPV16 possa inibir a expressão de RECK através da indução de complexos repressores na região promotora deste gene. Atualmente, um estudo que analisa o promotor mínimo e sítios de fatores de transcrição necessários para a regulação da expressão do gene RECK por E7 de HPV16 está em andamento em nosso grupo.

Papéis fisiopatológicos da proteína RECK

A função de inibição de atividade de serina proteases descrita para RECK é chave para a regulação de diversos fenômenos fisiológicos incluindo a manutenção estrutural da MEC e a arquitetura regular de vasos durante a embriogênese. A regulação negativa da expressão de RECK já foi associada a alguns processos patológicos como artrite reumatoide e neoplasias (VAN LENT et al., 2005). Em ambos os casos, os dados acumulados evidenciam que este efeito observado está associado ao aumento de proteólise local e consequente maior desestruturação tecidual (NODA; TAKAHASHI, 2007).

O papel fisiológico de RECK inclui sua função essencial no remodelamento tecidual, através da regulação pós-transcricional de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP. A função de RECK é antônima ao papel de MT1-MMP na promoção da maturação da pró enzima MMP-2. Miki e colaboradores (2007) descreveram que RECK forma um complexo com MT1-MMP que leva a inibição da sua atividade proteolítica e que esta função supressora de RECK sofre efeito negativo a partir da perturbação de colesterol da membrana celular. Eles ainda demonstraram que RECK interage com CD13/aminopeptidase N e que a internalização/reciclagem tanto de MT1-MMP quando de CD13 é acelerada na presença de RECK. O mais interessante é que o mecanismo de internalização destas moléculas parece ser alterado pela interação com a proteína RECK. Na ausência de RECK, MT1-MMP e CD13 são internalizadas por endocitose associada à expressão dos marcadores Clatrina ou Caveolina e na presença de RECK a expressão destes marcadores não é detectada (MIKI et al., 2007a).

A função de RECK é necessária para o desenvolvimento embrionário normal, uma vez que facilita o remodelamento tecidual ordenado através de seu controle sobre a manutenção da MEC adjacente aos vasos e ao tubo neural. Esta observação foi fruto de um estudo com embriões de camundongos deficientes em RECK que mostrou a letalidade desta condição ao 11º dia embrionário, em média. Estes animais apresentaram organogênese interrompida, angiogênese primitiva e hemorragia abdominal. Desta forma, RECK parece ter maior papel no estabelecimento angiogênico do que na manutenção da estrutura vascular posterior à sua formação (OH et al., 2001).

A coordenação da vascularização intracerebral pela proteína RECK em modelo de *zebrafish*, envolve a modulação da via canônica de Wnt. O trabalho que descreve esta função de RECK ainda demonstrou que esta regulação positiva da via de sinalização de Wnt, ativa em células endoteliais, permite a expressão correta de marcadores moleculares associadas com a formação da barreira hemato encefálica. Estes autores ainda comentam que em modelo *in vitro* de cultivo de células endoteliais, a deleção do gene RECK está associada a uma redução da capacidade de formação de vasos via regulação negativa de VEGF (ULRICH et al., 2016).

RECK tem sido apontado como essencial na supressão de dois componentes centrais no processo metastático, as MMP e a angiogênese tumoral. Alguns estudos descrevem baixos níveis de expressão relativa de RECK em pelo menos 19 linhagens celulares transformadas e em diversas neoplasias humanas, em comparação ao tecido normal adjacente. Por outro lado,

nos tumores onde são detectados níveis elevados da proteína RECK se observa redução na invasão local, diminuição no número de metástase e um melhor prognóstico global (TAKAHASHI et al., 1998b; OH et al., 2001; SASAHARA et al., 2002; TAKAGI; SIMIZU; OSADA, 2009a; ALEXIUS-LINDGREN et al., 2014).

A regulação negativa da expressão de RECK tem sido observada, de maneira consistente, em linhagens celulares derivadas de tumores e em pacientes com diversos tipos de tumores malignos (TAKAHASHI et al., 1998b). A baixa expressão de RECK também tem sido associada a fenótipos característicos de células tronco tumorais em adenocarcinoma gástrico. Este tipo de tumor apresenta uma frequente regulação negativa da expressão de RECK e isto parece ser acentuado entre as células tumorais positivas para CD133, uma molécula associada ao fenótipo de célula tronco tumoral. De forma alternativa, estes autores observaram que a superexpressão de RECK induz a regulação negativa de outros genes associados ao perfil de célula tronco tumoral incluindo Sox2, Oct4 e Nanog além de CD133. Por fim, a superexpressão de RECK leva à supressão da formação e tamanho de esferoides em ensaios com células tumorais gástricas positivas para CD133, além de reduzir o potencial tumorigênico destas células *in vivo* (HONG et al., 2014a).

A expressão de RECK também parece apresentar papel prognóstico para alguns tipos de tumores incluindo alguns tipos de tumores de mama (NAGINI, 2012). Para este último caso, a baixa expressão de RECK foi correlacionada à maior capacidade de formação de vasos, invasão e surgimento de metástases locais e à distância em modelos animais (WALSH et al., 2015b). O papel prognóstico da expressão de RECK já foi reportado em estudos realizados em câncer de mama, fígado, nasofaringe, pâncreas, cólon, pulmão e ainda em melanoma, fibrosarcoma e glioma (TAKAHASHI et al., 1998b; MASUI et al., 2003; TAKENAKA et al., 2004; TAKEUCHI et al., 2004a; CHEN; TSAI; TSENG, 2012; CHUNG et al., 2012; ZHANG et al., 2012b; ZHOU et al., 2014; WALSH et al., 2015a). No entanto, pouco se sabe sobre o potencial terapêutico de RECK em tumores humanos.

Alterações da expressão/atividade de MMP em tumores de colo de útero

A infecção por HPV tem sido associada a diversas alterações na organização e arquitetura do tecido infectado, incluindo a perda do controle da expressão e atividade das metaloproteinases da matriz (MMP). Diversos estudos têm sugerido que um dos mecanismos

de progressão do carcinoma cervical envolve o aumento da expressão e atividade de MMP pelas células do tecido tumoral e/ou do estroma. Além disso, o aumento da atividade de degradação de componentes da matriz extracelular (MEC) por ação de MMP tem sido associado com o crescimento tumoral e metástase neste tecido (ITOH; NAGASE, 2002).

Alterações na atividade proteolítica e consequente degradação de MEC têm sido descritas em diversos tumores malignos humanos. Em muitos casos foi verificada a participação de MMP desde os primeiros estágios da tumorigênese (STERNLICHT; WERB, 2001; BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002; EGEBLAD; WERB, 2002). Muitos estudos também têm demonstrado que as MMP são capazes de regular a função de moléculas que interagem com o microambiente tumoral, incluindo fatores de crescimento e seus receptores, citocinas, quimiocinas, receptores de adesão, enzimas e proteoglicanos de membrana (EGEBLAD; WERB, 2002; SINGER et al., 2002; MAREEL; LEROY, 2003; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010).

De fato, foi observado que as MMP regulam apoptose e possuem atividade angiogênica. Por exemplo, MMP-9 tem sido apontada como essencial para a formação de “nicho metastático” nos tumores malignos (STERNLICHT; WERB, 2001). Ainda, as MMP são secretadas por diferentes células do microambiente tumoral que incluem o epitélio transformado, estroma adjacente, células inflamatórias, células endoteliais e fibroblastos (STERNLICHT; WERB, 2001; KAPLAN et al., 2005). Alguns trabalhos descrevem uma alta expressão de MMP-2 e MMP-9 em lesões pré-neoplásicas e em câncer do colo do útero e seu papel no processo de invasão, metástase e recorrência de tumores (DAVIDSON et al., 1999; BRUMMER et al., 2002; KATO; YAMASHITA; ISHIKAWA, 2002; SHEU et al., 2003; NASR et al., 2005; BRANCA et al., 2006; RAUVALA et al., 2006; LIBRA et al., 2009; NO et al., 2009; KAEWPRAAG et al., 2013). Neste sentido, foi observado que durante a progressão tumoral, há um aumento significativo da expressão de MMP por diversas células do microambiente, incluindo as células neoplásicas.

Sheu e colaboradores (2003) demonstraram que mais de 90% dos carcinomas de células escamosas de cérvix uterina apresentam alta expressão de MMP-2 e MMP-9. Enquanto que esta alta expressão somente foi detectada em 13% dos epitélios escamosos normais (SHEU et al., 2003). Por fim, o nosso grupo também estudou a expressão de MMP-9 em pacientes com lesões CIN ou carcinomas invasivos de colo de útero. Os dados gerados

apontam para o aumento dos níveis proteicos de MMP-9 nas amostras de carcinoma invasivo quando comparadas a CIN-1 ou ao tecido cervical normal (DISCACCIATI et al., 2015).

Justificativa

Resultados publicados previamente por nosso grupo mostram que as oncoproteínas E6 e E7 de HPV16 afetam a expressão e atividade tanto de MMP quanto de seus reguladores, TIMP e RECK (DA SILVA CARDEAL et al., 2006; CARDEAL et al., 2012). Neste estudo foi mostrado que a expressão conjunta de E6 e E7 de HPV16 induz o aumento da atividade de MMP-9, ao mesmo tempo em que inibe os níveis de TIMP-2 e RECK. Este foi o primeiro estudo que demonstrou que as atividades de MMP-9 e RECK podem ser reguladas pelas oncoproteínas E6 e/ou E7 de HPV em um modelo de queratinócitos primários em cultura organotípica. Este estudo mostrou ainda que a baixa expressão de RECK também ocorre em pacientes com lesões de alto grau do colo do útero e câncer cervical, mas não em pacientes com cervicite (Cardeal et al., 2012). Esta última observação aponta para o possível papel de marcador de prognóstico da proteína RECK no carcinoma cervical em concordância com os resultados obtidos para neoplasias em outros tecidos (FURUMOTO et al., 2001; SPAN et al., 2003; TAKEUCHI et al., 2004b; SONG et al., 2006; VAN DER JAGT et al., 2006).

Resultados obtidos em outros estudos corroboram com estes achados. Por exemplo, foi apontado anteriormente que células expressando E7 de HPV18 apresentam regulação positiva de MMP-9 a partir da ativação da via de sinalização MEK/ERK (YOSHIDA et al., 2008). Ainda, um estudo a partir da linhagem HeLa, onde a oncoproteína E6 foi silenciada com siRNA específico, observou a regulação positiva de diversos genes, incluindo RECK (MIN et al., 2009). Os mecanismos pelos quais E6 e E7 podem interferir na expressão de RECK ainda não estão devidamente caracterizados.

Os tumores de colo de útero apresentam um prognóstico desfavorável com uma taxa de recidiva e metástase a distância que varia entre 15 a 61% das pacientes (ELIT et al., 2010). A abordagem terapêutica adotada classicamente para esta neoplasia inclui radioterapia e quimioterapia, pós-intervenção cirúrgica. Esta lacuna de terapias para câncer de colo de útero mantém em aberto a definição de um protocolo de tratamento que leve em consideração as alterações moleculares associadas à infecção persistente pelo HPV e o processo de transformação celular.

Um estudo realizado por nosso grupo mostrou que os níveis da proteína RECK diminuem de maneira progressiva de acordo com o grau de lesões da cérvix uterina. Nesse estudo observamos que amostras de lesões de baixo grau apresentam maiores níveis de RECK que lesões de alto grau e câncer invasivo (CARDEAL et al., 2012; DISCACCIATI et al., 2015). Diante destas observações sugerimos que regulação negativa de RECK pode ser uma peça chave na história natural do câncer cervical.

Portanto, o presente estudo visa determinar o papel de RECK no processo de tumorigênese mediado por HPV. Além disso, os dados gerados poderão contribuir a determinar o valor prognóstico e terapêutico RECK em tumores associados a este vírus.

Objetivo principal:

- Avaliar o papel da proteína RECK no processo de tumorigênese mediado por HPV.

Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da superexpressão das proteínas RECK e RECK B na capacidade de invasão, migração, crescimento e proliferação destas linhagens;
- Avaliar a capacidade destas linhagens de gerar tumores em camundongos imunodeficientes e caracterizar a cinética de crescimento dos tumores obtidos a partir das diferentes linhagens;
- Caracterizar o infiltrado inflamatório nos tumores obtidos;

Material e Métodos

Transformação bacteriana

O protocolo de transformação bacteriana utilizado se baseou no choque térmico para a entrada do plasmídeo de interesse em bactérias competentes da cepa DH5 α de *Escherichia coli*. A aquisição de competência pelas bactérias se iniciou a partir da cultura de uma alçada de DH5 α (congelada em estoque a -80°C) em 3ml de meio LB com crescimento overnight em incubadora refrigerada com agitação (Novatécnica, BRA) a 220rpm e 37°C e do cultivo de 10% deste volume em 10ml de meio LB fresco durante duas horas. Esta etapa do processo permitiu que as bactérias em cultura alcançassem o ponto de fase de crescimento denominado log ou exponencial, quando é aumentada a eficiência de captação e incorporação do plasmídeo por parte da *E. coli* por quimiocompetência. A determinação da fase de crescimento log ocorreu por meio de leitura de densidade ótica de 600nm em espectrofotômetro com uma alíquota de 1ml da cultura em suspensão em cubeta de capacidade de 1ml. A cultura de bactérias foi aliquoteada de forma que fosse reservado 1,5ml de cultura para cada vetor utilizado no processo de transformação. Uma vez aliquoteada em microtubos de 1,5 ml as células foram recuperadas por uma centrifugação a 5000rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet formado pelas células foi ressuspensão em 500 μ l de Solução I (10 mM MOPS, 10 mM KCl– pH 7,0) e os tubos passaram por nova centrifugação a 5000rpm por 2 minutos quando se seguiu uma nova etapa de descarte de sobrenadante e o pellet foi ressuspensão em 500 μ l de Solução II (100mM MOPS, 10mM KCl, 50mM CaCl₂– pH 6.5) e incubado em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 5000rpm por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi mais uma vez descartado, o pellet foi ressuspensão em 100 μ l de Solução II e se adicionou o volume de 3 a 5 μ l do vetor plasmidial em uso. Esse preparado foi incubado em banho de gelo durante uma hora e ocorreu o choque térmico a 42°C durante 2 minutos em placa térmica úmida ISOTEMP[®] (ThermoFisher Scientific, EUA). Em seguida, os tubos foram incubados em banho de gelo durante 5 minutos, 500 μ l de meio fresco LB foi adicionado e ocorreu a etapa de recuperação em agitador a 220rpm e 37°C durante uma hora. Durante este período foram preparadas as placas de Petri contendo meio LB ágar e o antibiótico de seleção, ampicilina (75 ug por ml), onde foram semeadas com alça de Drigalski as bactérias que sofreram transformação com cada vetor utilizado. O cultivo destas bactérias ocorreu em placa invertida

em estufa *ISOTHERM® Incubator* (Fisher Scientific, EUA) a 37°C durante 14 a 16 horas para a formação de colônias monoclonais das bactérias transformadas.

Extração de DNA plasmidial

O procedimento de extração de DNA plasmidial foi realizado utilizando o kit comercial *GenElute™ HP Plasmid Miniprep kit* (Sigma-Aldrich, EUA), segundo instruções do fabricante. Resumindo, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura LB, recuperadas por centrifugação e concentradas no menor volume possível de solução de ressuspensão contendo RNase A. As células foram rompidas por uma solução de lise alcalina e seu conteúdo liberado, formando um extrato celular. A lise celular foi interrompida por uma solução de neutralização e ao extrato celular foi adicionada uma solução de ligação à coluna utilizada para o isolamento e purificação do DNA plasmidial em uso. Após a lavagem com soluções contidas no kit comercial, o DNA foi retirado da coluna com uma solução de eluição e mantido a -20°C até o seu uso.

Eletroforese em gel de agarose

A integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% em 30 ml de TAE 1X (Sambrook et al., 1989) e 3,0 µl de corante intercalante GelRed (INVITROGEN, EUA). A 1 µL de DNA foram adicionados 5 µL de água e 1 µL de tampão de carregamento 6X, sendo toda a mistura aplicada no gel. O tampão de carregamento é composto de 50% glicerol (V/V), 0,25% azul de bromofenol (P/V) e 0,25% xileno cianol (P/V). A eletroforese foi realizada por 30 minutos a 5V/cm² em cuba horizontal (Biorad, EUA). Os fragmentos de DNA foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta. As imagens foram registradas por sistema de foto documentação *MultiDoc-It™ 120 Imaging System* (UVP, UK).

Cultura de células

As linhagens celulares derivadas de tumores da cérvix uterina positivos para HPV16 (SiHa e CasKi), HPV18 (HeLa e SW756) e HPV negativa (C33A) foram cultivadas em meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (M10), em estufa úmida, a 37°C, e com 5% de CO₂. A linhagem derivada de células renais embrionárias humanas imortalizadas,

HEK293T, foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (D10), em estufa úmida, a 37°C, e com 5% de CO₂.

Obtenção de células que superexpressam RECK

Transfecção com o uso de plasmídeos para produção de lentivírus

Para a superexpressão de RECK foi utilizado o vetor lentiviral p156RRLsinPPCCMVIns3IRESPRC, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar (Núcleo de Estudos e Terapias Celular e Molecular - NUCEL, Universidade de São Paulo). Este vetor foi devidamente caracterizado (Verma, Salk Institute for Biological Studies – CA, USA; Trombetta-Lima *et al.*, 2015) e daqui por diante será denominado pLV EGFP.

Obtenção de partículas lentivirais

A obtenção de partículas lentivirais foi realizada através de transfecção utilizando Lipofectamina 3000® (Life Technologies, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante, com modificações, e os plasmídeos de empacotamento p59, p60 e p61 (Naldini *et al.*, 1996). Para cada vetor utilizado, foram plaqueadas 1×10^6 células HEK293T em placas de Petri de 100 mm com 10 ml de meio D10 e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado às células 12ul de Lipofectamina 3000®, 16ul de p3000 fornecidas pelo fabricante, 2,0 ug de cada plasmídeo p59, p60 e p61 e 2,0 ug do vetor lentiviral em uso. Após 24 e 48 horas, as culturas foram monitoradas para a eficiência de transfecção a partir da detecção de sinal EGFP em microscópio de fluorescência (EVOS®FL, AMG, EUA). Após 48 e 72 horas da transfecção os sobrenadantes contendo os lentivírus foram coletados e conservados a -80°C até o momento da infecção.

Infecção das linhagens tumorais a partir de lentivírus

A infecção foi realizada a partir de $2,5 \times 10^4$ células, das linhagens HeLa, SiHa, SW756, CasKi e C33, semeadas em placas de cultivo de 96 poços com 200µl de meio M10 e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A infecção foi realizada com 200µl de sobrenadante contendo lentivírus e adição de polibreno (4µg/ml) (Sigma-Aldrich,

EUA). Após 24 horas o meio foi substituído por 200µl de meio M10 fresco. A eficiência de infecção foi monitorada após 24 e 48 horas, a partir da detecção de sinal de EGFP em microscópio de fluorescência (EVOS®FL, AMG, EUA). As culturas foram expandidas e estocadas em criotubos em nitrogênio líquido até o momento de re-cultivo e citometria de fluxo.

Obtenção de células expressando RECK através de FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*)

Anterior ao FACS foi realizada a citometria de fluxo para verificar a presença de uma subpopulação de células transduzidas, cuja intensidade de emissão de fluorescência no espectro de FITC fosse distinguível da emissão de autofluorescência das células parentais. Adotamos o critério sistemático de que esta diferença de intensidade deveria ser de pelo menos uma ordem de grandeza.

Após *sorting* associado à máscara de pureza com alta estringência, as células consideradas EGFP⁺ foram reservadas em tubos de ensaio Falcon de 15ml, contendo 5ml de meio M10 adicionado de antibiótico penicilina/streptavidina (10 vezes concentrado – 10X), e mantidas em gelo até o replaqueamento em placas de seis poços. Estas células foram cultivadas por 24 horas em meio contendo antibiótico 10X para garantir que as mesmas não foram contaminadas por manipulação no momento da separação. É válido ressaltar que, além do equipamento de FACS utilizado (BD FACSAria™ II U, EUA) ter padrão asséptico, a sala de realização de FACS é uma “sala limpa/estéril” esterilizada sistematicamente com radiação ultravioleta.

Análise de expressão protéica: Western blot

A extração de proteínas das culturas celulares em monocamada e dos tumores gerados em animais foi realizada mediante lise celular em tampão hipotônico RIPA (150 mM NaCl, 50mM Tris HCl – pH 7,5, 0,5% NP-40, 0,1mM EDTA) suplementado de inibidores de protease (Complete Mini, Roche Diagnostics) e posterior separação da fração proteica por centrifugação a 4°C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad, EUA), com uso de curva padrão de albumina (BSA).

As amostras de proteína purificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% com o uso do sistema mini-Protean II Cell (Bio-Rad, EUA). As amostras eletrotransferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF, Hybond-P, Amersham, EUA) foram analisadas na presença de anticorpos específicos para proteínas RECK (110kDa, Cell Signalling, diluição 1:1000 ou BD, diluição 1:2500) e Tubulina (55kDa, Sigma-Aldrich, diluição 1:10000). Após incubação com anticorpo secundário pertinente, a revelação foi feita em filmes radiográficos por quimioluminiscência utilizando o kit ECL (Amersham, EUA).

Ensaio clonogênico

Células das linhagens SiHa, SW756 e C33A transduzidas com os vetores lentivirais para a superexpressão de RECK e seus controles foram semeadas em triplicatas em placas de 6 poços (100 células/poço). As células foram cultivadas em meio M10 por 15 dias em estufa úmida a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após este período as colônias foram fixadas com solução de etanol 70% (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), coradas com 0,5% de cristal violeta (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) em solução de 10% de etanol e contadas.

Ensaio clonogênico em soft ágar

Para análise do crescimento independente de ancoragem, 250 células das linhagens SiHa, SW756 e C33A transduzidas com os vetores lentivirais para a superexpressão de RECK e seus controles foram suspensas em 500µL de meio M10 com 0,6% de agarose e semeadas numa placa de 24 poços preparada com 500µL de agarose 1% e, após incubação de uma hora em temperatura ambiente, coberta com meio M10. O meio de cultura foi substituído a cada 72 horas e após 30 dias foi adicionado 50µL de MTT 5mg/ml (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em cada poço para a coloração e contagem das colônias.

Cinética de crescimento

Células das linhagens SiHa, SW756 e C33A transduzidas com os vetores lentivirais para a superexpressão de RECK e seus controles foram semeadas em placas de 24 poços (10000 células / poço), acrescidas de 1ml de meio M10 e cultivadas de 1 a 8 dias em estufa

úmida a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. A proliferação celular foi avaliada a cada 24 horas, pela contagem celular em triplicata, utilizando-se o hemocítômetro.

Capacidade de migração em câmara e de invasão em Matrigel.

Células das linhagens SiHa, SW756 e C33A transduzidas com os vetores lentivirais para a superexpressão de RECK e seus controles foram ressuspensas em meio MEM e adicionadas nos compartimentos superiores dos Transwells (50000 células / câmara). Na câmara inferior do Transwell foi adicionado M10 para atração quimiotática, seguido da incubação das placas por 12h a 37°C. A capacidade de migração das linhagens celulares foi avaliada através da capacidade destas células transporem uma barreira de poros de 8µm (Corning Incorporated, EUA). Após lavagem e fixação das porções inferiores dos Transwells, as células restantes sobre a camada superior da barreira foram removidas. As células que migraram através dos poros da barreira foram fixadas com solução de 70% de etanol (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), coradas com 0,5% de cristal violeta (Fisher, Waltham, MA, EUA) em solução de 10% de etanol e contadas.

De maneira semelhante, a capacidade invasiva das linhagens celulares estudadas foi avaliada através da capacidade destas células transporem uma barreira de Matrigel® (BD Biosciences, EUA) gelificado sobre placas Transwell de poros de 8µm (Corning Incorporated, EUA). As células foram processadas da mesma forma que no ensaio de migração em câmara, acima.

Capacidade de formação de esferoides tumorais

Para a geração dos esferoides de SiHa, SW756 e C33A transduzidas com os vetores lentivirais para a superexpressão de RECK e seus controles, foram cultivadas 5×10^3 ou 15×10^3 células sobre uma cama de 1% agarose em PBS em placas de 96 poços por sete dias em meio M10. O meio de cultura foi renovado a cada 48h e a formação de esferóide foi monitorada ao fim do ensaio, a partir da detecção de sinal de EGFP em microscópio de fluorescência (EVOS®FL, AMG, EUA). A proliferação e a viabilidade celular foi avaliada após este período, pela contagem celular em triplicata com o corante Azul de Tripán 1:10, utilizando-se o hemocítômetro.

Medida da capacidade das linhagens que superexpressam RECK de gerar tumores em camundongos imunodeficientes

Cinética de crescimento tumoral em camundongos nude

Todos os experimentos envolvendo camundongos foram realizados em condições livres de patógenos específicos no Biotério de Camundongos Isogênicos de Departamento de Imunologia. Todos os experimentos em modelo animal foram realizados sob supervisão e treinamento pela profª Ana Paula Lepique (Departamento de Imunologia, ICB/USP).

Para avaliação da cinética de crescimento de tumores com superexpressão de RECK, 2×10^6 células da linhagem SiHa controle e com superexpressão de RECK foram injetadas s.c. nos flancos dorsais de camundongos fêmeas da linhagem nude (dez animais por grupo). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA; protocolo número 138, folha 13 do livro 03) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. A partir do trigésimo dia após a injeção, os tumores foram avaliados a cada dois dias. O volume tumoral foi calculado utilizando-se a fórmula $V = D \cdot d^2 / 2$, onde V é volume tumoral, D é o maior diâmetro medido e d o menor diâmetro medido. Quando o volume tumoral alcançou 500 mm^3 , os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia. Os tumores foram coletados imediatamente e processados convenientemente para os diferentes tipos de análises.

Análise de populações celulares intratumorais por citometria de fluxo

O material tumoral extraído foi medido com paquímetro, mantido em solução Hank (15mmol/L HEPES – pH 7.4, 0.5U/mL DNase (Worthington, EUA) e 5% de soro fetal bovino) e fragmentado mecanicamente com um bisturi estéril. A suspensão de células foi obtida a partir de dissociação dos fragmentos de massa tumoral com colagenase I (0,5mg/mL) em um agitador térmico à 37°C (Thermomixer – Eppendorf, EUA). Em seguida, as células foram filtradas com filtro de 70µm, contadas em câmara de Neubauer e marcadas com os anticorpos primários específicos para cada molécula de superfície sob investigação. Pelo menos 1×10^6 células suspensas foram marcadas com os anticorpos específicos descritos na Tabela 01.

Tabela 1. Descrição dos anticorpos utilizados na citometria de fluxo.

Especificidade do anticorpo	Clone	Fluoróforo	Origem
CD31	ZEH01	APC-Cy7	R&D Systems
CD45.2	104	APC	BD Biosciences
Ly6C	HK1.4	PE	eBiosciences
Ly6G	1A8	PE-Cy7	BD Biosciences
F4/80	BM8	PE-Cy5	eBiosciences
CD49b	DX5	APC-Cy7	BD Biosciences

A fixação das células previamente marcadas e a avaliação do conteúdo de DNA para análise do ciclo celular com o uso de DAPI foi realizada como descrito anteriormente (Gordon *et al.*, 2003). As células foram fixadas em solução 1% de formaldeído fresca *overnight* e, após lavagens com solução salina (PBS 1X), foram marcadas com DAPI 1:500 por 30 minutos ao resguardo da luz. A aquisição de dados de citometria de fluxo foi realizada em FACScalibur, com o software CellQuest (BD Biosciences, EUA). A análise de dados foi realizada pelo software FlowJo (Tree Star, EUA).

Análise estatística

Os experimentos *in vitro* foram analisados pelo teste não paramétrico Mann-Whitney e as análises por citometria de fluxo foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis. As análises de diferenças de volume tumoral entre os grupos foram realizadas com o teste de Wilcoxon. Todas as análises estatísticas foram realizadas com GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

Análise de expressão global de conjuntos de dados (datasets) da plataforma GEO

Os conjuntos de dados de expressão de amostras clínicas de colo de útero denominados GSE7803, GSE9750, GSE51993, GSE75132, GSE39001, GSE26511, GSE3578 foram recuperados a partir da plataforma online Gene Expression Omnibus (GEO

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). As análises estatísticas foram realizadas com GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). Foi realizada a análise de *One-way* ANOVA com teste de Kruskal-Wallis para comparar os grupos de dados dentro de cada conjunto. Todos os testes estatísticos utilizados foram bicaudais. Todos os conjuntos de dados foram analisados em relação aos possíveis valores discrepantes (*outliers*) utilizando o *site* <https://graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/>. Foi considerado estatisticamente significativo todo valor de p inferior a 0,05.

Resultados

Aquisição de células puras positivas para a marcação de EGFP por FACS

A obtenção de partículas lentivirais com os vetores lentivirais pLVEGFP, pLVRECK, pLVRECKB e a transdução das linhagens SiHa, HeLa, C33A, SW756 e CasKi foi realizado conforme descrito na seção anterior. Em seguida, foi realizado o FACS com nozzle de 70 µm e adotado como critério uma máscara de pureza *single cell*. A voltagem aplicada para cada etapa de FACS foi anotada e a (i) aquisição de dados de morfologia (tamanho e granulosidade), (ii) viabilidade e (iii) qualidade de dissociação das células (*single cells*) foi realizada com pelo menos 50000 eventos. No total, foram realizadas três etapas seriadas de FACS para enriquecimento e purificação de células EGFP+ dissociadas a partir da cultura das linhagens transduzidas. As linhagens transduzidas e as linhagens parentais foram comparadas por citometria de fluxo como forma de controle de autofluorescência da etapa de FACS. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 2, que mostra a eficiência geral do procedimento.

Tabela 2. Determinação do enriquecimento da população de células dissociadas EGFP+ das linhagens SiHa, HeLa, C33A, SW756 e CasKi por citometria de fluxo com leitura de fluorescência no espectro FITC.

Linhagem	Eficiência da primeira etapa de FACS (%)	Eficiência da terceira etapa de FACS (%)
SiHa pLVEGFP	1,6	80,0
SiHa pLVRECK	5,4	96,2
SiHa pLVRECKB	43,5	94,1
HeLa pLVEGFP	0,1	95,6
HeLa pLVRECK	0,1	40,5
HeLa pLVRECKB	4,5	95,3
C33A pLVEGFP	0,6	79,3
C33A pLVRECK	0,4	84,2
C33A pLVRECKB	43,9	91,1
SW756 pLVEGFP	46,7	90,5
SW756 pLVRECK	4,4	92,1
SW756 pLVRECKB	49,7	89,8
CasKi pLVEGFP	65,8	92,9
CasKi pLVRECK	6,6	40,2
CasKi pLVRECKB	56,1	95,3

Os dados sobre a eficiência de transdução e de FACS mostram que existe uma grande variação nos resultados obtidos para as diferentes linhagens utilizadas (Tabela 2). De maneira consistente, a maior eficiência de transdução foi observada para as linhagens SiHa e SW756 e isto foi refletido pelo enriquecimento obtido após três procedimentos de FACS. Obteve-se ainda uma eficiência satisfatória para C33A, intermediária para CasKi e uma eficiência muito baixa para HeLa. Observamos que o rendimento aparente da transdução com o vetor de superexpressão da isoforma RECK B foi muito superior aos demais em todas as linhagens utilizadas, embora também muito baixo em HeLa. Em tempo, as linhagens transduzidas de HeLa e CasKi não foram incluídas nas análises seguintes diante da baixa eficiência de enriquecimento de células EGFP+ após diversas etapas de FACS.

Detecção de proteínas RECK por Western blot

Uma vez tendo estabelecidas as culturas e estoques de células SiHa, SW756 e C33A EGFP+ enriquecidas em nosso laboratório, realizamos ensaios de *Western blotting* (WB) para confirmar a superexpressão de RECK exógena via transdução com os vetores pLVXEGFP. A obtenção dos extratos proteicos, a quantificação de proteínas totais, a eletroforese em gel

SDS-PAGE seguida de imunomarcção para as proteínas RECK e Tubulina com anticorpos específicos foram realizados conforme como descrito em Material e Métodos. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3. A partir destes dados foi confirmada a superexpressão da proteína RECK nas linhagens SiHa SW756 e C33A. A marcação para RECK está de acordo com a massa esperada para esta proteína (RECK ≈ 110 kDa; Tubulina ≈ 55 kDa).

Figura 3. Validação da superexpressão da proteína RECK nas linhagens SiHa, SW756 e C33A. A superexpressão de RECK foi verificada por Western blot em extratos totais de células das linhagens SiHa, SW756 e C33A nas diferentes condições investigadas. Sessenta microgramas de proteínas totais foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% na presença de SDS (ou a SDS-PAGE) seguido de imunomarcção para as proteínas RECK e Tubulina com anticorpos específicos. E: Células transduzidas com pLVEGFP; R: Células transduzidas com pLVRECK.

Análise do efeito da superexpressão de RECK na cinética de crescimento das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A

Como descrito na seção Materiais e Métodos, foram realizados ensaios *in vitro* com o objetivo de compreender se a superexpressão de RECK afeta o potencial tumorigênico de células SiHa, SW756 e C33A. Como primeiro parâmetro, avaliamos a cinética de proliferação das células das linhagens utilizadas em face da superexpressão de RECK como descrito na seção anterior. A cinética de crescimento de nenhuma das linhagens analisadas sofreu alterações diante da superexpressão de RECK ou RECK B em oito dias de observação em intervalos de 24 horas, como demonstrado na Figura 4.

Figura 4. Análise do efeito da superexpressão de RECK na cinética de crescimento das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A. O ensaio de cinética de crescimento foi realizado a partir da semeadura de 1×10^4 células de cada linhagem em placas de 24 poços mantidas em cultura em estufa úmida a 37°C por 8 dias. A contagem de cada linhagem foi realizada em triplicata com o uso de hemocítômetro a cada 24 horas de cultura.

Análise do efeito da superexpressão de RECK na capacidade de formação de colônias, de migração em câmara e de invasão em câmara de Matrigel® das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A

Com o intuito de continuar a verificar o efeito da superexpressão de RECK no potencial tumorigênico das linhagens celulares estudadas, realizamos ensaios de formação de colônias, de migração em câmara e de invasão em câmara de Matrigel®. As condições dos ensaios foram descritas anteriormente. A capacidade de formação de colônia de nenhuma das linhagens analisadas sofreu alterações diante da superexpressão de RECK ou RECK B, com exceção do aumento do potencial clonogênico de SW756 RECK B em comparação com seu controle EGFP ($p=0,0267$) (Figura 5A).

Em relação à análise de migração em câmara, a superexpressão de RECK gerou uma redução da capacidade de migração de SiHa ($p=0,0009$), mas não de SW756 ou C33A. Por outro lado, a superexpressão de RECK B levou a redução da migração de células SiHa ($p=0,0024$) e ao aumento da migração de células C33A ($p=0,0022$), mas não gerou alteração na migração de células SW756 (Figura 5B).

Os resultados do ensaio de invasão mostram claramente que a superexpressão de RECK está associada à perda da capacidade invasiva de SiHa ($p=0,0262$), SW756 ($p=0,0023$) e C33A ($p=0,0353$). Novamente, a superexpressão de RECK B apresentou resultados conflitantes nas diferentes linhagens estudadas. No caso da linhagem SW756, a superexpressão de RECK B levou à redução da sua capacidade de invasão ($p=0,0338$), enquanto que as células C33A RECK B apresentaram maior capacidade de invasão quando comparado ao seu controle ($p=0,0025$) e as células SiHa não apresentaram diferença no seu potencial invasivo (Figura 5C).

Figura 5. Análise do efeito da superexpressão de RECK na capacidade de formação de colônias, migração e invasão em câmara das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A. A. O ensaio clonogênico foi realizado a partir da semeadura de 1×10^2 células de cada linhagem em placas de 60 mm e mantidas em cultura em estufa úmida a 37°C por pelo menos 15 dias. Os ensaios de migração (B) e invasão (C) foram realizados a partir da semeadura de 5×10^4 células de cada linhagem em câmaras posicionadas sobre poços de placas de 24 poços e mantidas em cultura em estufa úmida a 37°C por 36h. Para o ensaio de invasão o fundo das câmaras era recoberto com Matrigel®. Após este período as colônias foram fixadas com solução de etanol 70% (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), coradas com 0,5% de cristal violeta (Fisher, Waltham, MA) em solução de etanol 10%, e contadas. Os resultados são apresentados como porcentagem relativa ao respectivo controle (células transduzidas apenas com o vetor pLVEGFP).

Análise do efeito da superexpressão de RECK na capacidade de formação de colônias independente de ancoragem e na formação de esferóides das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A

A segunda fase de análises *in vitro* do efeito da superexpressão de RECK sobre o potencial tumorigênico das linhagens tumorais estudadas incluiu ensaios de cultura celular em diferentes modelos 3D. Desta forma, fomos capazes de avaliar se a superexpressão de RECK poderia impactar (i) no estabelecimento de colônias e/ou esferas ou (ii) na proliferação/viabilidade de células cultivadas independente de ancoragem.

No primeiro modelo de cultivo, realizamos o plaqueamento das células tumorais transduzidas em placas recobertas com 1% de agarose em M10. As células foram ressuspensas em agarose 0,6% em M10, semeadas sobre agarose 1% solidificada e o cultivo foi mantido por até 30 dias para observação da formação de colônias a partir de células isoladas na matriz de agarose. A superexpressão de RECK levou a uma redução importante na capacidade de formação de colônias independente de ancoragem de SiHa ($p=0,0003$), SW756 ($p=0,0381$) e C33A ($p=0,0135$). De forma interessante, a superexpressão de RECK B levou a resultados semelhantes para este ensaio para SiHa ($p=0,0035$) e SW756 ($0,0192$), mas não para C33A (Figura 6A).

Ainda, o segundo modelo de cultivo independente de ancoragem foi realizado a partir do protocolo de formação de esferóides para avaliar o efeito da superexpressão de RECK (i) no número de células e (ii) na viabilidade destas células tumorais. Para tal, realizamos o plaqueamento das células tumorais transduzidas em placas com fundo U recobertas com agarose 1%. As células foram semeadas sobre a agarose solidificada, sedimentadas no fundo da placa por centrifugação e o cultivo foi mantido por sete dias para observação da formação de esferoide sólido independente de ancoragem. Observamos um efeito consistente de redução do número de células nos esferóides gerados a partir de células SiHa (RECK – $p=0,0159$; RECK B – $p=0,0317$) e SW756 (RECK – $p=0,0119$; RECK B – $p=0,0195$) superexpressando RECK ou RECK B em relação aos seus controles, mas não para C33A (Figura 6B). Por fim, a viabilidade das células semeadas para a formação de esferóides se mostrou reduzida somente para SW756 RECK quando comparada ao seu controle EGFP ($p=0,0358$), mas não para SiHa ou C33A (Figura 6C).

Figura 6. Análise do efeito da superexpressão de RECK na capacidade de crescimento independente de ancoragem e de formação de esferóides das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A. A. O ensaio de formação de colônia independente de ancoragem foi realizado a partir da semeadura de $2,5 \times 10^2$ células de cada linhagem em agarose 0,6% em placas de 24 poços recobertas com agarose 1% e mantidas em cultura em estufa úmida a 37°C por pelo menos 30 dias. Ao final do experimento, as colônias foram coradas com 50 μ l de MTT 1mg/ml (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) por três horas em estufa úmida a 37°C. B e C. O ensaio de formação de esferóides foi realizado a partir da semeadura de 5×10^4 células de cada linhagem em placas de 96 poços com fundo U recobertas com agarose 1% e mantidas em cultura em estufa úmida a 37°C por 7 dias. Ao final deste período, o número de células por esferóide (B) e sua viabilidade (C) foram determinados mediante o uso do corante Azul de Tripán 1:10 e contagem manual com o uso de hemocítômetro de cada linhagem em triplicata.

Análise do efeito da superexpressão de RECK no estabelecimento tumoral e na cinética de crescimento tumoral em camundongos nude injetados com células das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A

Na etapa seguinte etapa foi analisado o efeito da superexpressão da proteína RECK no estabelecimento tumoral das linhagens analisadas em camundongos *nude*. Para isto, 2×10^6 células foram injetadas no flanco de pelo menos dez animais por grupo (Tabela 3). Os animais foram avaliados a partir do quinto dia após a injeção *s.c.* das células. O tempo de estabelecimento tumoral foi definido pelo intervalo entre a injeção das células e o surgimento de tumores mensuráveis com paquímetro. Desta forma, observamos que a superexpressão de RECK levou a um atraso significativo no tempo de estabelecimento de todas as linhagens avaliadas conforme descrito na Tabela 3 e na Figura 7A, B e C. A razão de chances de estabelecimento tumoral para as linhagens transduzidas com pLVEGFP foi de 13,92 vezes maior para SiHa, 15,75 vezes maior para SW756 e de 3,535 vezes maior para C33A do que para as linhagens transduzidas com RECK.

Tabela 3. Análise do efeito da superexpressão de RECK sobre o tempo de estabelecimento tumoral após a injeção *s.c.* de células tumorais em camundongos *nude*.

		EGFP vs. RECK		
		Mediana de dias após a injeção	Valor de p	Hazard ratio
Estabelecimento	SiHa EGFP	36	<0,0001	13,92 (3,777 – 51,32)
	SiHa RECK	50		
	SW756 EGFP	7	<0,0001	15,75 (5,259 – 47,01)
	SW756 RECK	15		
	C33A EGFP	17	0,0357	3,535 (1,088 – 11,47)
	C33A RECK	87		

De maneira interessante, o efeito mais contundente da superexpressão de RECK sobre o estabelecimento de tumores foi observado para animais injetados com células C33A (Figura 7C). De fato, 50% dos animais injetados com células C33A transduzidas com pLVRECK não desenvolveram tumores durante o período de observação de 150 dias após a injeção dos animais. É digno de nota que não observamos alterações de proliferação ou viabilidade de

células C33A que superexpressam RECK em cultura em monocamada (Figura 4C) ou no momento da injeção dos animais, quando aplicamos o controle de qualidade de viabilidade acima de 95% para todas as células utilizadas.

Figura 7. Análise do efeito da superexpressão de RECK no estabelecimento e na cinética de crescimento tumoral de células SiHa, SW756 e C33A em camundongos *nude*. Para determinar o efeito da superexpressão de RECK no estabelecimento de tumores de células SiHa (A), SW756 (B) e C33A (C), 2×10^6 células foram injetadas s.c. no flanco direito em camundongos *nude*. Os tumores foram considerados estabelecidos a partir do dia de medida em que estes se tornaram mensuráveis. O volume tumoral foi obtido a partir da medida por paquímetro por pelo menos 150 dias, de acordo com a cinética de crescimento dos grupos e da chegada ao desfecho de volume tumoral de 500 mm^3 . A análise estatística foi realizada com o uso do teste Log-rank (Mantel-Cox) no software GraphPad Prism 5.0.

Diante desta primeira observação, seguimos com a avaliação do efeito da superexpressão de RECK sobre o crescimento dos tumores. Este crescimento foi definido a partir das medidas adquiridas no período após o estabelecimento tumoral até o momento em que estes tumores alcançaram o desfecho de 500 mm³. Novamente, observamos que a superexpressão de RECK atrasou o tempo mediano de crescimento de tumores estabelecidos de SiHa ($p=0,002$) (Figura 8A). O mesmo não foi verdadeiro para o crescimento tumoral das linhagens SW756 e C33A (Figura 8B e C).

De maneira inédita, observamos a regressão tumoral em 50% dos animais ($n=4$) injetados com células SW756 superexpressando RECK. Os tumores destes animais foram considerados estabelecidos, uma vez que se tornaram mensuráveis (Figura 7B), e ao longo do período de observação apresentaram redução de volume tumoral progressiva e se tornaram indetectáveis mesmo 150 dias após a injeção. Desta forma, a Figura 8B conta somente com os dados de crescimento tumoral dos animais que não apresentaram regressão tumoral. Embora exista uma tendência de atraso do crescimento tumoral de SW756 transduzida com pLVRECK em relação ao seu controle, esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa ($p=0,0736$).

Observamos ainda que, independente do efeito da superexpressão de RECK sobre o estabelecimento tumoral de C33A, o crescimento de tumores derivados de células C33A que superexpressam RECK não é diferente em relação ao seu controle. Desta forma, pudemos concluir que o efeito da superexpressão de RECK no potencial tumorigênico de C33A parece se restringir ao estabelecimento tumoral, mas não ao seu crescimento (Figura 8C).

Figura 8. Análise do efeito da superexpressão de RECK na capacidade de crescimento tumoral de células SiHa, SW756 e C33A em camundongos *nude*. A, B e C. **A partir da aquisição sistemática de medidas dos tumores ao longo do tempo, a cinética de crescimento tumoral foi determinada a partir do tempo que os tumores mensuráveis levaram para alcançar o volume tumoral de 500 mm³. O volume tumoral foi obtido a partir da medida por paquímetro por pelo menos 150 dias, de acordo com a cinética de crescimento dos grupos e da chegada ao desfecho de volume tumoral de 500 mm³.**

Análise do efeito da superexpressão de RECK na sobrevida global e no volume tumoral de camundongos nude injetados com células das linhagens tumorais SiHa, SW756 e C33A

Ainda durante o ensaio de crescimento tumoral em camundongos *nude*, avaliamos o potencial efeito da superexpressão de RECK na sobrevida global de animais com tumores SiHa, SW756 e C33A. Para tal, os animais foram avaliados por até 150 dias após a injeção *s.c.* dos animais. A sobrevida dos animais foi determinada pela chegada do volume tumoral ao desfecho de 500 mm³ de acordo com o volume limite estabelecido pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA). Desta forma, observamos que a superexpressão de RECK levou a um aumento significativo na sobrevida global dos animais injetados com células de todas as linhagens tumorais avaliadas conforme descrito na Tabela 4 e na Figura 9A, B e C. A razão de chance de menor sobrevida dos animais injetados com células transduzidas com pLVEGFP foi de 24 vezes maior para SiHa, 11,04 vezes maior para SW756 e de 3,077 vezes maior para C33A do que para as linhagens transduzidas com RECK.

Tabela 4. Análise do efeito da superexpressão de RECK na sobrevida de animais injetados *s.c.* com células tumorais em camundongos *nude*.

		EGFP vs. RECK		
		Mediana de dias após a injeção	Valor de p	Hazard ratio
Sobrevida	SiHa EGFP	69	<0,0001	24,00 (6,136 – 93,86)
	SiHa RECK	150		
	SW756 EGFP	42	0,0004	11,04 (2,918 – 41,79)
	SW756 RECK	68		
	C33A EGFP	62	0,0382	3,077 (1,063 – 8,905)
	C33A RECK	108

Figura 9. Análise do efeito da superexpressão de RECK na sobrevida global dos camundongos *nude* injetados com células SiHa, SW756 e C33A. A, B e C. Para determinar o efeito da superexpressão de RECK na sobrevida global dos animais com tumores SiHa, SW756 e C33A, 2×10^6 células foram injetadas s.c. no flanco direito em camundongos *nude*. A aquisição sistemática de medidas dos tumores foi realizada até o momento em que os tumores alcançavam o volume tumoral de 500 mm^3 ou até 150 dias após a injeção. A análise estatística foi realizada com o uso do teste Log-rank (Mantel-Cox) no software GraphPad Prism 5.0.

Em um segundo experimento, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo de injeção s.c. de células SiHa, SW756 e C33A. O desfecho deste ensaio foi determinado a partir do momento que os tumores de pelo menos um dos grupos de animais alcançou o volume de 500 mm^3 . Desta forma, fomos capazes de observar a diferença significativa no volume tumoral entre os grupos SiHa RECK ($p = 0,0079$) e SW756 RECK ($p < 0,0001$) e seus respectivos controles (Figura 10A e B). Não houve diferença no volume tumoral de C33A entre os grupos RECK e EGFP (Figura 10C). Este experimento nos permitiu visualizar que o

efeito da superexpressão de RECK no atraso do estabelecimento e crescimento tumoral de SiHa e SW756 impactou em última forma no volume destes tumores, diferente do observado para C33A.

Figura 10. Análise do efeito da superexpressão de RECK no volume tumoral dos camundongos *nude* injetados *s.c.* com células SiHa, SW756 e C33A. A, B e C. A partir de um novo grupo de animais injetados com as células tumorais, o volume tumoral foi determinado no momento em que os tumores do grupo controle alcançaram o volume de desfecho de 500 mm³. Os tumores foram extraídos, medidos com paquímetro, fotografados e processados para uso posterior em ensaios de detecção de proteínas, análise histológica ou citometria de fluxo.

Análise do efeito da superexpressão de RECK na frequência e viabilidade de células tumorais em camundongos nude

Este segundo experimento de injeção de células SiHa, SW756 e C33A *s.c.* em camundongos *nude* ainda permitiu a análise de populações intratumorais a partir da dissociação das células da massa tumoral, seguida de imunomarcção e citometria de fluxo. Em tempo, as células imunomarcadas foram ainda fixadas e coradas com DAPI para a avaliação do ciclo celular de cada população intratumoral.

Primeiramente, analisamos o efeito da superexpressão de RECK sobre a frequência de células tumorais (EGFP+) em tumores derivados de células SiHa, SW756 e C33A. Observamos uma redução da frequência de células EGFP+ em tumores SiHa RECK ($p < 0,001$) e SW756 RECK ($p < 0,001$) em relação aos seus controles (Figura 11A). Por outro lado, não houve alteração da frequência de células tumorais nos tumores C33A RECK em relação ao seu controle (Figura 11A). De maneira geral, a superexpressão de RECK não afetou o ciclo celular das células tumorais com exceção do aumento de células SW756 RECK na fase Sub G1 em comparação ao seu controle ($p < 0,001$) (Figura 11B, C e D).

Ainda, é interessante apontar que houve concordância entre os resultados de viabilidade celular do ensaio de esferoides e do ensaio *in vivo* (Figura 6C vs. Figura 11C). Embora a metodologia para avaliação da viabilidade celular seja diferente entre os experimentos, em ambos os casos observamos uma redução da viabilidade de células SW756 que superexpressam RECK em comparação com o seu controle (Figura 11C). A observação de que a superexpressão de RECK exerce efeito sobre a viabilidade de células SW756 em modelos de cultivo 3D e *in vivo* é intrigante, uma vez que tempo de proliferação destas células não se mostrou reduzida em cultivo em monocamada (Figura 4B).

Estes resultados apontam que a frequência reduzida de células EGFP+ viáveis nos tumores SiHa RECK e SW756 RECK pode justificar os resultados anteriores de (i) atraso de estabelecimento, (ii) atraso de crescimento tumoral e (iii) redução no volume tumoral, quando comparado aos seus controles. Todavia, o mecanismo pelo qual estes eventos ocorrem ainda é uma pergunta em aberto deste projeto.

Figura 11. Identificação da população de células tumorais e seu conteúdo de DNA a partir do uso de DAPI seguido de citometria de fluxo. Para as análises por citometria de fluxo foram utilizadas frações de tumores de pelo menos três animais de cada grupo. Em todos os casos foram adquiridos pelo menos 1×10^5 células/eventos. A. A detecção da emissão de fluorescência de EGFP foi utilizada para identificar a população de células tumorais e sua frequência dentro das populações de células intratumorais. B, C e D. A determinação do conteúdo de DNA destas células com o uso do corante DAPI permitiu a avaliação da sua viabilidade e fases do ciclo celular. Este ensaio contou com a aquisição de pelo menos 20000 eventos durante a citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada com o uso do teste Kruskal-Wallis no software GraphPad Prism 5.0.

Análise do efeito da superexpressão de RECK na frequência e viabilidade de células endoteliais em camundongos nude

Diante da função de RECK sobre a organização e desenvolvimento de vasos sanguíneos já descrita na literatura, seguimos com a avaliação do efeito da superexpressão de RECK sobre a frequência e viabilidade de células endoteliais (CD31+) intratumorais em animais injetados s.c. com células SiHa, SW756 e C33A. A superexpressão de RECK afetou de maneira significativa a frequência de células endoteliais (CD31+) intratumorais em tumores SiHa ($p < 0,05$) e SW756 ($p < 0,001$), mas não C33A. A frequência de células endoteliais em tumores SiHa RECK e SW756 RECK foi reduzida em pelo menos 50% em comparação com seus controles (Figura 12A). A análise do ciclo celular de células endoteliais de tumores derivados de SiHa RECK e SW756 RECK demonstraram que a redução da sua frequência é acompanhada da redução da viabilidade desta população de células. Houve um aumento de células endoteliais de tumores SiHa RECK ($p < 0,001$) e SW756 RECK ($p < 0,001$) na fase Sub G1 em comparação aos seus respectivos controles (Figura 12B, C). Mais uma vez, não observamos alteração significativa na viabilidade de células endoteliais nos tumores C33A RECK em comparação com os seus controles (Figura 12D).

Figura 12. Identificação da população de células endoteliais e seu conteúdo de DNA a partir de imunomarcagem e uso de DAPI seguido de citometria de fluxo. Para as análises por citometria de fluxo foram utilizadas frações de tumores de pelo menos três animais de cada grupo no ensaio de imunomarcagem com anticorpo anti-CD31. Em todos os casos foram adquiridos pelo menos 1×10^5 células/eventos. A. A determinação da população de células CD31+ foi utilizada para identificar as células endoteliais e sua frequência dentro das populações de células intratumorais. B, C e D. A determinação do conteúdo de DNA destas células com o uso do corante DAPI permitiu a avaliação da sua viabilidade e fases do ciclo celular. Este ensaio contou com a aquisição de pelo menos 20000 eventos durante a citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada com o uso do teste Kruskal-Wallis no software GraphPad Prism 5.0.

Análise do efeito da superexpressão de RECK na frequência e ciclo celular de células do infiltrado inflamatório em tumores SiHa, SW756 e C33A de camundongos nude

Em seguida, descrevemos a frequência e viabilidade do infiltrado inflamatório nos tumores derivados de células SiHa, SW756 e C33A para compreender o efeito da superexpressão de RECK sobre esta população de células no modelo de estudo *in vivo* em uso. Realizamos esta análise com o uso da mesma metodologia de dissociação de células, imunomarcagem e citometria de fluxo descrita anteriormente.

Surpreendentemente, a superexpressão de RECK levou a um aumento importante da frequência de células do infiltrado inflamatório (CD45+) intratumorais em tumores SiHa ($p < 0,001$) e SW756 ($p < 0,001$), mas novamente não afetou tumores C33A (Figura 13A). A frequência do infiltrado inflamatório em tumores SiHa RECK e SW756 RECK foi aumentada em pelo menos dez vezes, em comparação com seus controles (Figura 13A). A análise do ciclo celular do infiltrado inflamatório de tumores derivados de SiHa RECK demonstrou que o aumento da sua frequência é acompanhada do aumento da viabilidade desta população de células. Observamos uma redução de células do infiltrado inflamatório de tumores SiHa RECK ($p < 0,001$) na fase Sub G1 em comparação ao seu controle (Figura 13B). Por outro lado, não observamos alteração significativa na viabilidade do infiltrado inflamatório nos tumores SW756 RECK e C33A RECK, em comparação com os seus controles (Figura 13C e D).

De fato, a associação da superexpressão de RECK em tumores SiHa e SW756 com a viabilidade das diferentes populações de células intratumorais se mostrou antagônica, aumentando a viabilidade do infiltrado inflamatório e reduzindo a viabilidade de células endoteliais. Isto argumenta a favor de que este fenômeno pode ser específico para cada população de células e não por geração de um ambiente intratumoral tóxico global diante da superexpressão de RECK.

Figura 13. Identificação do infiltrado inflamatório e seu conteúdo de DNA a partir de imunomarcção e uso de DAPI seguido de citometria de fluxo. Para as análises por citometria de fluxo foram utilizadas frações de tumores de pelo menos três animais de cada grupo no ensaio de imunomarcção com anticorpo anti-CD45. Em todos os casos foram adquiridos pelo menos 1×10^5 células/eventos. A. A determinação da população de células CD45+ foi utilizada para identificar as células do infiltrado inflamatório e sua frequência dentro das populações de células intratumorais. B, C e D. A determinação do conteúdo de DNA destas células com o uso do corante DAPI permitiu a avaliação da sua viabilidade e fases do ciclo celular. Este ensaio contou com a aquisição de pelo menos 20000 eventos durante a citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada com o uso do teste Kruskal-Wallis no software GraphPad Prism 5.0.

Análise do efeito da superexpressão de RECK no perfil de células do infiltrado inflamatório em tumores SiHa, SW756 e C33A de camundongos nude

De forma inédita, os tumores gerados por células SiHa RECK e SW756 RECK apresentaram uma evidente perturbação do infiltrado inflamatório intratumoral quando comparados com tumores derivados de células controle. A redução significativa na frequência de neutrófilos (CD45+/Ly6C-/Ly6G+) (SiHa – $p < 0,001$; SW756 – $p = 0,0247$) e de potenciais células mielóides supressoras (CD45+/Ly6C+/Ly6G+) (SiHa – $p < 0,0003$; SW756 – $p = 0,0317$) foi consistente para ambas as linhagens superexpressando RECK (Figura 14A e D). Em particular, tumores SiHa RECK ainda apresentaram redução da população de macrófagos (CD45+/Ly6G-/Ly6C+/F4/80+) ($p < 0,001$) e aumento de células NK (CD45+/Ly6C-/Ly6G-/CD49b+) ($p = 0,0088$) (Figura 14B e C).

É importante salientar que as células do infiltrado inflamatório nos tumores SiHa RECK e SW756 RECK representam pelo menos 30% da massa tumoral analisada, contra apenas cerca de 4% em média para os tumores derivados de seus respectivos controles (Figura 13A). Esta informação justifica a noção de que a associação da superexpressão de RECK com a frequência de populações específicas do infiltrado inflamatório intratumoral em tumores derivados de células SiHa e SW756 se apresentou proporcionalmente potencializada.

Por fim, tumores derivados de células C33A que superexpressavam RECK não apresentaram associações com a frequência ou com a viabilidade de qualquer população celular avaliada (Figura 14).

Figura 14. Caracterização do infiltrado inflamatório intratumoral a partir de imunomarcagem seguida de citometria de fluxo. Para as análises por citometria de fluxo foram utilizadas frações de tumores de pelo menos três animais de cada grupo no ensaio de imunomarcagem com anticorpos anti-CD45, Ly6C, Ly6G, F4/80 e CD49b. Em todos os casos foram adquiridos pelo menos 1×10^5 células/eventos. A frequência das populações de infiltrado inflamatório descrita na figura partiu da população de células CD45+. A. A determinação da população de células CD45+/Ly6G+ foi utilizada para identificar os neutrófilos. B. A determinação da população de células CD45+/Ly6C+/F4 80+ foi utilizada para identificar os macrófagos. C. A determinação da população de células CD45+/Ly6C-/Ly6G-/CD49+ foi utilizada para identificar as células *natural killer* (NK). D. A determinação da população de células CD45+/Ly6C+/Ly6G+ foi utilizada para identificar as potenciais células mielóides supressoras. Este ensaio contou com a aquisição de pelo menos 20000 eventos durante a citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada com o uso do teste Kruskal-Wallis no software GraphPad Prism 5.0.

Avaliação in silico da expressão de RECK em amostras clínicas de CIN e carcinomas invasivos de colo de útero

Diante do efeito significativo da superexpressão de RECK em diversos aspectos da tumorigênese nas linhagens derivadas de tumores de colo de útero utilizadas, realizamos varreduras da expressão do mRNA de RECK em bancos de dados de expressão gênica de amostras clínicas depositados na plataforma GEO. Os bancos de dados verificados reuniram amostras clínicas de pessoas sem alterações aparentes na mucosa do colo de útero e pacientes que foram diagnosticadas com diferentes graus de CIN ou carcinomas invasivos.

A série de dados GSE51993 compreendia sete amostras cervicais normais HPV negativas adjacentes às lesões CIN, nove amostras de CIN1 e oito amostras de CIN3. Todas as amostras CIN utilizadas eram HPV positivas sem descrição quanto ao tipo de HPV infectante. A expressão de mRNA de RECK se apresentou reduzida em amostras CIN1 ($p < 0,01$) e CIN3 ($p = 0,0145$) quando comparadas aos seus respectivos controles de mucosa normal (Figura 15A).

A série de dados GSE39001 compreendia cinco amostras de exocervix, HPV negativas, sem alterações histológicas e obtidas de pacientes que realizaram histerectomia, e dezoito amostras de tumores cervicais invasivos. Todas as amostras de tumores cervicais invasivos utilizadas eram HPV16 positivas. A expressão de mRNA de RECK se apresentou reduzida em amostras de tumores invasivos ($p = 0,0009$) quando comparadas ao grupo de amostras controles de mucosa normal (Figura 15B).

A série de dados GSE7803 compreendia dez amostras cervicais normais sem alterações histológicas e obtidas de pacientes que realizaram histerectomia, sete amostras de HSIL e vinte e uma amostras de tumores cervicais invasivos. Todas as amostras de HSIL e de câncer utilizadas eram positivas para HPV de alto risco. A expressão de mRNA de RECK se apresentou reduzida em amostras de HSIL ($p = 0,043$) e de tumores invasivos ($p = 0,0353$) quando comparadas ao grupo de amostras controles de mucosa normal (Figura 15C).

Estes resultados apontam para uma regulação negativa precoce sobre a expressão de RECK no processo de transformação do colo de útero. A redução da expressão de RECK se intensificou ao longo da progressão das lesões precursoras e nos tumores invasivos. Esta última observação nos levou a avaliar se a expressão de RECK também poderia estar associada a algum parâmetro clínico destas pacientes diagnosticadas com lesões de alto grau ou câncer de colo de útero.

Figura 15. A análise de séries de dados de expressão global da plataforma GEO demonstra que o mRNA de RECK sofre regulação negativa em CIN e em carcinomas invasivos de colo de útero. A. A expressão de mRNA de RECK foi reduzida em CIN1 e CIN3 quando comparada com tecidos cervicais normais na série GSE51993. B, C. A expressão de mRNA de RECK diminuiu em carcinomas invasivos e linhas celulares de câncer de colo do útero quando comparadas com tecidos cervicais normais em três séries de dados de expressão diferentes GSE39001, GSE7803. A análise estatística foi realizada com o uso do teste Mann-Whitney no software GraphPad Prism 5.0.

Para analisar esta hipótese seguimos explorando a base de dados da plataforma GEO em estudos que envolvessem a observação de expressão gênica global em grupos de pacientes com lesões no colo de útero com parâmetros clínicos estabelecidos. Embora ainda não tenhamos os dados sobre a associação da expressão de RECK com a sobrevida de pacientes diagnosticadas com câncer de colo de útero, conseguimos reunir dados sobre aspectos clínicos

como (i) progressão de lesões CIN3+ HPV positivas, (ii) metástase de tumores e (iii) efeito do tratamento de quimiorradioterapia (QRT).

A série de dados GSE75132 compreendia sete amostras cervicais normais, HPV negativa e sem alterações histológicas, dez amostras de pacientes infectadas com HPV16 sem lesões associadas e dezenove amostras de pacientes infectadas com HPV16 com lesões CIN3+ em progressão. A expressão de mRNA de RECK se mostrou reduzida em amostras de pacientes HPV16+ com CIN3+ em progressão ($p= 0,0471$) em comparação com amostras controles de mucosa normal (Figura 16A).

A série de dados GSE26511 compreendia amostras de tumores invasivos de colo de útero de pacientes identificadas em estadiamento inicial. Os tumores das pacientes foram agrupados em vinte amostras de pacientes com metástase em linfonodo pélvico e dezenove amostras de pacientes sem metástase. Observamos uma redução da expressão de mRNA de RECK em amostras de tumores de pacientes com metástase quando comparadas com aquelas sem metástase ($p= 0,0073$) (Figura 16B).

Ainda, avaliamos a expressão de RECK na série de dados GSE3578 que compreendia dezenove pacientes cujas amostras foram coletadas antes e durante o tratamento de quimiorradioterapia (QRT). O tratamento iniciado após a primeira coleta consistia de irradiação pélvica em uma dose total de 50,6 Gy associada a cinco sessões de quimioterapia com cisplatina (40mg/m^2) com intervalos de uma semana. Os níveis de mRNA de RECK aumentaram significativamente após o ciclo de QRT ($p= 0,0411$) (Figura 16C e D). Uma análise semelhante foi realizada com o outro grupo de pacientes deste estudo que somente receberam o ciclo de radioterapia e não observamos diferença na expressão de RECK após o tratamento único (dados não mostrados; $p= 0,9053$). Estes dados demonstram que a regulação positiva da expressão de RECK parece ser específica para QRT em comparação a radioterapia para pacientes com câncer de colo de útero.

Figura 16. A análise de séries de dados de expressão global da plataforma GEO demonstra que a regulação negativa do mRNA de RECK observada no processo de transformação da cérvix uterina pode ser preditiva de aspectos clínicos das pacientes com CIN ou carcinomas invasivos. **A.** A expressão de mRNA de RECK foi reduzida em mulheres infectadas com HPV que desenvolveram lesão CIN3 + quando comparadas com mulheres infectadas com HPV que não apresentavam lesões ou mulheres sem infecção por HPV (GSE75132). **B.** A expressão de RECK foi reduzida nos tumores em estágios iniciais de pacientes que apresentaram metástase para linfonodos quando comparada aos pacientes de mesmo estadiamento que não apresentavam metástase (GSE26511). **C e D.** Os níveis de mRNA de RECK aumentaram nos tumores de colo de útero de pacientes que foram submetidos ao regime de tratamento de quimiorradioterapia quando comparados aos pacientes que não receberam o mesmo tratamento (GSE3578). A análise estatística foi realizada com o uso do teste Mann-Whitney no software GraphPad Prism 5.0.

Diante destes dados de regulação negativa da expressão de RECK na história natural do câncer de colo de útero, procuramos compreender se este evento poderia ter associação com o aumento de metilação do gene RECK. Para tal, exploramos a série de dados GSE30760 que avaliou o nível de metilação genômico em amostras clínicas de colo de útero. A série de dados GSE30760 compreendia quinze amostras cervicais normais ajustadas às pacientes para idade e status de HPV, setenta e cinco amostras de CIN1, setenta e sete amostras de CIN3 e quarenta e oito amostras de tumores invasivos. A metilação do gene RECK se mostrou aumentada em amostras CIN1 ($p=0,0339$), CIN3 ($p=0,0179$) e tumores invasivos ($p=0,0005$) quando comparadas aos seus respectivos controles de mucosa normal (Figura 17A e B).

Figura 17. A análise da série de dados de metilação global da plataforma GEO demonstra um aumento no nível de metilação do gene RECK em CIN e em carcinomas invasivos de colo de útero. **A metilação do gene RECK é aumentada em pacientes diagnosticadas com CIN1 e CIN3+ (A) ou carcinomas invasivos (B) quando comparados com CIN1 ou cervix normal, respectivamente (GSE30760).** A análise estatística foi realizada com o uso do teste Mann-Whitney no software GraphPad Prism 5.0.

Resumo dos resultados apresentados

De maneira extensiva, este projeto demonstrou que a superexpressão de RECK impactou diversos aspectos do potencial tumorigênico de linhagens celulares derivadas de tumores de colo de útero HPV positivas (SiHa e SW756) e negativa (C33A). As linhagens RECK+ apresentaram alterações em parâmetros tumorigênicos tanto em ensaios *in vitro*, em monocamada e em 3D, quanto em ensaios *in vivo*. Este foi o primeiro estudo que demonstrou os efeitos de supressão de tumor de RECK e da isoforma RECK B sobre o potencial tumorigênico de linhagens transformadas de colo de útero. De forma inédita, os dados produzidos por este projeto ainda demonstraram que a superexpressão de RECK afeta significativamente o infiltrado inflamatório de tumores gerados a partir das linhagens HPV positivas. Os dados *in silico* sobre a expressão de RECK em amostras clínicas de colo de útero apontaram para (i) a sua regulação negativa precoce, consistente e progressiva ao longo do processo de transformação deste tecido e para (ii) o seu potencial preditivo para alguns aspectos clínicos das pacientes. Por fim, demonstramos o aumento da metilação do gene RECK em CIN e carcinomas invasivos de colo de útero em comparação com o tecido normal. O conjunto de dados gerados por esta tese foi organizado na Tabela 5.

Tabela 5. Compilação dos dados *in vitro*, *in vivo* e *in silico* relativos ao papel de RECK e RECK B no potencial tumorigênico das linhagens tumorais SiHa, SW756, C33A e em amostras clínicas de CIN e carcinomas invasivos de colo de útero.

		EGFP+ vs. RECK+		
Ensaio		SiHa (HPV16)	SW756 (HPV18)	C33A (HPV-)
Monocamada	Redução no período de proliferação celular	Não	Não	Não
	Redução no potencial clonogênico	Não	Não	Não
	Redução na migração em câmara transwell	Sim	Não	Não
	Redução na invasão em câmara transwell com Matrigel®	Sim	Sim	Sim
3D	Redução no número de células em esferóide	Sim	Sim	Não
	Redução da viabilidade celular em esferóide	Sim	Sim	Não
	Redução da formação de colônias independente de ancoragem	Sim	Sim	Sim
In vivo	Aumento na sobrevivência de camundongos <i>nude</i> com tumores	Sim	Sim	Sim
	Redução do volume tumoral	Sim	Sim	Não
	Redução do estabelecimento tumoral	Sim	Sim	Sim
	Regressão tumoral	Não	Sim	Não
	Redução da frequência da população de células tumorais	Sim	Não	Não
	Redução da frequência da população de células endoteliais	Sim	Sim	Não
	Redução da frequência do infiltrado inflamatório	Sim	Sim	Não
Expressão de mRNA de RECK em amostras clínicas				
In silico	Cérvix normal vs. CIN e amostras de tumores	Reduzido		
	CIN3+ HPV+ sem progressão vs. com progressão	Reduzido		
	Tumores sem metástase para linfonodo vs. Com metástase	Reduzido		
	Pacientes sem QRT vs. com QRT	Aumentado		
		EGFP+ vs. RECK B+		
Ensaio		SiHa (HPV16)	SW756 (HPV18)	C33A (HPV-)
Monocamada	Redução no período de proliferação celular	Não	Não	Não
	Redução no potencial clonogênico	Não	Sim	Não
	Redução na migração em câmara transwell	Sim	Não	Sim
	Redução na invasão em câmara transwell com Matrigel®	Não	Sim	Sim
3D	Redução no número de células em esferóide	Sim	Sim	Não
	Redução da viabilidade celular em esferóide	Não	Não	Não
	Redução da formação de colônias independente de ancoragem	Sim	Sim	Não

Discussão

Classicamente, a proteína RECK canônica está envolvida com a supressão de (i) invasão tumoral, (ii) angiogênese e (iii) metástase. Em parte, este efeito está associado à função de supressão de tumor clássica de RECK em relação à inibição específica de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP, assim como as MMP extracelulares ADAM10 e CD13/Aminopeptidase (TAKAHASHI et al., 1998a; OH et al., 2001; BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002; SASAHARA et al., 2002; MIKI et al., 2007b; MURAGUCHI et al., 2007). Esta função está relacionada à presença de um domínio SPI na proteína RECK canônica que lhe confere a capacidade de inibição da atividade destas serina-proteases (TAKAHASHI et al., 1998a)(Takahashi, 1998).

Observações anteriores apontam que a perda ou redução da expressão de RECK é um evento comum a diversos tipos de neoplasias humanas e que este fenômeno frequentemente se associa ao ganho ou aumento de diversas características associadas ao potencial tumorigênico destas células. Ademais, a regulação negativa de RECK em pacientes com tumores está associada ao (i) aumento da ocorrência de invasão e metástase e (ii) redução da sobrevida global.

Estas observações foram realizadas, em parte, também para linhagens derivadas de tumores de colo de útero e para pacientes diagnosticados com CIN e carcinomas cervicais invasivos. De fato, o nosso grupo pontuou anteriormente que existe uma correlação inversa entre (i) a progressão da transformação do colo de útero e a expressão de RECK e (ii) entre a expressão de MMP-9 e RECK (CARDEAL et al., 2012; DISCACCIATI et al., 2015). Ainda, observamos uma associação entre o aumento da expressão de MMP-9, a redução da expressão de RECK e a infecção por HPV do gênero alfa em mulheres diagnosticadas com CIN ou carcinoma cervical invasivo (DISCACCIATI et al., 2015). Por fim, observamos que linhagens derivadas de tumores de colo de útero e queratinócitos primários que expressam a oncoproteína HPV16 E7 apresentam uma dramática perda de expressão de RECK quando comparados a queratinócitos normais (DA SILVA CARDEAL et al., 2006; CARDEAL et al., 2012).

Desta forma, este projeto se propôs a avaliar o efeito da superexpressão da proteína RECK no potencial tumorigênico de linhagens derivadas de tumores de colo de útero. O racional deste projeto partiu da hipótese de que existe uma sensibilidade de via associada ao processo de transformação destas linhagens, o qual ainda permite o efeito supressor de tumor via superexpressão de RECK exógeno.

Efeito da superexpressão de RECK nos parâmetros tumorigênicos de SiHa, SW756 e C33A: ensaios in vitro

Os dados obtidos a partir do conjunto de experimentos *in vitro* realizados em nosso laboratório apontam para um efeito negativo da superexpressão de RECK sobre características tumorigênicas específicas inerentes a SiHa, SW756 e C33A. Este efeito parece ser independente (i) do status de infecção por HPV, (ii) do tipo de HPV infectante, (iii) de alterações na cinética de proliferação e (iv) de formação de colônias destas linhagens. Por outro lado, o efeito da superexpressão de RECK parece ter associação com a capacidade reduzida de degradação de componentes de matriz extracelular, como sugerem os dados dos ensaios de migração, invasão, de formação de colônia independente de ancoragem e de formação de esferoides. Estes dados corroboram com o conjunto de resultados da literatura sobre o efeito da superexpressão de RECK em células tumorais em relação aos parâmetros que analisamos *in vitro* (OH et al., 2001; MORI et al., 2007; HONG et al., 2014b; TROMBETTA-LIMA et al., 2015; WALSH et al., 2015a).

Um estudo recente demonstrou resultados semelhantes sobre o efeito superexpressão de RECK nas linhagens derivadas de tumores de colo de útero, C33A e HeLa. Estes autores demonstraram que a superexpressão de RECK está relacionada à redução da capacidade migratória e invasiva destas células. Ademais, este estudo demonstrou que as células que superexpressam RECK apresentam aumento de expressão de p53, p21 e da proteína indutora de apoptose Bax (LIU et al., 2018).

Observamos ainda que as células transduzidas com pLVRECK B também apresentaram redução de sua capacidade tumorigênica quando comparadas aos seus controles. Este efeito da superexpressão de RECK B foi pontual quando comparado a RECK nos ensaios em monocamada. Em tempo, a superexpressão de RECK B gerou resultados consistentes sobre a redução da capacidade de formação de colônias independente de ancoragem e no número de células por esferoide de SiHa e SW756. Estes dados apontam para uma função supressora de tumor residual de RECK B, independente da ausência de função como inibidor de MMP.

Sabemos que ainda há muito a ser explorado em relação ao papel de RECK B nos tumores humanos, uma vez que este é o segundo trabalho que realizou a expressão de RECK B exógeno em linhagens celulares derivadas de tumores. De fato, o primeiro estudo

demonstrou que a expressão de RECK B exógeno em células derivadas de glioblastoma estava associada ao aumento da capacidade da formação de colônias independente de ancoragem, mas não alterou sua capacidade de migração e invasão em câmara. Por fim, este estudo apresentou dados sobre os níveis de expressão das isoformas de RECK em diversos tecidos humanos. Eles observaram níveis similares de expressão de mRNA de RECK e RECK B no tecido uterino normal (TROMBETTA-LIMA et al., 2015). A discordância dos dados entre os dois estudos aponta para uma função tumor específico de RECK B.

Efeito da superexpressão de RECK nos parâmetros tumorigênicos de SiHa, SW756 e C33A: Potencial tumorigênico, crescimento tumoral e o efeito na sobrevida

Os resultados produzidos em nosso projeto indicam que a superexpressão da proteína RECK reduz o potencial tumorigênico em modelo de camundongos nude de todas as linhagens celulares derivadas de tumores da cérvix uterina utilizadas. Demonstramos que a superexpressão de RECK tem impacto consistente de (i) atraso do estabelecimento tumoral (ii) e aumento da sobrevida global dos animais injetados com células de todas as linhagens tumorais avaliadas. De maneira específica, observamos perda na capacidade de estabelecimento tumoral de células C33A RECK, atraso no crescimento de tumores derivados de células SiHa RECK e regressão de parte dos tumores derivados de SW756 RECK quando comparados aos seus respectivos controles.

O estudo do efeito da superexpressão de RECK na linhagem derivada de um tumor de colo de útero negativa para HPV, C33A, demonstrou que esta proteína também parece interferir com o potencial tumorigênico destas células *in vivo*, uma vez que levou a redução da capacidade de estabelecimento tumoral para este grupo. Vale nota que, 50% dos animais injetados com células C33A RECK não apresentaram tumores após 150 dias de observação. No entanto, os demais animais deste grupo apresentaram tumores de volume similar ao observado no grupo controle. Este efeito inicial de estabelecimento tumoral influenciou de forma definitiva na sobrevida global deste grupo, onde a superexpressão de RECK não parece exercer um papel de interferência clara com o crescimento tumoral.

De forma geral, os animais injetados com células SiHa RECK ou SW756 RECK apresentaram um atraso no estabelecimento tumoral que foi acompanhado de (i) um retardo no crescimento e alcance do desfecho e (ii) maior sobrevida global associada.

Surpreendentemente, observamos regressão tumoral em 50% dos animais injetados com SW756.

A associação entre a regulação negativa da expressão de RECK e uma menor sobrevida tem sido observada, de maneira consistente, em modelos de estudo de tumorigênese de linhagens celulares derivadas de tumores e em pacientes com diversos tipos de neoplasias. (TAKAHASHI et al., 1998b; OH et al., 2001; SASAHARA et al., 2002; TAKAGI; SIMIZU; OSADA, 2009b; ALEXIUS-LINDGREN et al., 2014; HONG et al., 2014c; TROMBETTA-LIMA et al., 2015; WALSH et al., 2015b). De forma semelhante a este projeto, alguns destes estudos estabeleceram linhagens tumorais que superexpressavam RECK e observaram que os animais injetados *s.c.* com estas células apresentaram sobrevida aumentada quando comparados aos seus controles (OH et al., 2001; WALSH et al., 2015b).

Quando a expressão de RECK é artificialmente restaurada em células tumorais (tais como fibrossarcoma HT1080 ou melanoma B16), o seu potencial invasivo e metastático se mostra fortemente suprimido. Esta observação foi realizada *in vitro*, por ensaios em Matrigel de invasão de câmara, e *in vivo*, por experimentos de metástase espontânea. Isto, em paralelo com as demais evidências, indica uma correlação inversa entre a expressão de RECK nas células neoplásicas e a agressividade tumoral (OH et al., 2001). Estas células que expressavam RECK exógeno foram ainda inoculadas *s.c.* em camundongos *nude*. De fato, os animais com tumores que expressavam RECK apresentaram uma maior sobrevida em relação aos animais com tumores originados de células controle. Além disso, a análise histológica dos tumores expressando RECK permitiu a observação de que o brotamento de novos vasos nos tumores se encontrava severamente suprimido (OH et al., 2001). Estes resultados indicam que a supressão da angiogênese pode influenciar no melhor prognóstico de pacientes com tumores que expressam RECK (WALSH et al., 2015a).

Efeito da superexpressão de RECK nos parâmetros tumorigênicos de SiHa, SW756 e C33A: Frequência e viabilidade de células tumorais e endoteliais

O presente estudo demonstrou que tumores obtidos a partir de células SiHa RECK (90% vs. 40%) e SW756 RECK (90% vs. 60%) apresentavam um menor número de células tumorais EGFP+. Esta redução na frequência de células tumorais foi acompanhada de uma

redução significativa da viabilidade desta população de células (10% vs. 40% de células na fração Sub G1) em tumores SW756 quando comparada a tumores controles.

É interessante apontar que a perda da capacidade de proliferação e/ou da viabilidade das células SW756 transduzidas para RECK em modelo de cultivo 3D *in vitro* ou modelo de injeção *s.c. in vivo* pode ocorrer devido à entrada destas células em processo de morte por anoikis. De fato, já foi demonstrado anteriormente que a ativação por fosforilação de STAT3 está associada à resistência a morte por anoikis em células HeLa. Os autores observaram que o aumento na fosforilação da tirosina 705 de STAT3 leva a resistência à anoikis em células HeLa nos ensaios de formação de colônia independente de ancoragem ou em cultivo em placas recobertas de PolyHEMA (HU et al., 2013). Um estudo recente demonstrou que a superexpressão de RECK exógena em linhagens derivadas de tumores de mama foi acompanhada da redução dos níveis de fosforilação da tirosina 705 de STAT3 (WALSH et al., 2015b). A avaliação de morte por anoikis em nossos modelos de cultivo em 3D e a definição do status de fosforilação de STAT3 nas linhagens estudadas representa uma das perspectivas deste estudo.

Ainda, demonstramos que tumores obtidos a partir de células SiHa RECK (6% vs. 2%) e SW756 RECK (7% vs. 4%) apresentavam um menor número de células endoteliais intratumorais positivas para o marcador CD31. Esta redução da frequência de células endoteliais foi acompanhada de uma redução significativa da sua viabilidade no contexto de superexpressão de RECK (SiHa – 10% vs. 50%; SW756 – 10% vs. 40% de células na fração Sub G1) quando comparada a tumores controles. Ainda, observamos que a superexpressão de RECK não gera alterações na frequência de células endoteliais em ensaios de descrição de populações intratumorais de tumores C33A.

A função de RECK é necessária para o desenvolvimento embrionário normal, facilitando o remodelamento tecidual ordenado através de seu controle sobre a manutenção da MEC adjacente aos vasos e ao tubo neural. Embriões de camundongos deficientes em RECK apresentam a letalidade ao 11º dia embrionário, em média. Estes animais apresentam organogênese interrompida, menor integridade tecidual, vasculogênese interrompida, angiogênese primitiva, diferenciação neuronal precoce e hemorragia abdominal (OH et al., 2001).

Outros autores ainda observaram que camundongos geneticamente modificados para apresentar baixa expressão global de RECK (*Reck*^{Low/Δ}) exibiam defeitos no padrão de formação de membros devido a interferência na via de sinalização de Wnt7a. Em tempo, em tecidos com perfil de proliferação elevado, como em embriões normais e em câmaras de

implantação uterinas, a expressão de *RECK* ocorre de forma abundante tanto em células endoteliais quanto em células murais. Por fim, vasos dilatados e com padrões luminiais anormais foram observados nestes mesmos tecidos em camundongos *Reck*^{Low/ Δ} (CHANDANA et al., 2010; YAMAMOTO et al., 2012).

Este grupo ainda demonstrou um mecanismo de letalidade embrionária precoce associada à deficiência da expressão de RECK. Este estudo utilizou modelo animal combinado ao uso da metodologia de formação de vasos a partir de cultura *ex vivo* de artérias aórticas de camundongos normais ou *Reck*^{Low/ Δ} . Estes autores observaram uma associação entre a expressão reduzida de RECK (especificamente em células murais) e letalidade embrionária precoce similar àquela observada em camundongos deficientes da expressão de RECK. Este estudo ainda argumentou que a expressão fisiológica de RECK é essencial para (i) a associação regular entre as células murais e células endoteliais *tip*, (ii) a manutenção correta de matriz de fibronectina ao redor dos vasos e para (iii) a estabilidade dos vasos formados (DE ALMEIDA et al., 2015).

É digno de nota que, de Almeida e colaboradores (2015) ainda discutiram que a morfologia anormal e dilatada observada para vasos em animais deficientes para a expressão de RECK pode ocorrer mediante fusão lateral de vasos instáveis e não somente por intuscepção abortiva (DE ALMEIDA et al., 2015). Dentro deste contexto, especulamos sobre o papel da redução da expressão de RECK em contextos patológicos que levam ao desenvolvimento de vasos frágeis e vazantes como é o caso das neoplasias sólidas (GOEL et al., 2011).

Este impacto sistêmico da ausência da expressão de RECK deve-se primariamente a não modulação da atividade proteolítica de MMP específicas, MMP-2, -9 e -14. Estas MMP em particular apresentam função essencial no brotamento de novos vasos durante a angiogênese fisiológica e associada a tumores (RIBATTI; CRIVELLATO, 2012; SIEKMANN; AFFOLTER; BELTING, 2013). A sua atividade proteolítica se associa com a liberação de diversos fatores de crescimento pró angiogênicos (VEGF, HGF, PDGF) a partir da degradação de moléculas reservatórias componentes da MEC (BERGERS et al., 2000; CARMELIET; JAIN, 2011; RIBATTI; CRIVELLATO, 2012).

Especificamente, as MMP-2 e -9 apresentam grande atividade na proteólise de colágeno IV, constituinte primário da membrana basal de epitélios e essencial para o início do remodelamento da MEC (ZHENG et al., 2006; VAN HINSBERGH; KOOLWIJK, 2008; RIBATTI; CRIVELLATO, 2012). Dentro do contexto de neoangiogênese tumoral, a maior atividade destas MMP se mostra consistentemente associada à liberação de VEGF de

reservatórios da MEC, contribuindo para o início da resposta de sobrevivência tumoral denominada de *angiogenic switch* (BERGERS et al., 2000).

A baixa expressão de RECK foi correlacionada anteriormente à maior capacidade de formação de vasos, invasão e surgimento de metástases locais e à distância também em modelos animais de tumor de mama (WALSH et al., 2015b). Estes resultados em conjunto indicam que a modulação da neoangiogênese tumoral pode influenciar no prognóstico de pacientes com tumores que expressam RECK.

Uma revisão publicada recentemente discute uma hipótese de que a expressão consistente de RECK nas células tumorais pode colaborar para a formação de novos vasos com características mais próximas da angiogênese fisiológica (GUTIÉRREZ et al., 2016). Estes vasos apresentam células acessórias às células endoteliais propriamente ditas que permitiriam uma perfusão mais adequada de O₂ e nutrientes, redução dos níveis de hipóxia e suas moléculas associadas a uma constante sinalização pró angiogênica. Esta maior capacidade de perfusão poderia ainda auxiliar em uma melhor resposta imune antitumoral por facilitar o fluxo de células inflamatórias e citotóxicas no tumor ou mesmo melhorar a difusão e a eficiência de fármacos antitumorais.

Ainda, os dados obtidos no presente estudo sobre a maior formação de fibras colágenas nos tumores SiHa RECK vai de encontro com o esperado diante de uma potencial menor atividade de MMP na circunstância de superexpressão de RECK (dados não apresentados). De fato, Oh e colaboradores (2001) descreveram ainda que os camundongos *knockout* para RECK apresentavam desestruturação de tecidos mesenquimais com virtual nulidade de arranjos de colágeno evidentes, além da organogênese anormal (OH et al., 2001). A avaliação (i) da integridade de fibras colágenas, (ii) da capacidade de perfusão de vasos intratumorais, (iii) níveis de hipóxia e (iv) a atividade de MMP em tumores derivados de células SiHa RECK, SW756 RECK e C33A RECK também é uma das perspectivas deste estudo.

Por fim, a observação do efeito negativo da superexpressão de RECK B sobre tumorigênese de SiHa em um ensaio piloto indica que isoformas de RECK podem ter papel de supressor de tumor independente de inibição de atividade de MMP (dados não apresentados). De fato, já foi demonstrado que a proteína RECK interage fisicamente com algumas moléculas de membrana como β 1-integrina, Galectina-1, IL-6Ra, gp130 e uPAR, em uma via convergente de modulação de *angiogenic switch* em câncer de mama (WALSH et al., 2015b).

Efeito da superexpressão de RECK nos parâmetros tumorigênicos de SiHa, SW756 e C33A: Frequência e viabilidade de células do infiltrado inflamatório local

Além do concorrente aumento do infiltrado inflamatório (CD45+) no ambiente intratumoral nos tumores SiHa RECK (2% vs. 60%) e SW756 RECK (3% vs. 30%), também observamos aumento da viabilidade destas células em tumores SiHa RECK quando comparados aos seus controles (40% vs. 1% de células na fração Sub G1). A superexpressão de RECK também gerou alterações na frequência de populações específicas deste infiltrado. Observamos uma redução significativa na frequência de neutrófilos (CD45+/Ly6G+) (SiHa – 50% vs. 10%; SW756 – 10% vs. 5%) e potenciais células mielóides supressoras (CD45+/Ly6C+/Ly6G+) (SiHa – 20% vs. 5%; SW756 – 50% vs. 20%) em tumores derivados de células tumorais infectadas por HPV. Especificamente em tumores derivados de células SiHa RECK, observamos que este efeito foi também acompanhado da redução da população de macrófagos (CD45+/Ly6C+/F4/80+) (30% vs. 5%) e do aumento na população de células NK (CD45+/Ly6-/Ly6G-/CD49b+) (2% vs. 4%) nossos ensaios de tumorigênese em modelo animal.

Vale ressaltar que estas são as primeiras evidências de que a superexpressão da proteína RECK pode interferir no infiltrado inflamatório associado ao microambiente tumoral. Por fim, observamos que a superexpressão de RECK não gera alterações na frequência de infiltrado inflamatório de forma geral ou mesmo em populações celulares específicas em ensaios de descrição de populações intratumorais de tumores C33A.

Em condições fisiológicas, a presença de células capazes de conter uma resposta inflamatória local é vital para a manutenção do equilíbrio dinâmico do sistema imune. No estabelecimento de neoplasias, a perturbação da dinâmica de infiltração, ativação e manutenção de células como macrófagos de fenótipo M2 e células mieloderivadas supressoras no microambiente tumoral pode contribuir para a progressão da doença ao interferir com a resposta imune anti tumoral (MANTOVANI et al., 2002; CONDEELIS; POLLARD, 2006; SICA; BRONTE, 2007).

O microambiente tumoral pode ser caracterizado como um ambiente de ecologia complexa que apresenta um comportamento dinâmico com o processo de transformação tecidual e com a história natural do tumor. Macrófagos associados a tumores (TAM) podem promover diversos eventos cruciais para a progressão tumoral incluindo angiogênese

aumentada, invasão, motilidade e intravasão de células tumorais (QIAN; POLLARD, 2010; NOY; POLLARD, 2014).

Os TAM ainda podem atuar como agentes imunossupressores, interferindo na destruição de células tumorais por células NK ou T durante a progressão tumoral e/ou após quimio ou imunoterapia antitumoral. Em tempo, macrófagos podem expressar moléculas MHC-I não clássicas como HLA-G ancoradas à membrana celular ou em sua forma solúvel que podem inibir a ativação de células NK (QIAN; POLLARD, 2010; NOY; POLLARD, 2014).

Em particular, o papel da inflamação no processo de carcinogênese associada à infecção persistente por HPV e os TAM de colo de útero já foram avaliados anteriormente pelo grupo. No contexto de tumores gerados a partir de células transformadas por oncogenes de HPV16, foi observado que os TAMs apresentam fenótipo tipo M2 com atividade de arginase I basal, alta produção de interleucina-10 (IL-10) e resistência à reversão para o fenótipo tipo M1 quando estimuladas *in vitro*. A depleção destes TAM gerou impacto em ensaio de tumorigênese *in vivo* ao inibir o crescimento tumoral e permitir a entrada de linfócitos CD8+ específicos para antígenos de HPV no tumor. Conceitua-se hoje que o infiltrado de TAM com fenótipo M2 associado a tumores positivos para HPV16 pode contribuir para a supressão da resposta antitumoral de linfócitos T, facilitando desta forma o crescimento tumoral (LEPIQUE et al., 2009; BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010; BOLPETTI et al., 2010; STONE et al., 2014).

Em um estudo mais recente, o grupo ainda apresentou dados sobre as alterações do sistema imune local em pacientes com CIN1-3 ou carcinomas invasivos de colo de útero. O estudo demonstrou (i) um aumento na frequência de neutrófilos, macrófagos com fenótipo M2 e células T e (ii) uma correlação negativa entre a frequência de neutrófilos e células T nas pacientes. Este trabalho ainda descreveu que neutrófilos inibem a atividade de células T e apresentam maior viabilidade quando cultivados em conjunto com esferoides de células SiHa, quando comparados ao cultivo de neutrófilos puros. Desta forma, um dos mecanismos de escape ao sistema imune das células tumorais cervicais pode ser através do efeito de neutrófilos sobre a função das células T locais (ALVAREZ et al., 2017).

A potencial interferência de RECK com a resposta antitumoral é intrigante e considerável para uma exploração mais profunda em modelos de animais imunocompetentes, objetivo adicionado às perspectivas futuras deste estudo. Esta abordagem se faz crucial uma vez que a mesma responderá sobre o real potencial da molécula RECK como um alvo terapêutico associado ao tratamento do câncer de colo de útero.

De forma alternativa, observações descritas na literatura sobre o papel de RECK na mobilização/retenção de células HSPC (do inglês *hematopoietic stem and progenitor cells*) na medula óssea são interessantes diante dos futuros desdobramentos deste projeto. Os dados publicados até o momento apontam para um papel crucial da expressão de RECK, e sua função de inibição de MT1-MMP, na redução do potencial de migração de células HSPC para fora da medula óssea (VAGIMA et al., 2009; GOLAN et al., 2011).

Os modelos de estudo de migração de células HSPC a partir da medula óssea apontam que estas células (i) perdem adesão com células estromais da medula, (ii) translocam-se através da barreira endotelial e (iii) extravazam para a circulação sanguínea. Estes eventos são coordenados por diversas citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (como a MT1-MMP) cujas funções convergem para a regulação positiva da migração de células HSPC (LAPIDOT; PETIT, 2002; NERVI; LINK; DIPERSIO, 2006).

Já foi demonstrado que o tratamento com G-CSF (do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*) induz a mobilização de células HSPC via aumento de expressão de MT1-MMP e HIF1 α e redução dos níveis proteicos de RECK, em modelo de transplante de medula óssea humana e murina (LÉVESQUE et al., 2007; VAGIMA et al., 2009; SHIRVAIKAR et al., 2010). Ainda, estes autores demonstraram que esta alteração recíproca na expressão de MT1-MMP e RECK induzida por G-CSF (i) é dependente da ativação de PI3K/Akt, (ii) leva à clivagem da molécula de adesão CD44 e (iii) pode ser antagonizada pelo tratamento com Rapamicina (VAGIMA et al., 2009). É importante destacar que a liberação de catecolamina pelo sistema nervoso simpático pode gerar um efeito similar ao levar à ativação de PI3K/Akt em HSPC na medula óssea. Dentro deste contexto, a liberação destas células da medula óssea ocorre através da clivagem de CD44 por MT1-MMP na ausência do seu regulador negativo RECK (GOLAN et al., 2011).

O mecanismo de mobilização de HSPC induzido por G-CSF envolve (i) a proliferação de HSPC quiescentes e o aumento da população de células progenitoras, (ii) acompanhada da liberação destas HSPC do microambiente da medula óssea. Por fim, estes autores demonstraram que ocorre um aumento na secreção de enzimas proteolíticas por neutrófilos e demais células mieloides na medula óssea, concorrente com o aumento da mobilização de HSPC, após cinco dias de tratamento com G-CSF. Estes resultados foram associados à redução da expressão de RECK para este modelo de estudo.

Estes dados permitem afirmar que a função fisiológica de RECK não se limita a embriogênese ou ainda a angiogênese humana e murina, mas também tem papel no destino de células da medula óssea. Todavia, o comportamento de células derivadas da medula óssea na

presença de células tumorais que superexpressam RECK ainda não foi demonstrado na literatura. De fato, os dados sobre a associação da superexpressão de RECK em células SiHa, SW756 e C33A e as alterações no infiltrado inflamatório intratumoral gerados por este projeto podem contribuir para responder esta pergunta para o contexto de tumores de colo de útero.

Avaliação da expressão de mRNA de RECK em amostras clínicas: análises in silico dos bancos de dados depositados na plataforma GEO

As análises de expressão de mRNA de RECK foram realizadas nos bancos de dados de expressão global a partir de amostras clínicas de pacientes diagnosticadas com CIN1-3 e carcinoma invasivo de cólo de útero em comparação com os seus respectivos controles. Os dados gerados permitiram a descrição de que a redução da expressão de RECK é (i) precoce na história natural da carcinogênese do colo de útero, (ii) intensificada com a progressão das lesões CIN e (iii) consistente entre os bancos de dados avaliados. Além disso, esta análise mostrou que a expressão de mRNA de RECK é reduzida em carcinomas invasivos de colo de útero quando comparadas à mucosas cervicais normais. Em conjunto, estes dados corroboram com os resultados do nosso grupo que apontam para uma correlação inversa entre a expressão de RECK e o processo de transformação do colo de útero (CARDEAL et al., 2012; DISCACCIATI et al., 2015).

A hipermetilação do gene RECK já foi observada em amostras clínicas de diversas outras neoplasias, porém não encontramos dados sobre o status de metilação deste gene em câncer de colo de útero (CHANG; CHO; HUNG, 2007; CHO et al., 2007; LONG et al., 2008; PESTA et al., 2009; DU; DAI; YANG, 2010; ZHANG et al., 2012a; LU et al., 2013, 2017; ZHOU et al., 2015; ZHU et al., 2017). Desta forma, avaliamos uma série de dados que reuniu amostras clínicas de mucosa cervical normal, CIN1-3 e carcinomas invasivos. Os resultados obtidos apontam para a hipermetilação precoce do gene RECK em lesões CIN e para a manutenção destes níveis de metilação aumentados também nos carcinomas invasivos. De fato, esta análise ainda não contempla se a hipermetilação do gene RECK na história natural câncer de colo de útero está associada à infecção por HPV. Em tempo, este estudo não avaliou outros mecanismos de repressão da expressão deste gene, como a atuação de microRNA (miR) específicos ou ainda alterações em histonas.

Em seguida, avaliamos a associação da expressão de mRNA de RECK com parâmetros clínicos associados a progressão da doença nas pacientes. De forma inédita, esta

análise demonstrou que a redução da expressão de RECK pode ter associação (i) com a progressão de lesões CIN3+ para carcinomas invasivos e (ii) com a maior capacidade de tumores em estágio de gerar metástase para linfonodo pélvico. Ademais, o tratamento de pacientes com carcinomas invasivos com QRT levou a um aumento na expressão de mRNA de RECK nos tumores. A avaliação do papel prognóstico da expressão de RECK em relação à resposta a tratamento e sobrevida das pacientes com câncer de colo de útero, a partir de novas séries de dados depositados nas plataformas TCGA e Oncomine, representa uma das perspectivas deste estudo.

Em tempo, o estudo atual ainda não contemplou todos os mecanismos pelos quais a expressão de RECK é reduzida no desenvolvimento do câncer de colo de útero e o quanto desta regulação está associada às alterações celulares causadas pelas oncoproteínas de HPV. Em conjunto, os dados apresentados podem contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na atividade antitumoral de RECK em nosso modelo.

CONCLUSÕES

As diversas abordagens realizadas durante este projeto de doutorado nos permitiram concluir alguns pontos sobre o efeito da superexpressão de RECK no potencial tumorigênico de linhagens celulares derivadas de tumores de colo de útero:

- O efeito supressor de tumor de RECK foi consistente entre as linhagens HPV positivas nas análises *in vitro* (efeito direto) e *in vivo* (efeito indireto), independente do fato das linhagens apresentarem infecção por tipos diferentes de HPV de alto risco oncogênico (HPV 16 e HPV 18).
- Foi observado um efeito de RECK sobre a redução do potencial tumorigênico também da linhagem HPV negativa; o que aponta para o fato de que independente da ausência do vírus, o mecanismo de transformação desta linhagem não impediu a sensibilidade destas células ao efeito da superexpressão do supressor de tumor RECK.
- RECK B também demonstrou efeito negativo no potencial tumorigênico das linhagens analisadas; o que aponta para um papel supressor de tumor desta molécula, independente da função clássica de inibição da atividade de serina proteases, em linhagens tumorais de colo de útero.
- Demonstramos de forma inédita a associação entre a superexpressão de RECK e (i) o aumento da frequência e viabilidade e (ii) o perfil de populações de células do infiltrado inflamatório intratumoral.
- O efeito de RECK sobre a frequência e viabilidade das populações celulares intratumorais foi específico para os tumores derivados das linhagens infectadas por HPV, o que sugere que este fenômeno pode ser dependente da interação entre os efeitos da infecção por HPV e de RECK no microambiente tumoral.
- Os dois fármacos potenciais indutores da expressão de RECK testados são capazes de alterar a viabilidade de células SiHa.

- Os dados de amostras clínicas demonstraram que ocorre hipermetilação do gene RECK e redução da sua expressão de maneira precoce ao longo da história natural do câncer de colo de útero; esta regulação negativa da expressão de RECK é um evento comum a diversos bancos de dados avaliados e que os dados de expressão de RECK apresentam associação com alguns parâmetros clínicos das pacientes.

REFERÊNCIAS

- ALEMANY, L.; CUBILLA, A.; HALEC, G.; KASAMATSU, E.; QUIRÓS, B.; MASFERRER, E.; TOUS, S.; LLOVERAS, B.; HERNÁNDEZ-SUAREZ, G.; LONSDALE, R.; TINOCO, L.; ALEJO, M.; ALVARADO-CABRERO, I.; LACO, J.; GUIMERÀ, N.; POBLET, E.; LOMBARDI, L. E.; BERGERON, C.; CLAVERO, O.; SHIN, H.-R.; FERRERA, A.; FELIX, A.; GERMAR, J.; MANDYS, V.; CLAVEL, C.; TZARDI, M.; PONS, L. E.; WAIN, V.; CRUZ, E.; MOLINA, C.; MOTA, J. D.; JACH, R.; VELASCO, J.; CARRILHO, C.; LÓPEZ-REVILLA, R.; GOODMAN, M. T.; QUINT, W. G.; CASTELLSAGUÉ, X.; BRAVO, I.; PAWLITA, M.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. **European Urology**, v. 69, n. 5, p. 953–961, maio 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283815012154>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- ALEXIUS-LINDGREN, M.; ANDERSSON, E.; LINDSTEDT, I.; ENGSTRÖM, W. The RECK gene and biological malignancy—its significance in angiogenesis and inhibition of matrix metalloproteinases. **Anticancer research**, v. 34, n. 8, p. 3867–73, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075007>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- ALVAREZ, K. L. F.; BELDI, M.; SARMANHO, F.; ROSSETTI, R. A. M.; SILVEIRA, C. R. F.; MOTA, G. R.; ANDREOLI, M. A.; CARUSO, E. D. de C.; KAMILLOS, M. F.; SOUZA, A. M.; MASTROCALLA, H.; CLAVIJO-SALOMON, M. A.; BARBUTO, J. A. M.; LORENZI, N. P.; LONGATTO-FILHO, A.; BARACAT, E.; LOPEZ, R. V. M.; VILLA, L. L.; TACLA, M.; LEPIQUE, A. P. Local and systemic immunomodulatory mechanisms triggered by Human Papillomavirus transformed cells: a potential role for G-CSF and neutrophils. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9002, 21 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28827632>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- BAKER, A. H.; EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 19, p. 3719–27, 1 out. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235282>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- BARBOSA, M. S.; EDMONDS, C.; FISHER, C.; SCHILLER, J. T.; LOWY, D. R.; VOUSDEN, K. H. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. **The EMBO journal**, v. 9, n. 1, p. 153–60, jan. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2153075>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- BERGERS, G.; BREKKEN, R.; MCMAHON, G.; VU, T. H.; ITOH, T.; TAMAKI, K.; TANZAWA, K.; THORPE, P.; ITOHARA, S.; WERB, Z.; HANAHAN, D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nature cell biology**, v. 2, n. 10, p. 737–44, 1 out. 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ncb1000_737>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- BISSELL, M. J.; LABARGE, M. A. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? **Cancer cell**, v. 7, n. 1, p. 17–23, jan. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610804003757>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 11, p. 1905–1912, 1 nov. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20819779>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- BOLPETTI, A.; SILVA, J. S.; VILLA, L. L.; LEPIQUE, A. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. **BMC Immunology**, v. 11, n. 1, p. 27, 7

- jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20525400>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- BOULET, G.; HORVATH, C.; BROECK, D. Vanden; SAHEBALI, S.; BOGERS, J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 11, p. 2006–2011, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17768080>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- BRANCA, M.; CIOTTI, M.; GIORGI, C.; SANTINI, D.; DI BONITO, L.; COSTA, S.; BENEDETTO, A.; BONIFACIO, D.; DI BONITO, P.; PABA, P.; ACCARDI, L.; SYRJÄNEN, S.; FAVALLI, C.; SYRJÄNEN, K. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. **Anticancer Research**, v. 26, n. 2 B, p. 1543–1556, 2006.
- BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1477, n. 1–2, p. 267–83, 7 mar. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708863>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1803, n. 1, p. 55–71, jan. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488910000042>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- BRUMMER, O.; BÖHMER, G.; HOLLWITZ, B.; FLEMMING, P.; PETRY, K.-U.; KÜHNLE, H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. **Gynecologic oncology**, v. 84, n. 2, p. 222–7, fev. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825801964133>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- BZHALAVA, D.; GUAN, P.; FRANCESCHI, S.; DILLNER, J.; CLIFFORD, G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 224–231, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23928291>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- CARDEAL, L. B. da S.; BOCCARDO, E.; TERMINI, L.; RABACHINI, T.; ANDREOLI, M. A.; DI LORETO, C.; FILHO, A. L.; VILLA, L. L.; MARIA-ENGLER, S. S. HPV16 Oncoproteins Induce MMPs/RECK-TIMP-2 Imbalance in Primary Keratinocytes: Possible Implications in Cervical Carcinogenesis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33585, 16 mar. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033585>>. Acesso em: 19 mar. 2018.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 298–307, 19 maio 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature10144>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- CAWSTON, T. E.; GALLOWAY, W. A.; MERCER, E.; MURPHY, G.; REYNOLDS, J. J. Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. **The Biochemical journal**, v. 195, n. 1, p. 159–65, 1 abr. 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6272744>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- CHANDANA, E. P.; MAEDA, Y.; UEDA, A.; KIYONARI, H.; OSHIMA, N.; YAMAMOTO, M.; KONDO, S.; OH, J.; TAKAHASHI, R.; YOSHIDA, Y.; KAWASHIMA, S.; ALEXANDER, D. B.; KITAYAMA, H.; TAKAHASHI, C.; TABATA, Y.; MATSUZAKI, T.; NODA, M. Involvement of the Reck tumor suppressor protein in maternal and embryonic vascular remodeling in mice. **BMC Developmental Biology**, v. 10, n. 1, p. 84, 2010. Disponível em: <<http://bmcddevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-213X-10-84>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis.

- Trends in cell biology**, v. 11, n. 11, p. S37-43, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684441>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- CHANG, H.-C.; CHO, C.-Y.; HUNG, W.-C. Downregulation of RECK by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. **Cancer science**, v. 98, n. 2, p. 169–73, fev. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17233834>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- CHEN, Y.; TSAI, Y.-H.; TSENG, S.-H. Valproic acid affected the survival and invasiveness of human glioma cells through diverse mechanisms. **Journal of neuro-oncology**, v. 109, n. 1, p. 23–33, 15 ago. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11060-012-0871-y>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- CHO, C.-Y.; WANG, J.-H.; CHANG, H.-C.; CHANG, C.-K.; HUNG, W.-C. Epigenetic inactivation of the metastasis suppressor RECK enhances invasion of human colon cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 1, p. 65–69, out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17443689>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- CHUNG, T.-T.; YEH, C.-B.; LI, Y.-C.; SU, S.-C.; CHIEN, M.-H.; YANG, S.-F.; HSIEH, Y.-H. Effect of RECK gene polymorphisms on hepatocellular carcinoma susceptibility and clinicopathologic features. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33517, 12 mar. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033517>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263–266, 27 jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439202>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- CROOK, T.; TIDY, J. A.; VOUSDEN, K. H. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. **Cell**, v. 67, n. 3, p. 547–56, 1 nov. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1657399>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- DA SILVA CARDEAL, L. B.; BROHEM, C. A.; CORRÊA, T. C. S.; WINNISCHOFER, S. M. B.; NAKANO, F.; BOCCARDO, E.; VILLA, L. L.; SOGAYAR, M. C.; MARIA-ENGLER, S. S. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 84, n. 5, p. 713–9, out. 2006. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/o06-084>>. Acesso em: 19 mar. 2018.
- DAVIDSON, B.; GOLDBERG, I.; KOPOLOVIC, J.; LERNER-GEVA, L.; GOTLIEB, W. H.; WEIS, B.; BEN-BARUCH, G.; REICH, R. Expression of matrix metalloproteinase-9 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix-clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. **Gynecologic oncology**, v. 72, n. 3, p. 380–6, mar. 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090825898952854>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- DE ALMEIDA, G. M.; YAMAMOTO, M.; MORIOKA, Y.; OGAWA, S.; MATSUZAKI, T.; NODA, M. Critical roles for murine Reck in the regulation of vascular patterning and stabilization. **Scientific Reports**, v. 5, n. October, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep17860>>.
- DE MARTEL, C.; FERLAY, J.; FRANCESCHI, S.; VIGNAT, J.; BRAY, F.; FORMAN, D.; PLUMMER, M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 6, p. 607–615, jun. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204512701377>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- DE VILLIERS, E.-M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H.-U.; ZUR HAUSEN, H. Classification

- of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 20 jun. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183049>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- DISCACCIATI, M. G.; GIMENES, F.; PENNACCHI, P. C.; FAIAO-FLORES, F.; ZEFERINO, L. C.; DERCHAIN, S. M.; TEIXEIRA, J. C.; COSTA, M. C.; ZONTA, M.; TERMINI, L.; BOCCARDO, E.; LONGATTO-FILHO, A.; CONSOLARO, M. E. L.; VILLA, L. L.; MARIA-ENGLER, S. S. MMP-9/RECK Imbalance: A Mechanism Associated with High-Grade Cervical Lesions and Genital Infection by Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 24, n. 10, p. 1539–1547, 1 out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26261088>>. Acesso em: 19 mar. 2018.
- DU, Y.-Y.; DAI, D.-Q.; YANG, Z. Role of RECK methylation in gastric cancer and its clinical significance. **World journal of gastroenterology**, v. 16, n. 7, p. 904–8, 21 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20143471>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- DUENSING, S.; LEE, L. Y.; DUENSING, A.; BASILE, J.; PIBOONNIYOM, S.; GONZALEZ, S.; CRUM, C. P.; MUNGER, K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 10002–7, 29 ago. 2000. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.170093297>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- DUENSING, S.; MÜNGER, K. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. **Oncogene**, v. 21, n. 40, p. 6241–8, 9 set. 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1205709>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- DUENSING, S.; MÜNGER, K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members. **Journal of virology**, v. 77, n. 22, p. 12331–5, nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581569>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- DYSON, N.; HOWLEY, P. M.; MÜNGER, K.; HARLOW, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science (New York, N.Y.)**, v. 243, n. 4893, p. 934–7, 17 fev. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2537532>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161–174, mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990853>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- ELIT, L.; FYLES, A. W.; OLIVER, T. K.; DEVRIES-ABOUD, M. C.; FUNG-KEE-FUNG, M.; MEMBERS OF THE GYNECOLOGY CANCER DISEASE SITE GROUP OF CANCER CARE ONTARIO'S PROGRAM IN EVIDENCE-BASED CARE. Follow-up for women after treatment for cervical cancer. **Current oncology (Toronto, Ont.)**, v. 17, n. 3, p. 65–9, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567627>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, n. 33, p. 5201–5207, 11 ago. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12910257>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns

- in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 1 mar. 2015a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 1 mar. 2015b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29210>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. (David M.); HOWLEY, P. M. **Fields virology**. [s.l.] Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- FORMAN, D.; DE MARTEL, C.; LACEY, C. J.; SOERJOMATARAM, I.; LORTET-TIEULENT, J.; BRUNI, L.; VIGNAT, J.; FERLAY, J.; BRAY, F.; PLUMMER, M.; FRANCESCHI, S. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. **Vaccine**, v. 30, p. F12–F23, nov. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X12010808>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- FUNK, J. O.; WAGA, S.; HARRY, J. B.; ESPLING, E.; STILLMAN, B.; GALLOWAY, D. A. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. **Genes & development**, v. 11, n. 16, p. 2090–100, 15 ago. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9284048>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- FURUMOTO, K.; ARII, S.; MORI, A.; FURUYAMA, H.; GORRIN RIVAS, M. J.; NAKAO, T.; ISOBE, N.; MURATA, T.; TAKAHASHI, C.; NODA, M.; IMAMURA, M. RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 33, n. 1, p. 189–95, jan. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1053/jhep.2001.21048>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- GHITTONI, R.; ACCARDI, R.; HASAN, U.; GHEIT, T.; SYLLA, B.; TOMMASINO, M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. **Virus Genes**, v. 40, n. 1, p. 1–13, 17 fev. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11262-009-0412-8>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- GOEL, S.; DUDA, D. G.; XU, L.; MUNN, L. L.; BOUCHER, Y.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Normalization of the Vasculature for Treatment of Cancer and Other Diseases. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 3, p. 1071–1121, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742796>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- GOLAN, K.; VAGIMA, Y.; GOICHBERG, P.; GUR-COHEN, S.; LAPIDOT, T. MT1-MMP and RECK: opposite and essential roles in hematopoietic stem and progenitor cell retention and migration. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 89, n. 12, p. 1167–74, 13 dez. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00109-011-0792-9>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- GUTIÉRREZ, J.; DROPPELMANN, C. A.; SALSOSO, R.; WESTERMEIER, F.; TOLEDO, F.; SALOMON, C.; SANHUEZA, C.; PARDO, F.; LEIVA, A.; SOBREVIA, L. A Hypothesis for the Role of RECK in Angiogenesis. **Current vascular pharmacology**, v. 14, n. 1, p. 106–15, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26463982>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- HASAN, U. A.; BATES, E.; TAKESHITA, F.; BILIATO, A.; ACCARDI, R.; BOUVARD, V.; MANSOUR, M.; VINCENT, I.; GISSMANN, L.; IFTNER, T.; SIDERI, M.; STUBENRAUCH, F.; TOMMASINO, M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 178, n. 5, p. 3186–97, 1 mar. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312167>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

- HASAN, U. A.; ZANNETTI, C.; PARROCHE, P.; GOUTAGNY, N.; Malfroy, M.; Roblot, G.; CARREIRA, C.; HUSSAIN, I.; MÜLLER, M.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; PICARD, D.; SYLLA, B. S.; TRINCHIERI, G.; MEDZHITOV, R.; TOMMASINO, M. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, n. 7, p. 1369–87, 1 jul. 2013. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20122394>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Reviews in Medical Virology**, v. 16, n. 2, p. 83–97, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287204>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- HONG, K.-J.; WU, D.-C.; CHENG, K.-H.; CHEN, L.-T.; HUNG, W.-C. RECK inhibits stemness gene expression and tumorigenicity of gastric cancer cells by suppressing ADAM-mediated Notch1 activation. **Journal of cellular physiology**, v. 229, n. 2, p. 191–201, fev. 2014a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.24434>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- HONG, K.-J.; WU, D.-C.; CHENG, K.-H.; CHEN, L.-T.; HUNG, W.-C. RECK inhibits stemness gene expression and tumorigenicity of gastric cancer cells by suppressing ADAM-mediated Notch1 activation. **Journal of cellular physiology**, v. 229, n. 2, p. 191–201, fev. 2014b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.24434>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- HONG, K. J.; WU, D. C.; CHENG, K. H.; CHEN, L. T.; HUNG, W. C. RECK Inhibits Stemness Gene Expression and Tumorigenicity of Gastric Cancer Cells by Suppressing ADAM-Mediated Notch1 Activation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 2, p. 191–201, 2014c.
- HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 proteins. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 324–334, 20 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19081593>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- HU, Y.; CHEN, H.; DUAN, C.; LIU, D.; QIAN, L.; YANG, Z.; GUO, L.; SONG, L.; YU, M.; HU, M.; SHI, M.; GUO, N. Deficiency of Erbin induces resistance of cervical cancer cells to anoikis in a STAT3-dependent manner. **Oncogenesis**, v. 2, n. 6, p. e52, 17 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/oncsis201318>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- HUANG, S.-M.; MCCANCE, D. J. Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. **Journal of virology**, v. 76, n. 17, p. 8710–21, set. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163591>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. Human papillomaviruses. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 90, p. 1–636, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18354839>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- ITOH, Y.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. **Essays in biochemistry**, v. 38, p. 21–36, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12463159>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- KAEWPRAG, J.; UMNAJVIJIT, W.; NGAMKHAM, J.; PONGLIKITMONGKOL, M. HPV16 Oncoproteins Promote Cervical Cancer Invasiveness by Upregulating Specific Matrix Metalloproteinases. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–11, 2013.
- KANAI, M.; WEI, D.; LI, Q.; JIA, Z.; AJANI, J.; LE, X.; YAO, J.; XIE, K. Loss of Krüppel-like factor 4

- expression contributes to Sp1 overexpression and human gastric cancer development and progression. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 21, p. 6395–402, 1 nov. 2006. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-1034>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- KAPLAN, R. N.; RIBA, R. D.; ZACHAROULIS, S.; BRAMLEY, A. H.; VINCENT, L.; COSTA, C.; MACDONALD, D. D.; JIN, D. K.; SHIDO, K.; KERNS, S. A.; ZHU, Z.; HICKLIN, D.; WU, Y.; PORT, J. L.; ALTORKI, N.; PORT, E. R.; RUGGERO, D.; SHMELKOV, S. V.; JENSEN, K. K.; RAFII, S.; LYDEN, D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 820–827, 8 dez. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341007>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- KATO, Y.; YAMASHITA, T.; ISHIKAWA, M. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. **Oncology Reports**, v. 9, n. 3, p. 565–569, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11956628>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, abr. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867410002886>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- KESSIS, T. D.; SLEBOS, R. J.; NELSON, W. G.; KASTAN, M. B.; PLUNKETT, B. S.; HAN, S. M.; LORINCZ, A. T.; HEDRICK, L.; CHO, K. R. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 9, p. 3988–92, 1 maio 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8387205>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- KLINGELHUTZ, A. J.; ROMAN, A. Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. **Virology**, v. 424, n. 2, p. 77–98, 15 mar. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682211005988>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- KORZENIEWSKI, N.; SPARDY, N.; DUENSING, A.; DUENSING, S. Genomic instability and cancer: Lessons learned from human papillomaviruses. **Cancer Letters**, v. 305, n. 2, p. 113–122, jun. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383510004891>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- KORZENIEWSKI, N.; TREAT, B.; DUENSING, S. The HPV-16 E7 oncoprotein induces centriole multiplication through deregulation of Polo-like kinase 4 expression. **Molecular cancer**, v. 10, n. 1, p. 61, 24 maio 2011. Disponível em: <<http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-10-61>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- LAFLEUR, M. A.; TESTER, A. M.; THOMPSON, E. W. Selective involvement of TIMP-2 in the second activation cleavage of pro-MMP-2: refinement of the pro-MMP-2 activation mechanism. **FEBS letters**, v. 553, n. 3, p. 457–63, 23 out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14572669>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- LAPIDOT, T.; PETIT, I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. **Experimental hematology**, v. 30, n. 9, p. 973–81, set. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12225788>>. Acesso em: 2 abr. 2018.
- LECHNER, M. S.; MACK, D. H.; FINICLE, A. B.; CROOK, T.; VOUSDEN, K. H.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. **The EMBO**

- journal**, v. 11, n. 8, p. 3045–52, ago. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1379175>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- LEPIQUE, A. P.; DAGHASTANLI, K. R. P.; CUCCOVIA, I. M.; VILLA, L. L. HPV16 Tumor Associated Macrophages Suppress Antitumor T Cell Responses. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 13, p. 4391–4400, 1 jul. 2009. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-09-0489>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- LÉVESQUE, J.-P.; WINKLER, I. G.; HENDY, J.; WILLIAMS, B.; HELWANI, F.; BARBIER, V.; NOWLAN, B.; NILSSON, S. K. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 8, p. 1954–65, ago. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2006-0688>>. Acesso em: 2 abr. 2018.
- LIBRA, M.; SCALISI, A.; VELLA, N.; CLEMENTI, S.; SORIO, R.; STIVALA, F.; SPANDIDOS, D. A.; MAZZARINO, C. Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). **International journal of oncology**, v. 34, n. 4, p. 897–903, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287946>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- LIU, L.-T.; PENG, J.-P.; CHANG, H.-C.; HUNG, W.-C. RECK is a target of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. **Oncogene**, v. 22, n. 51, p. 8263–70, 13 nov. 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1207157>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- LIU, Y.; HEILMAN, S. A.; ILLANES, D.; SLUDER, G.; CHEN, J. J. p53-independent abrogation of a postmitotic checkpoint contributes to human papillomavirus E6-induced polyploidy. **Cancer research**, v. 67, n. 6, p. 2603–10, 15 mar. 2007. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-3436>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- LIU, Y.; LI, L.; LIU, Y.; GENG, P.; LI, G.; YANG, Y.; SONG, H. RECK inhibits cervical cancer cell migration and invasion by promoting p53 signaling pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, n. August 2017, p. 3058–3066, 2018.
- LONG, N. K.; KATO, K.; YAMASHITA, T.; MAKITA, H.; TOIDA, M.; HATAKEYAMA, D.; HARA, A.; MORI, H.; SHIBATA, T. Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, v. 44, n. 11, p. 1052–1058, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485791>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- LOU, Z.; O'REILLY, S.; LIANG, H.; MAHER, V. M.; SLEIGHT, S. D.; MCCORMICK, J. J. Down-regulation of overexpressed sp1 protein in human fibrosarcoma cell lines inhibits tumor formation. **Cancer research**, v. 65, n. 3, p. 1007–17, 1 fev. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705902>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- LU, X.-X.; ZHANG, S.-M.; FANG, Y.; WANG, Z.-T.; XIE, J.-J.; ZHAN, Q.; DENG, X.-X.; CHEN, H.; JIN, J.-B.; PENG, C.-H.; LI, H.-W.; SHEN, B.-Y. Clinical significance of RECK promoter methylation in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 34, n. 6, p. 3339–43, 8 dez. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-013-0903-z>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- LU, Y.; ZABIHULA, B.; YIBULAYIN, W.; LIU, X. Methylation and expression of RECK, P53 and RUNX genes in patients with esophageal cancer. **Oncology Letters**, v. 14, n. 5, p. 5293–5298, 31 ago. 2017. Disponível

em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29113164>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–55, nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401408>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

MAREEL, M.; LEROY, A. Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 2, p. 337–376, abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663862>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

MARTEL, C. De; FERLAY, J.; FRANCESCHI, S.; VIGNAT, J.; BRAY, F.; FORMAN, D.; PLUMMER, M. Chronic disease management in ageing populations. **The Lancet**, v. 379, n. 9829, p. 1851, 2012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70137-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70137-7)>.

MASUI, T.; DOI, R.; KOSHIBA, T.; FUJIMOTO, K.; TSUJI, S.; NAKAJIMA, S.; KOIZUMI, M.; TOYODA, E.; TULACHAN, S.; ITO, D.; KAMI, K.; MORI, T.; WADA, M.; NODA, M.; IMAMURA, M. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. 1779–84, maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738734>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MÜNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 335–344, 20 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19007963>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F.; MCANCE, D. J. Biology of human papillomaviruses. **International journal of experimental pathology**, v. 82, n. 1, p. 15–33, fev. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11422538>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

MIKI, T.; TAKEGAMI, Y.; OKAWA, K.; MURAGUCHI, T.; NODA, M.; TAKAHASHI, C. The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 16, p. 12341–52, 20 abr. 2007a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329256>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

MIKI, T.; TAKEGAMI, Y.; OKAWA, K.; MURAGUCHI, T.; NODA, M.; TAKAHASHI, C. The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 16, p. 12341–52, 20 abr. 2007b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329256>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

MIN, W.; WEN-LI, M.; ZHAO-HUI, S.; LING, L.; BAO, Z.; WEN-LING, Z. Microarray analysis identifies differentially expressed genes induced by human papillomavirus type 18 E6 silencing RNA. **International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society**, v. 19, n. 4, p. 547–63, maio 2009. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00009577-200905000-00011>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

MORI, T.; MORIUCHI, R.; OKAZAKI, E.; YAMADA, K.; KATAMINE, S. Tgcat oncoprotein functions as a inhibitor of RECK by association of the unique C-terminal region. **Biochemical and Biophysical Research**

- Communications**, v. 355, n. 4, p. 937–943, 20 abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17328864>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- MÜNGER, K.; WERNES, B. A.; DYSON, N.; PHELPS, W. C.; HARLOW, E.; HOWLEY, P. M. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **The EMBO journal**, v. 8, n. 13, p. 4099–105, 20 dez. 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2556261>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- MURAGUCHI, T.; TAKEGAMI, Y.; OHTSUKA, T.; KITAJIMA, S.; CHANDANA, E. P. S.; OMURA, A.; MIKI, T.; TAKAHASHI, R.; MATSUMOTO, N.; LUDWIG, A.; NODA, M.; TAKAHASHI, C. RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 838–45, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17558399>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 5, p. 290–308, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18619669>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- MYSLIWIEC, A. G.; ORNSTEIN, D. L. Matrix Metalloproteinases in Colorectal Cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 1, n. 4, p. 208–219, fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450419>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathology international**, v. 52, n. 4, p. 255–64, abr. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031080>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 562–573, 15 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405877>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 31, p. 21491–4, 30 jul. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10419448>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- NAGINI, S. RECKing MMP: relevance of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs as a prognostic marker and therapeutic target for cancer (a review). **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 12, n. 7, p. 718–25, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22292753>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- NASR, M.; AYYAD, S. B.; EL-LAMIE, I. K. I.; MIKHAIL, M. Y. Expression of matrix metalloproteinase-2 in preinvasive and invasive carcinoma of the uterine cervix. **European journal of gynaecological oncology**, v. 26, n. 2, p. 199–202, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857029>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- NERVI, B.; LINK, D. C.; DIPERSIO, J. F. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n. 3, p. 690–705, 15 out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888804>>. Acesso em: 2 abr. 2018.
- NO, J. H.; JO, H.; KIM, S.-H.; PARK, I.-A.; KANG, D.; LEE, C. H.; HAN, S.-S.; KIM, J. W.; PARK, N.-H.; KANG, S.-B.; SONG, Y.-S. Expression of MMP-2, MMP-9, and Urokinase-Type Plasminogen Activator in Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1171, n. 1, p. 100–104,

- ago. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2009.04898.x>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- NODA, M.; OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; KITAYAMA, H.; TAKAHASHI, C. **RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling** *Cancer and Metastasis Reviews*, 2003. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12784995>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- NODA, M.; TAKAHASHI, C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. **Cancer science**, v. 98, n. 11, p. 1659–65, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17725805>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 49–61, 17 jul. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761314002301>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- OH, J.-K.; WEIDERPASS, E. Infection and Cancer: Global Distribution and Burden of Diseases. **Annals of Global Health**, v. 80, n. 5, p. 384–392, set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512154>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- OH, J.; DIAZ, T.; WEI, B.; CHANG, H.; NODA, M.; STETLER-STEVENSON, W. G. TIMP-2 upregulates RECK expression via dephosphorylation of paxillin tyrosine residues 31 and 118. **Oncogene**, v. 25, n. 30, p. 4230–4, 13 jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491114>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; MIZOGUCHI, A.; ADACHI, E.; SASAHARA, R. M.; NISHIMURA, S.; IMAMURA, Y.; KITAYAMA, H.; ALEXANDER, D. B.; IDE, C.; HORAN, T. P.; ARAKAWA, T.; YOSHIDA, H.; NISHIKAWA, S.; ITOH, Y.; SEIKI, M.; ITOHARA, S.; TAKAHASHI, C.; NODA, M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v. 107, n. 6, p. 789–800, 14 dez. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11747814>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- OVERALL, C. M.; LÓPEZ-OTÍN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 9, p. 657–72, set. 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc884>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- PARKIN, D. M.; BRAY, F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, v. 24, p. S11–S25, 31 ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949997>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- PESTA, M.; KULDA, V.; TOPOLCAN, O.; SAFRANEK, J.; VRZALOVA, J.; CERNY, R.; HOLUBEC, L. Significance of methylation status and the expression of RECK mRNA in lung tissue of patients with NSCLC. **Anticancer research**, v. 29, n. 11, p. 4535–9, nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20032402>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- QIAN, B.-Z.; POLLARD, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39–51, abr. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867410002874>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- RAUVALA, M.; AGLUND, K.; PUISTOLA, U.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T.; HORVATH, G.; WILLÉN, R.; STENDAHL, U. Matrix metalloproteinases-2 and -9 in cervical cancer: Different roles in tumor progression. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 16, n. 3, p. 1297–1302, 2006.

- RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. **Developmental Biology**, v. 372, n. 2, p. 157–165, dez. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160612005362>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- RONCO, L. V.; KARPOVA, A. Y.; VIDAL, M.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes & development**, v. 12, n. 13, p. 2061–72, 1 jul. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9649509>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- SASAHARA, R. M.; BROCHADO, S. M.; TAKAHASHI, C.; OH, J.; MARIA-ENGLER, S. S.; GRANJEIRO, J. M.; NODA, M.; SOGAYAR, M. C. Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. **Cancer detection and prevention**, v. 26, n. 6, p. 435–43, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507228>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- SASAHARA, R. M.; TAKAHASHI, C.; NODA, M. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 264, n. 3, p. 668–75, 2 nov. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10543990>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- SCHEFFNER, M.; WERNES, B. A.; HUIBREGTSE, J. M.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1129–36, 21 dez. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2175676>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- SCHLECHT, N. F.; KULAGA, S.; ROBITAILLE, J.; FERREIRA, S.; SANTOS, M.; MIYAMURA, R. A.; DUARTE-FRANCO, E.; ROHAN, T. E.; FERENCZY, A.; VILLA, L. L.; FRANCO, E. L. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA**, v. 286, n. 24, p. 3106–14, 26 dez. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754676>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- SHEU, B.-C.; LIEN, H.-C.; HO, H.-N.; LIN, H.-H.; CHOW, S.-N.; HUANG, S.-C.; HSU, S.-M. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. **Cancer research**, v. 63, n. 19, p. 6537–6542, 2003.
- SHIRVAIKAR, N.; MARQUEZ-CURTIS, L. A.; SHAW, A. R.; TURNER, A. R.; JANOWSKA-WIECZOREK, A. MT1-MMP association with membrane lipid rafts facilitates G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. **Experimental Hematology**, v. 38, n. 9, p. 823–835, set. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301472X1000189X>>. Acesso em: 2 abr. 2018.
- SICA, A.; BRONTE, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1155–1166, 1 maio 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476345>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- SIEKMANN, A. F.; AFFOLTER, M.; BELTING, H.-G. The tip cell concept 10 years after: New players tune in for a common theme. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 9, p. 1255–1263, maio 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482713000372>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- SIMIZU, S.; TAKAGI, S.; TAMURA, Y.; OSADA, H. RECK-mediated suppression of tumor cell invasion is regulated by glycosylation in human tumor cell lines. **Cancer research**, v. 65, n. 16, p. 7455–61, 15 ago. 2005. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-04-4446>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

- SINGER, C. F.; KRONSTEINER, N.; MARTON, E.; KUBISTA, M.; CULLEN, K. J.; HIRTENLEHNER, K.; SEIFERT, M.; KUBISTA, E. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. **Breast cancer research and treatment**, v. 72, n. 1, p. 69–77, mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12000221>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- SONG, S. Y.; SON, H. J.; NAM, E.; RHEE, J. C.; PARK, C. Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 42, n. 1, p. 101–8, jan. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804905008713>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- SPAN, P. N.; SWEEP, C. G. J.; MANDERS, P.; BEEX, L. V. A. M.; LEPPERT, D.; LINDBERG, R. L. P. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 11, p. 2710–5, 1 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12767082>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- SPARDY, N.; COVELLA, K.; CHA, E.; HOSKINS, E. E.; WELLS, S. I.; DUENSING, A.; DUENSING, S. Human papillomavirus 16 E7 oncoprotein attenuates DNA damage checkpoint control by increasing the proteolytic turnover of claspin. **Cancer research**, v. 69, n. 17, p. 7022–9, 1 set. 2009. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-09-0925>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- STEENBERGEN, R. D. M.; SNIJDERS, P. J. F.; HEIDEMAN, D. A. M.; MEIJER, C. J. L. M. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 6, p. 395–405, 1 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24854082>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, n. 1, p. 463–516, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687497>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- STONE, S. C.; ROSSETTI, R. A. M.; BOLPETTI, A.; BOCCARDO, E.; DE ARAUJO SOUZA, P. S.; LEPIQUE, A. P. HPV16-associated tumors control myeloid cell homeostasis in lymphoid organs, generating a suppressor environment for T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. 4, p. 619–631, out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970861>>. Acesso em: 21 mar. 2018.
- TAKAGI, S.; SIMIZU, S.; OSADA, H. Reck negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. **Cancer Research**, v. 69, n. 4, p. 1502–1508, 2009a.
- TAKAGI, S.; SIMIZU, S.; OSADA, H. RECK Negatively Regulates Matrix Metalloproteinase-9 Transcription. **Cancer Research**, v. 69, n. 4, p. 1502–1508, 3 fev. 2009b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208844>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- TAKAHASHI, C.; SHENG, Z.; HORAN, T. P.; KITAYAMA, H.; MAKI, M.; HITOMI, K.; KITAURA, Y.; TAKAI, S.; SASAHARA, R. M.; HORIMOTO, A.; IKAWA, Y.; RATZKIN, B. J.; ARAKAWA, T.; NODA, M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 22, p. 13221–13226, 1998a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- TAKAHASHI, C.; SHENG, Z.; HORAN, T. P.; KITAYAMA, H.; MAKI, M.; HITOMI, K.; KITAURA, Y.;

- TAKAI, S.; SASAHARA, R. M.; HORIMOTO, A.; IKAWA, Y.; RATZKIN, B. J.; ARAKAWA, T.; NODA, M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 22, p. 13221–6, 27 out. 1998b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9789069>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- TAKENAKA, K.; ISHIKAWA, S.; KAWANO, Y.; YANAGIHARA, K.; MIYAHARA, R.; OTAKE, Y.; MORIOKA, Y.; TAKAHASHI, C.; NODA, M.; WADA, H.; TANAKA, F. Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 40, n. 10, p. 1617–23, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15196549>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- TAKEUCHI, T.; HISANAGA, M.; NAGAO, M.; IKEDA, N.; FUJII, H.; KOYAMA, F.; MUKOGAWA, T.; MATSUMOTO, H.; KONDO, S.; TAKAHASHI, C.; NODA, M.; NAKAJIMA, Y. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 16, p. 5572–9, 15 ago. 2004a. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-03-0656>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- TAKEUCHI, T.; HISANAGA, M.; NAGAO, M.; IKEDA, N.; FUJII, H.; KOYAMA, F.; MUKOGAWA, T.; MATSUMOTO, H.; KONDO, S.; TAKAHASHI, C.; NODA, M.; NAKAJIMA, Y. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 16, p. 5572–9, 15 ago. 2004b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328199>>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- THOMAS, J. T.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. **Journal of virology**, v. 72, n. 2, p. 1131–7, fev. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9445009>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- THOMAS, M.; PIM, D.; BANKS, L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7690–700, 13 dez. 1999. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1202953>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- TOMMASINO, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 26, p. 13–21, jun. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X13001235>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- TONG, X.; HOWLEY, P. M. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 9, p. 4412–7, 29 abr. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9114003>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- TOTA, J. E.; CHEVARIE-DAVIS, M.; RICHARDSON, L. A.; DEVRIES, M.; FRANCO, E. L. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: Implications for prevention strategies. **Preventive Medicine**, v. 53, n. SUPPL. 1, p. S12–S21, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ypmed.2011.08.017>>.
- TROMBETTA-LIMA, M.; MARIA, S.; WINNISCHOFER, B.; ANGELO, M.; DEMASI, A.; FILHO, R. A.; OLIVEIRA CARREIRA, A. C.; WEI, B.; DE ASSIS RIBAS, T.; KONIG, M. S.; BOWMAN-COLIN, C.; OBA-

SHINJO, S. M.; KAZUE, S.; MARIE, N.; STETLER-STEVENSON, W.; SOGAYAR, M. C. Isolation and characterization of novel *RECK* tumor suppressor gene splice variants. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, 2015. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/abstract/5305>>.

ULRICH, F.; CARRETERO-ORTEGA, J.; MENENDEZ, J.; NARVAEZ, C.; SUN, B.; LANCASTER, E.; PERSHAD, V.; TRZASKA, S.; VELIZ, E.; KAMEI, M.; PRENDERGAST, A.; KIDD, K. R.; SHAW, K. M.; CASTRANOVA, D. A.; PHAM, V. N.; LO, B. D.; MARTIN, B. L.; RAIBLE, D. W.; WEINSTEIN, B. M.; TORRES-VAZQUEZ, J. Reck enables cerebrovascular development by promoting canonical Wnt signaling. **Development**, v. 143, n. 6, p. 1055–1055, 2016. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.136507>>.

VAGIMA, Y.; AVIGDOR, A.; GOICHBERG, P.; SHIVTIEL, S.; TESIO, M.; KALINKOVICH, A.; GOLAN, K.; DAR, A.; KOLLET, O.; PETIT, I.; PERL, O.; ROSENTHAL, E.; RESNICK, I.; HARDAN, I.; GELLMAN, Y. N.; NAOR, D.; NAGLER, A.; LAPIDOT, T. MT1-MMP and RECK are involved in human CD34+ progenitor cell retention, egress, and mobilization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 3, p. 492–503, 2 mar. 2009. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/36541>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

VAN DER JAGT, M. F. P.; SWEEP, F. C. G. J.; WAAS, E. T.; HENDRIKS, T.; RUERS, T. J. M.; MERRY, A. H. H.; WOBBS, T.; SPAN, P. N. Correlation of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), with MMP-2, MMP-9, and survival in colorectal cancer. **Cancer letters**, v. 237, n. 2, p. 289–97, 18 jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046057>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

VAN DOORSLAER, K.; LI, Z.; XIRASAGAR, S.; MAES, P.; KAMINSKY, D.; LIOU, D.; SUN, Q.; KAUR, R.; HUYEN, Y.; MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus Episteme: A major update to the papillomavirus sequence database. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D499–D506, 2017.

VAN HINSBERGH, V. W. M.; KOOLWIJK, P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. **Cardiovascular research**, v. 78, n. 2, p. 203–12, 1 maio 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cvrc/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvm102>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

VAN LENT, P. L. E. M.; SPAN, P. N.; SLOETJES, A. W.; RADSTAKE, T. R. D. J.; VAN LIESHOUT, A. W. T.; HEUVEL, J. J. T. M.; SWEEP, C. G. J.; VAN DEN BERG, W. B. Expression and localisation of the new metalloproteinase inhibitor RECK (reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) in inflamed synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 64, n. 3, p. 368–74, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485996>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Advances in cancer research**, v. 71, p. 321–41, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111869>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

WALSH, L. A.; ROY, D. M.; REYNGOLD, M.; GIRI, D.; SNYDER, A.; TURCAN, S.; BADWE, C. R.; LYMAN, J.; BROMBERG, J.; KING, T. A.; CHAN, T. A. RECK controls breast cancer metastasis by modulating a convergent, STAT3-dependent neoangiogenic switch. **Oncogene**, v. 34, n. 17, p. 2189–2203, 2015a.

WALSH, L. A.; ROY, D. M.; REYNGOLD, M.; GIRI, D.; SNYDER, A.; TURCAN, S.; BADWE, C. R.; LYMAN, J.; BROMBERG, J.; KING, T. A.; CHAN, T. A. RECK controls breast cancer metastasis by modulating a convergent, STAT3-dependent neoangiogenic switch. **Oncogene**, v. 34, n. 17, p. 2189–203, 23 abr. 2015b. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/onc2014175>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

- WERNESSE, B. A.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science (New York, N.Y.)**, v. 248, n. 4951, p. 76–9, 6 abr. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2157286>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- WILLIAMSON, R. A.; MARSTON, F. A.; ANGAL, S.; KOKLITIS, P.; PANICO, M.; MORRIS, H. R.; CARNE, A. F.; SMITH, B. J.; HARRIS, T. J.; FREEDMAN, R. B. Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). **The Biochemical journal**, v. 268, n. 2, p. 267–74, 1 jun. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2163605>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- WOODHOUSE, E. C.; CHUAQUI, R. F.; LIOTTA, L. A. General mechanisms of metastasis. **Cancer**, v. 80, n. 8 Suppl, p. 1529–37, 15 out. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9362419>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- YAMAMOTO, M.; MATSUZAKI, T.; TAKAHASHI, R.; ADACHI, E.; MAEDA, Y.; YAMAGUCHI, S.; KITAYAMA, H.; ECHIZENYA, M.; MORIOKA, Y.; ALEXANDER, D. B.; YAGI, T.; ITOHARA, S.; NAKAMURA, T.; AKIYAMA, H.; NODA, M. The transformation suppressor gene Reck is required for postaxial patterning in mouse forelimbs. **Biology Open**, v. 1, n. 5, p. 458–466, 2012. Disponível em: <<http://bio.biologists.org/cgi/doi/10.1242/bio.2012638>>.
- YEH, H.-H.; TSENG, Y.-F.; HSU, Y.-C.; LAN, S.-H.; WU, S.-Y.; RAGHAVARAJU, G.; CHENG, D.-E.; LEE, Y.-R.; CHANG, T.-Y.; CHOW, N.-H.; HUNG, W.-C.; LIU, H.-S. Ras induces experimental lung metastasis through up-regulation of RbAp46 to suppress RECK promoter activity. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 172, 25 dez. 2015. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1155-7>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- YOSHIDA, S.; KAJITANI, N.; SATSUKA, A.; NAKAMURA, H.; SAKAI, H. Ras modifies proliferation and invasiveness of cells expressing human papillomavirus oncoproteins. **Journal of virology**, v. 82, n. 17, p. 8820–7, 1 set. 2008. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02363-07>>. Acesso em: 20 mar. 2018.
- ZHANG, C.; LING, Y.; ZHANG, C.; XU, Y.; GAO, L.; LI, R.; ZHU, J.; FAN, L.; WEI, L. The silencing of RECK gene is associated with promoter hypermethylation and poor survival in hepatocellular carcinoma. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 451–458, 2012a.
- ZHANG, Y.; CHENG, S.; ZHANG, G.; MA, W.; LIU, Y.; ZHAO, R.; ZHANG, Q.; PANG, D. Low expression of RECK indicates a shorter survival for patients with invasive breast cancer. **Cancer science**, v. 103, n. 6, p. 1084–9, jun. 2012b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.2012.02265.x>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
- ZHENG, H.; TAKAHASHI, H.; MURAI, Y.; CUI, Z.; NOMOTO, K.; NIWA, H.; TSUNEYAMA, K.; TAKANO, Y. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. **Anticancer Research**, v. 26, n. 5 A, p. 3579–3583, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17094486>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- ZHOU, X. Q.; HUANG, S. Y.; ZHANG, D. S.; ZHANG, S. Z.; LI, W. G.; CHEN, Z. W.; WU, H. W. Effects of 5-aza-2'deoxyctidine on RECK gene expression and tumor invasion in salivary adenoid cystic carcinoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 3, p. 254–260, 12 dez. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2015000300254&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 18 mar. 2018.
- ZHOU, X. Q.; HUANG, S. Y.; ZHANG, D. S.; ZHANG, S. Z.; LI, W. G.; CHEN, Z. W.; WU, H. W. Effects of

5-aza-2'deoxyctidine on RECK gene expression and tumor invasion in salivary adenoid cystic carcinoma. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 48, n. 3, p. 254–60, 12 mar. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2015000300254&lng=en&tlng=en>.

Acesso em: 17 mar. 2018.

ZHU, J.; LING, Y.; XU, Y.; LU, M.; LIU, Y.; ZHANG, C. Promoter hypermethylation of the RECK gene is associated with its low expression and poor survival of esophageal squamous cell carcinoma. **Oncology letters**, v. 13, n. 3, p. 1911–1918, mar. 2017. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.5656>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 1 maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044010>>. Acesso em: 20 mar. 2018.