

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da relação da DPPIV/CD26 com mecanismos tumorais em células de
câncer cervical humano

ALINE BECKENKAMP

PORTO ALEGRE, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da relação da DPPIV/CD26 com mecanismos tumorais em células de
câncer cervical humano

Dissertação apresentada por
Aline Beckenkamp para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof^a. Dra. Andréia Buffon

PORTO ALEGRE, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 10 de Outubro de 2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Diogo André Pilger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Márcia Edilaine Lopes Consolaro

Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Patrícia Nardin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Beckenkamp, Aline

Avaliação da relação da DPPIV/CD26 com mecanismos tumorais em células de câncer cervical humano / Aline Beckenkamp. -- 2013.

92 f.

Orientadora: Andréia Buffon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Câncer cervical. 2. DPPIV/CD26. 3. Progressão tumoral. 4. Biomarcador. I. Buffon, Andréia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC) do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.

À minha família,
pelo amor, confiança, incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e
decisões.

AGRADECIMENTOS

A prof^a. Dra. Andréia Buffon, pela orientação, por todo empenho, disponibilidade e, acima de tudo, exigência. Por acreditar em mim e me mostrar o caminho da pesquisa.

Aos meus queridos colegas de Laboratório – Camilo, Danielle, Denise, Jéssica, Júlia, Lívia, Paola e Samuel. Agradeço todo o apoio, amizade e por tornarem meu caminho até aqui mais alegre.

Às professoras Alessandra Bruno e Márcia Wink que colaboraram para o desenvolvimento desta dissertação, pelas revisões, correções e sugestões, e pelo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Ao meu pai, agradeço pela educação, apoio e incentivo.

À minha vó que sempre torceu por mim e me deu carinho e força para continuar seguindo em frente.

Aos meus dindos que sempre me incentivaram a alcançar caminhos cada vez mais distantes. Também ao Nicolas pelo amor.

Ao Gabriel, pelo amor, paciência, incentivo e companhia.

RESUMO

O câncer cervical é uma das neoplasias mais prevalentes, sendo a segunda mais frequente em mulheres no Brasil. A exoprotease dipeptidil-peptidase IV (DPPIV), também conhecida como CD26, é uma enzima encontrada em uma diversidade de células, e sua atividade enzimática e interação com outras proteínas parecem ser fundamentais para o controle da transformação maligna e progressão tumoral. Esta enzima é encontrada ancorada na membrana celular e também como uma isoforma solúvel (DPPIV/sCD26), ativa em fluidos biológicos. Pesquisas demonstram que alterações em sua expressão e atividade têm sido observadas em diversos tumores. Tendo em vista a relação entre a DPPIV/CD26 e o câncer, neste estudo investigamos a atividade e expressão da DPPIV/CD26 em linhagens celulares de câncer cervical (SiHa, HeLa and C33A) e de queratinócitos imortalizados (HaCaT). A atividade enzimática também foi monitorada na presença do inibidor específico da DPPIV/CD26, o fosfato de sitagliptina. Avaliamos também a relação desta enzima com os mecanismos de migração e adesão celular. Nossos resultados demonstram que todas as linhagens estudadas apresentam atividade enzimática DPPIV/CD26 ligada à membrana e solúvel, sendo superior nas linhagens SiHa e HaCaT. Confirmamos que esta atividade é atribuída à DPPIV/CD26 pela inibição da sua atividade enzimática na presença de fosfato de sitagliptina. Uma maior expressão do gene da DPPIV/CD26 foi observada nas linhagens HaCaT e SiHa, uma baixa expressão na C33A, sendo praticamente indetectável na HeLa. Estes dados corroboram os resultados obtidos para a atividade enzimática. Foi observada uma maior capacidade migratória na linhagem HeLa, quando comparada a SiHa, porém na presença de fosfato de sitagliptina, a linhagem SiHa apresentou um aumento na migração. Além disso, na presença do inibidor, tanto a linhagem HeLa quanto a SiHa exibiram uma redução na adesão celular. Este estudo demonstra a presença da enzima DPPIV/CD26 em células de câncer cervical, revelando diferentes níveis de expressão, e sua relação com a migração e adesão celular.

Palavras-chave: DPPIV/CD26, Câncer cervical, Fosfato de sitagliptina, Progressão tumoral, Biomarcador.

ABSTRACT

Cervical cancer is one of the most prevalent neoplasias, being the second most frequent in women in Brazil. The exoprotease dipeptidyl peptidase IV (DPPIV), also known as CD26, is an enzyme found in a variety of cells, and its enzymatic activity and interaction with other proteins appear to be essential for the control of malignant transformation and tumor progression. This enzyme is found anchored to the cell membrane and also as a soluble isoform (DPPIV/sCD26), active in biological fluids. Studies have shown changes in their expression and activity in several tumor types. Given the relationship between DPPIV/CD26 and cancer, in the present study, we investigated DPPIV/CD26 activity and expression in cervical cancer cell lines (SiHa, HeLa and C33A) and immortalized keratinocytes (HaCaT). Enzymatic activity was also monitored in the presence of the specific DPPIV/CD26 inhibitor, sitagliptin phosphate. We also evaluated the relationship of this enzyme with cell migration and adhesion. Our results show that all cell lines studied exhibit DPPIV/CD26 enzymatic activity both membrane-bound and in soluble form, being higher in SiHa and HaCaT. We confirm that this activity is attributed to DPPIV/CD26 by its inhibition in the presence of sitagliptin phosphate. We observed a higher expression of DPPIV/CD26 in HaCaT and SiHa cell lines, a low expression in C33A and in HeLa cells this expression was almost undetectable. These data corroborate the results obtained for enzymatic activity. We observed a higher migratory capacity of HeLa, when compared to SiHa, but in the presence of sitagliptin phosphate, SiHa showed an increase in migration. Furthermore, in the presence of the inhibitor, SiHa and HeLa cells exhibited a reduction in cell adhesion. This study demonstrates the presence of DPPIV/CD26 in cervical cancer cells, revealing a differential expression and its relationship with cell migration and adhesion.

Keywords: DPPIV/CD26, Cervical cancer, Sitagliptin phosphate, Tumor progression, Biomarker.

SUMÁRIO

I. Introdução

I.1 Câncer cervical e HPV	19
I.2 Dipeptidil peptidase IV/CD26	21
I.3 DPPIV/CD26 e câncer	23

II. Objetivos.....25

III. Artigo científico

III.1. CAPÍTULO 1 - <u>Aline Beckenkamp</u> , Danielle Bertodo Santana, Júlia Biz Willig, Jéssica Nascimento, Juliano Domiraci Paccez, Luiz Fernando Zerbini, Márcia Rosangela Wink, Alessandra Nejar Bruno, Andréia Buffon. Differential expression and activity of the DPPIV/CD26 and its relationship with cell migration and adhesion in human cervical carcinoma cells.....	31
--	----

IV. Discussão geral69

V. Conclusões gerais79

VI. Perspectivas.....83

VII. Referências.....87

I. Introdução

I.1 Câncer cervical e HPV

O câncer de colo de útero é uma das neoplasias que mais acomete mulheres em todo o mundo. No Brasil representa o segundo tumor mais frequente na população feminina, atrás apenas do câncer de mama, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer (INCA, 2012).

As alterações celulares que levam ao desencadeamento deste tipo de câncer podem ser descobertas no exame preventivo, Papanicolaou. Se detectado precocemente, a chance de cura é elevada, visto que a sobrevivência ao câncer cervical depende fortemente do estágio em que a doença se encontra ao diagnóstico (Hartmann *et al.*, 2002).

O câncer da cérvix uterina está diretamente relacionado com a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), principalmente com os genótipos de alto risco (Rama *et al.*, 2008) (Figura 1). O papilomavírus humano (HPV) é um agente infeccioso transmitido principalmente por via sexual e sua relação com o desenvolvimento do câncer cervical já é bem estabelecida (Liu *et al.*, 2000). Os genótipos de HPV são classificados de acordo com seu potencial oncogênico em três grupos, de alto, baixo e indeterminado risco. Os HPVs de alto risco, tais como os genótipos 16 e 18, são frequentemente associados às neoplasias intraepiteliais e invasoras do colo uterino, e estão relacionados ao surgimento de 95% dos carcinomas cervicais, sendo os mais frequentemente detectados (Roden *et al.*, 2006).

As propriedades transformantes dos HPVs de alto risco estão relacionadas aos oncogenes E6 e E7. Em lesões malignas associadas aos HPVs de alto risco, ocorre um rompimento do genoma viral, geralmente nas regiões E1 ou E2 do vírus, com perda das funções destes genes, e o DNA viral se integra ao cromossomo do hospedeiro. Com a perda de função de E2, não se tem mais a regulação negativa de E6 e E7, sendo assim, ocorre um aumento da expressão destas oncoproteínas (Duggan *et al.*, 2002). As proteínas codificadas por estes genes inativam genes supressores tumorais que atuam em pontos-chave do ciclo celular (Tjalma *et al.*, 2004).

A oncoproteína E6 leva à degradação e inativação do produto do gene supressor de tumor p53, inibindo a apoptose, permitindo que as células com DNA danificado repliquem, e não sofram auto-destruição, sendo este sugerido como um dos principais mecanismos pelo qual o HPV induz a formação tumoral (Rapp & Chen, 1998). A oncoproteína E7 se liga à proteína do retinoblastoma (pRb), a qual inibe a progressão do ciclo celular (Lorenzatto *et al.*, 2005). Estudos clínicos demonstram que em lesões pré-cancerosas, as proteínas E6 e E7 são expressas em níveis muito mais elevados do que os encontrados em lesões benignas (Oliveira *et al.*, 2013).

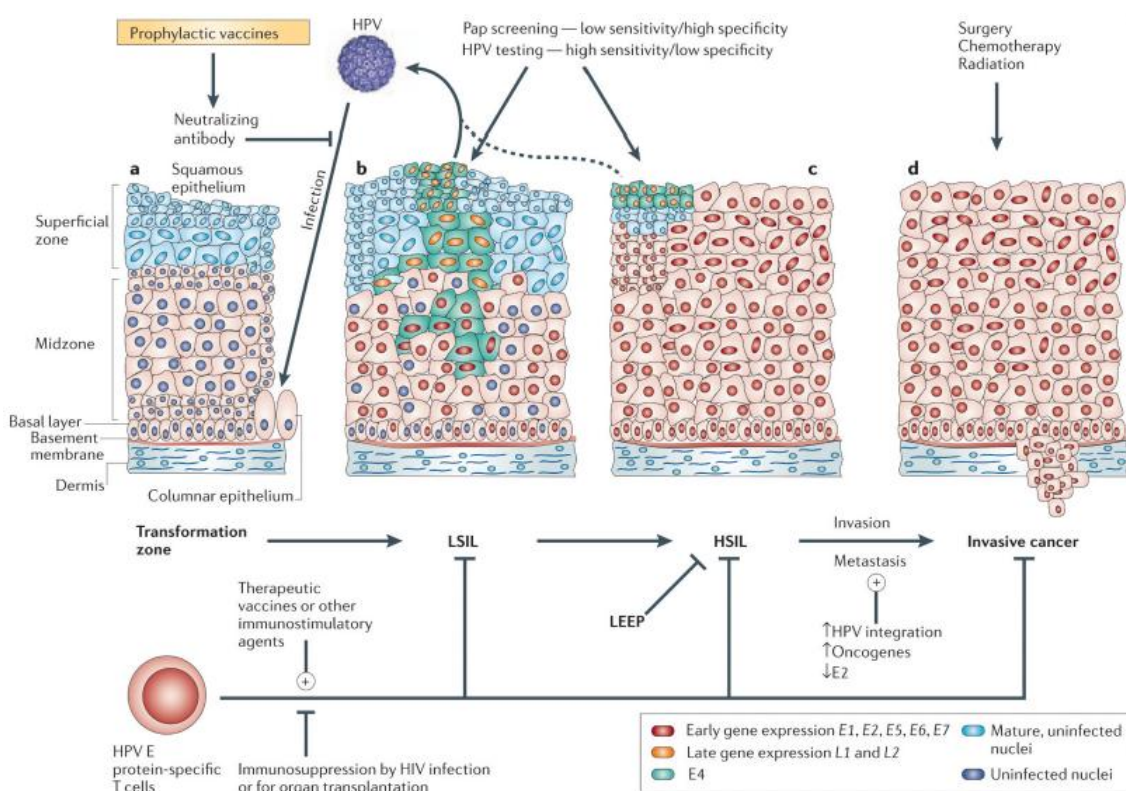


Figura 1: Carcinogênese cervical pelo HPV. **a** Epitélio escamoso normal. Vacinas profiláticas induzem a produção de anticorpos L1 ou L2 específicos, que neutralizam o vírus. **b** Após a infecção dos queratinócitos basais pelo papilomavírus humano (HPV), os genes precoces (“early”) do HPV E1, E2, E5, E6 e E7 são expressos (núcleo vermelho) e o DNA viral é replicado. L1 e L2 sintetizam o capsídeo viral, novas partículas virais são liberadas e reinicia-se a infecção. **c** Uma fração significativa de infecções por HPVs de alto risco progredem para lesões intra-epiteliais de alto grau (HSILs), com um menor grau de diferenciação. HSILs podem ser detectadas pelo exame de Papanicolaou e são efetivamente tratadas por excisão. **d** A progressão de lesões não tratadas ao carcinoma invasor ou microinvasor está associada com a integração do genoma do HPV ao cromossomo do hospedeiro, ocorre perda de E2 e aumento na expressão dos oncogenes E6 e E7. Estes tumores podem ser tratados com cirurgia, radioterapia ou quimioterapia apresentando sucesso limitado. Adaptado de Roden (2006). Cópia autorizada por Nature Reviews Cancer.

I.2 Dipeptidil peptidase IV/CD26

A exoprotease dipeptidil peptidase IV (DPPIV), também conhecida como CD26, é uma glicoproteína transmembrana, expressa na forma dimérica em uma variedade de tipos celulares (Cordero *et al.*, 2009). Esta proteína é composta pelos domínios extracelular, transmembrana e citoplasmático (Rasmussen *et al.*, 2003; Havre *et al.*, 2008) (Figura 2).

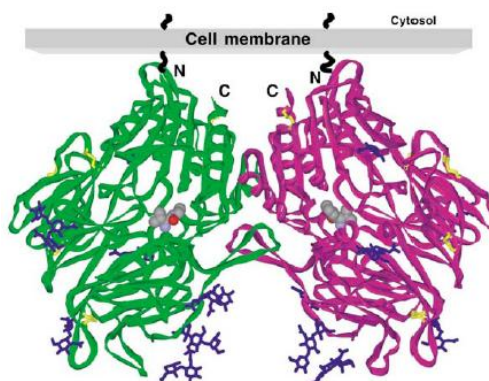


Figura 2: Estrutura da DPPIV/CD26, demonstrando seus três domínios: extracelular, transmembranar e citoplasmático. DPPIV/CD26 forma homodímeros (subunidade A mostrada em verde e subunidade B em rosa). Adaptado de Rasmussen (2003). Cópia autorizada por Nature Structural and Molecular Biology.

O domínio extracelular desta proteína apresenta atividade enzimática dipeptidilpeptidásica, sendo assim, capaz de clivar dipeptídeos N-terminais de polipeptídeos com prolina ou alanina na penúltima posição (Boonacker *et al.*, 2003; Havre *et al.*, 2008). Muitos peptídeos regulatórios contêm esta sequência, e várias citocinas, quimiocinas, integrinas e neuropeptídeos já demonstraram ser clivados por esta enzima (Cordero *et al.*, 2009). A diversidade de substratos clivados pela DPPIV/CD26 amplia a sua ação no organismo, atuando em diversos processos fisiológicos como migração, adesão, invasão, apoptose e imunomodulação (Havre *et al.*, 2008).

Esta enzima é encontrada principalmente ancorada na membrana das células, embora também possua uma forma solúvel (sCD26), uma isoforma enzimaticamente ativa em fluidos biológicos (Havre *et al.*, 2008). A sCD26 não possui a região transmembrana e os resíduos citoplasmáticos, e é expressa também na forma dimérica (Lambeir *et al.*, 2001). Sua presença está relacionada com o extravasamento ou secreção da sCD26 por diferentes tipos

de células, especialmente pelos linfócitos T, porém ainda não se sabe se este processo é regulado ou não (Cordero *et al.*, 2009).

A DPPIV/CD26 também apresenta funções não enzimáticas, atuando como a principal proteína de ligação para a enzima adenosina deaminase (ADA) (Dong *et al.*, 1997). Este complexo DPPIV/CD26-ADA permite que a ADA se localize na membrana (eADA), facilitando a hidrólise de adenosina no meio extracelular (Franco *et al.*, 1997). Tem sido descrito que este nucleosídeo promove a angiogênese, estimula a motilidade celular e o crescimento de células tumorais (Montesinos *et al.*, 2002; Mujoomdar *et al.*, 2003).

Além disso, a DPPIV/CD26 interage com proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina e colágeno (Cheng *et al.*, 2003), relacionando-se desta forma com processos de adesão, migração celular e metástase. Também participa de diferentes vias de sinalização através da associação com a proteína de ativação de fibroblastos alfa (FAP- α), a proteína tirosina fosfatase CD45, M6P/IGFIIR e o receptor de quimiocina CXCR4 (Herrera *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2007; Havre *et al.*, 2008) (Figura 3).

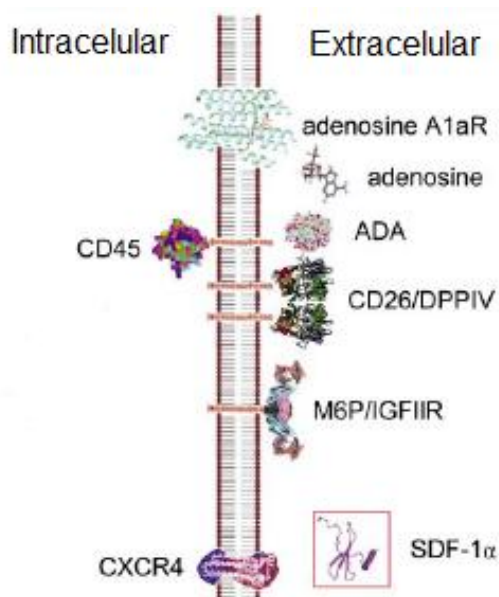


Figura 3: Representação esquemática das moléculas associadas à DPPIV/CD26: Receptor de adenosina A1a (A1aR) e seu ligante, a adenosina; adenosina deaminase (ADA), responsável pela desaminação da adenosina; CD45, que se liga ao domínio citoplasmático da DPPIV/CD26; M6P/IGFIIR, que também se liga à DPPIV/CD26; SDF-1 α ou CXCL12, substrato da DPPIV/CD26, que é inativado por esta enzima; e o receptor de SDF-1 α , CXCR4. Adaptado de Boonacker (2003). Cópia autorizada por European Journal of Cell Biology

Tendo em vista estas funções, a DPPIV/CD26 regula diversos processos biológicos tais como a diferenciação celular, adesão, imunomodulação e apoptose, ou seja, funções que controlam a transformação neoplásica (Arscott *et al.*, 2009).

I.3 DPPIV/CD26 e câncer

Embora vários estudos avaliem a relação entre a DPPIV/CD26 e a progressão tumoral, a expressão desta enzima em diferentes tipos de tumores ainda é contraditória, com os seus níveis, tanto na superfície das células quanto em fluidos biológicos, aumentados em alguns tumores, e diminuídos em outros (Havre *et al.*, 2008).

Alguns estudos demonstram que a expressão da DPPIV/CD26 está associada a um comportamento mais maligno dos tumores. Entre estes, se encontram neoplasias de células T (Sato *et al.*, 2005) e câncer de tireóide (Hirai *et al.*, 1999). Também foi descrita recentemente como um marcador de uma subpopulação celular responsável pela disseminação metastática em câncer colorretal (Pang *et al.*, 2010). Por outro lado, diversos estudos apontam que a DPPIV/CD26 atua como um supressor tumoral, como demonstrado em câncer de ovário (Kajiyama *et al.*, 2002), próstata (Wesley *et al.*, 2005), não-pequenas células de pulmão (Wesley *et al.*, 2004), melanoma (Wesley *et al.*, 1999), e neuroblastoma (Arscott *et al.*, 2009).

A diminuição da expressão da DPPIV/CD26, observada em diferentes tipos de câncer (Kikkawa *et al.*, 2005; Wesley *et al.*, 2005; Arscott *et al.*, 2009), está associada a uma diminuição da atividade intrínseca da DPPIV, vinculada a uma redução na atividade da eADA. Desta forma, ocorre a consequente diminuição na degradação de adenosina pela eADA, e do fator derivado de células estromais, o CXCL12, pela DPPIV/CD26. O aumento da adenosina extracelular facilita a angiogênese, motilidade, proliferação celular e supressão do sistema imune (Mujoomdar *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2004), enquanto que o CXCL12, através da ativação de seu receptor CXCR4, atua promovendo metástases (Ding *et al.*, 2009). Sendo assim, a baixa expressão da proteína

DPPIV/CD26 colabora com as ações do CXCL12 e da adenosina, facilitando a progressão tumoral.

Estudos têm demonstrado que quando se induz a expressão de DPPIV/CD26 em células que expressam baixos níveis desta proteína, o fenótipo maligno do tumor pode ser revertido (Wesley *et al.*, 2004; Kajiyama *et al.*, 2006; Arscott *et al.*, 2009), sendo assim, um aumento na expressão desta proteína pode facilitar o controle de metástase, invasão e crescimento de células cancerosas. Além disso, alguns estudos demonstram que esta inibição da progressão tumoral é mediada independente da atividade enzimática da DPPIV/CD26 (Busek *et al.*, 2012), estes achados sugerem que além da inativação de peptídeos biologicamente ativos, mecanismos não proteolíticos devem contribuir para o efeito supressor tumoral da DPPIV/CD26.

Considerando esta relação entre a expressão da DPPIV/CD26 com a agressividade tumoral, estudos atuais tem demonstrado que a forma solúvel da DPPIV/CD26 apresenta-se hoje como um promissor biomarcador de diversas neoplasias (Javidroozi *et al.*, 2012; Matic *et al.*, 2012). Estudos em carcinoma colorretal humano demonstraram uma diminuição significativa dos níveis desta enzima em soro de pacientes, de forma gradativa, acompanhando os estágios da doença, caracterizando-a como indicador de malignidade (Cordero *et al.*, 2011).

II. Objetivos

Tendo em vista a relação da DPPIV/CD26 com o câncer, este projeto teve como objetivo geral, investigar a atividade e expressão da DPPIV/CD26, bem como, a relação desta com processos neoplásicos, como a migração e adesão celular, em linhagens celulares de carcinoma cervical humano.

Assim, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Analisar a expressão da DPPIV/CD26, por meio da técnica de RT-PCR e *real-time* PCR, em cultura de células de carcinoma cervical (SiHa, HeLa e C33A), em comparação com linhagem de queratinócitos imortalizados (HaCaT).
2. Avaliar a atividade enzimática da DPPIV/CD26 ligada à membrana e solúvel em culturas de células de carcinoma cervical (SiHa, HeLa e C33A), e queratinócitos imortalizados (HaCaT).
3. Avaliar a inibição da atividade enzimática da DPPIV/CD26, utilizando-se o inibidor específico desta enzima, o fosfato de sitagliptina, em culturas de células de carcinoma cervical (SiHa, HeLa e C33A), e queratinócitos imortalizados (HaCaT).
4. Investigar a relação da atividade enzimática da DPPIV/CD26 com os mecanismos de migração e adesão celular, utilizando-se fosfato de sitagliptina, em culturas de células de carcinoma cervical.

III. Artigo Científico

III. 1. CAPÍTULO 1 - Aline Beckenkamp, Danielle Bertodo Santana, Júlia Biz Willig, Jéssica Nascimento, Juliano Domiraci Paccez, Luiz Fernando Zerbini, Márcia Rosangela Wink, Alessandra Nejar Bruno, Andréia Buffon. Differential expression and activity of the DPPIV/CD26 and its relationship with cell migration and adhesion in human cervical carcinoma cells

Manuscrito submetido ao periódico BioFactors.

A dipeptidil-peptidase IV (DPPIV/CD26) é uma enzima com capacidade de clivar e inativar peptídeos bioativos e quimiocinas, além de interagir com proteínas da matriz extracelular. Desta forma a DPPIV/CD26 atua regulando a proliferação, migração e adesão celular, demonstrando um importante papel na progressão tumoral. Esta enzima é encontrada ancorada na membrana celular e também como uma isoforma solúvel (DPPIV/sCD26), ativa em fluidos biológicos.

Neste estudo avaliamos a atividade enzimática e expressão da DPPIV/CD26 em células de câncer cervical (SiHa, HeLa e C33A) e queratinócitos imortalizados (HaCaT). A atividade enzimática também foi monitorada na presença do inibidor específico da DPPIV/CD26, o fosfato de sitagliptina. A relação desta enzima com os processos de migração e adesão celular também foi avaliada.

Nossos resultados demonstram que todas as linhagens estudadas apresentam atividade enzimática DPPIV/CD26 ligada à membrana e solúvel, sendo superior nas linhagens SiHa e HaCaT. Confirmamos que esta atividade é atribuída à ação da DPPIV/CD26 pela inibição da sua atividade enzimática na presença de fosfato de sitagliptina. Observamos uma maior expressão genica da DPPIV/CD26 nas linhagens HaCaT e SiHa, uma baixa expressão na C33A, sendo praticamente indetectável na HeLa. Foi observada uma maior capacidade migratória na linhagem HeLa, quando comparada a SiHa. Porém, na presença de fosfato de sitagliptina, a linhagem SiHa apresentou um aumento significativo na migração. Além disso, na presença do inibidor, tanto a linhagem HeLa quanto a SiHa exibiram uma redução na adesão celular.

Este estudo demonstra pela primeira vez a presença da enzima DPPIV/CD26 em células de câncer cervical, revelando diferentes níveis de expressão, e sua relação com a migração e adesão celular.

Tendo em vista que este trabalho foi submetido à publicação em um periódico da área, o capítulo 1 desta dissertação (página 32 a 68) foi excluído.

IV. Discussão Geral

O câncer cervical é uma importante patologia que acomete um elevado número de mulheres no mundo todo. A principal alteração que leva a este tipo de câncer é a infecção pelo papilomavírus humano, o HPV, com alguns subtipos de alto risco (Rama *et al.*, 2008). Porém, sabe-se que o HPV é um fator necessário, ainda que não suficiente, para o desenvolvimento do câncer de colo do útero. Para a gênese de um processo neoplásico, são necessárias alterações em processos como proliferação, diferenciação celular, apoptose e capacidade de controle do micro ambiente. Desta forma, o estudo de mecanismos que facilitam a progressão tumoral se faz uma ferramenta importante para conhecer o comportamento das células tumorais.

A introdução do exame Papanicolaou resultou em uma significativa redução no índice de mortalidade por esta patologia (Schiffman *et al.*, 2011), e acredita-se que a imunização contra o HPV deve reduzir ainda mais este índice (Roden *et al.*, 2006). Porém, ainda assim, se faz necessária a busca de novas técnicas que auxiliem no diagnóstico e tratamento desta doença.

Proteases têm sido descritas como reguladoras na sinalização de fatores de crescimento e quimiocinas, promovendo ou inibindo metástases e o crescimento de tumores (Arscott *et al.*, 2009). A DPPIV/CD26 é uma proteína desta classe que tem a capacidade de clivar e modular a atividade de diferentes peptídeos regulatórios (Cordero *et al.*, 2009). Sendo assim, a DPPIV/CD26 atua em diversos processos fisiológicos como migração, adesão, invasão, e imunomodulação. Considerando esta capacidade de regular a atividade de biopeptídeos, a DPPIV/CD26 pode atuar como um supressor ou ativador de tumor (Havre *et al.*, 2008).

Dentre os substratos da DPPIV/CD26 encontra-se o fator derivado de células estromais (CXCL12 ou SDF-1), uma quimiocina que desempenha diversos papéis na gênese tumoral, via ativação do receptor CXCR4. Tem sido demonstrado que o CXCL12 promove o crescimento tumoral, facilita a angiogênese e metástase e contribui para vias de imunossupressão (Kryezek *et al.*, 2007) (Figura 4).

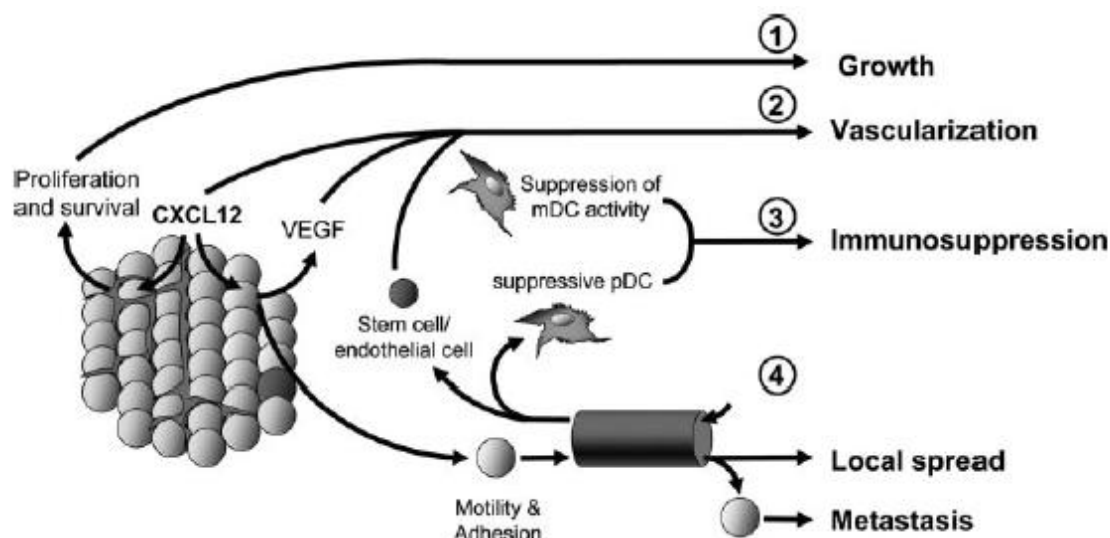


Figura 4: Múltiplas ações implicadas na biologia tumoral mediada pelo CXCL12. 1) CXCL12 promove o crescimento tumoral. 2) CXCL12 aumenta neovascularização do tumor. 3) CXCL12 cria um ambiente imunossupressor. 4) CXCL12 promove a migração tumoral, adesão e invasão. Adaptado de Kryczek (2007). Cópia autorizada por American Journal of Physiology - Cell Physiology.

Estudos em câncer de próstata demonstram que o CXCL12 e seu receptor são determinantes para o processo metastático neste tipo de tumor (Sun *et al.*, 2008). Outros trabalhos revelaram que quando a expressão do receptor CXCR4 é diminuída, ou quando este é inibido, os processos de migração, invasão e metástase são suprimidos (Ramsey *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

A diminuição da expressão da DPPIV/CD26 observada em linhagens celulares de neuroblastoma é acompanhada por uma diminuição na atividade da DPPIV e da eADA, isto gera um aumento de adenosina e de CXCL12 extracelular que irão facilitar a progressão tumoral (Arscott *et al.*, 2009). Neste mesmo estudo, foi demonstrado que quando a DPPIV/CD26 é introduzida em células que expressam baixos níveis desta proteína, o fenótipo maligno pode ser revertido (Arscott *et al.*, 2009). Portanto assume-se que o aumento da expressão desta proteína pode facilitar o controle de metástase, invasão e crescimento de células cancerosas.

Estudos descrevem que a diminuída expressão da DPPIV/CD26 está associada com a produção aumentada do fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) em células cancerosas metastáticas da próstata. Este potente

mitógeno facilita a progressão do câncer de próstata, levando a metástase. Quando foi induzido um aumento na expressão da DPPIV/CD26 observou-se uma redução dos níveis de bFGF, e conseqüentemente uma inibição da migração e invasão celular, indução de apoptose e parada do ciclo celular (Wesley *et al.*, 2005). Outros achados para o câncer de próstata indicam que a degradação de CXCL12 pela DPPIV/CD26 pode também estar envolvida na cascata metastática, sugerindo que a inibição da DPPIV/CD26 pode ser um gatilho para que ocorra metástase (Sun *et al.*, 2008).

A DPPIV/CD26 é uma proteína multifuncional, que além de apresentar atividade de peptidase também participa de diferentes vias de sinalização (Herrera *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2007; Havre *et al.*, 2008), e se liga a proteínas da matriz extracelular como a fibronectina e o colágeno (Cheng *et al.*, 2003). Tem sido descrito um modelo experimental de DPPIV/CD26 mutante, desprovida de atividade serina protease (Steeg *et al.*, 1995). Em diferentes modelos experimentais, a superexpressão da forma mutada da DPPIV/CD26 demonstrou resultados semelhantes aos encontrados quando DPPIV/CD26 normal foi super expressa (Wesley *et al.*, 1999 e 2004; Pethiyagoda *et al.*, 2000; Busek *et al.*, 2012). Estes achados sugerem que além da inativação de peptídeos biologicamente ativos, mecanismos não proteolíticos devem contribuir para o efeito supressor tumoral da DPPIV/CD26.

Embora a relação da DPPIV/CD26 com o câncer já tenha sido bastante estudada, até o momento não existem pesquisas relacionando o câncer de colo de útero com esta proteína. Sendo assim, neste trabalho nós avaliamos pela primeira vez a expressão e atividade da DPPIV/CD26 em células de câncer cervical, em comparação a queratinócitos imortalizados, e investigamos a relação desta proteína com a migração e adesão celular.

No capítulo 1 desta dissertação foram utilizadas as linhagens de câncer cervical (ATCC) SiHa, que contém cópias do vírus HPV 16 incorporado ao seu genoma, HeLa, que contém cópias do vírus HPV 18 incorporado ao seu genoma e C33A que não contém cópias do HPV, além disso como controle não tumoral foi utilizada a linhagem de queratinócito imortalizados, HaCaT (ATCC). Visando avaliar a atividade enzimática da DPPIV/CD26, primeiramente as

células aderentes foram incubadas na presença do substrato Gli-Pro-p-nitroanilida. Observamos a formação de p-nitroanilina *in vitro*, para todas as linhagens estudadas, em diferentes níveis, indicando que estas células apresentam atividade enzimática dipeptidilpeptidásica. Esta atividade se mostrou linear dentro de um período de incubação de 2 horas.

Considerando a existência da isoforma solúvel desta enzima, analisamos a atividade enzimática também no sobrenadante após 1 hora de contato com as células aderentes. Para todas as linhagens foi observada atividade dipeptidilpeptidásica no sobrenadante, e esta novamente foi linear até 2h de incubação. Nossos resultados demonstraram uma importante atividade da sCD26 após um curto período de liberação desta enzima para o sobrenadante da cultura celular, indicando a significativa presença desta forma solúvel nestas linhagens. A sCD26 representa atualmente um promissor biomarcador para diferentes tipos de câncer (Cordero *et al.*, 2011), e pode vir a ser estudada no soro ou secreção vaginal de pacientes com câncer de colo de útero.

Tendo em vista a existência de outras enzimas com atividade semelhante a da DPPIV/CD26, e a fim de confirmar se a atividade determinada é devida à ação da DPPIV/CD26, realizamos a determinação da atividade enzimática na presença de seu inibidor específico, o fosfato de sitagliptina. Observamos uma inibição significativa da formação de p-nitroanilina *in vitro* para todas as linhagens, tanto nas células aderentes quanto no sobrenadante, confirmando que a atividade determinada é devida à ação da DPPIV/CD26.

Dentre as linhagens analisadas as linhagens HaCaT e SiHa apresentaram atividades superiores às encontradas para as linhagens HeLa e C33A. Além disso, a linhagem HaCaT foi a mais sensível ao efeito inibitório do fosfato de sitagliptina. Em geral, a atividade da DPPIV/CD26 nestas células pode ser considerada baixa, e quando as atividades enzimáticas nas células de câncer cervical são comparadas à linhagem não tumoral (HaCaT), estas parecem estar ainda mais diminuídas. Outros estudos já demonstraram diminuições na atividade enzimática da DPPIV/CD26 nesta mesma ordem, como para linhagens de neuroblastoma (com atividade específica variando

entre 30-50 nmoles/min/mg de proteína) (Arscott *et al.*, 2009), melanoma (10-30 nmoles/min/mg de proteína) (Wesley *et al.*, 1999), e câncer renal (3-12 nmoles/min/mg de proteína, variando neste intervalo de acordo com o tipo histológico) (Varona *et al.*, 2010).

Visando avaliar o perfil de expressão da DPPIV/CD26 entre as diferentes linhagens celulares de câncer cervical, SiHa (HPV16+), HeLa (HPV18+), C33A (sem cópias do HPV) e na linhagem de queratinócitos imortalizados HaCaT (controle não tumoral), foram realizadas as técnicas de RT-PCR e *real time* PCR. Verificou-se que a expressão do RNAm varia entre as linhagens celulares, sendo que as linhagens HaCaT e SiHa apresentaram maior expressão de DPPIV/CD26, C33A apresentou baixos níveis de expressão e na linhagem HeLa esta expressão foi praticamente indetectável. Os níveis de expressão da DPPIV/CD26 se correlacionaram com a atividade enzimática observada nestas células. Acreditamos que esta variação nos níveis de expressão entre as linhagens de câncer cervical pode ser devida a diferente origem celular e expressão de HPV. Estudos ainda serão conduzidos a fim de determinar se existe alguma relação entre o HPV 18 e uma menor expressão de DPPIV/CD26.

Considerando que estudos demonstram alterações na migração e adesão celular quando induzida a expressão da DPPIV/CD26 em linhagens tumorais (Kikkawa *et al.*, 2005), avaliamos estes parâmetros nas linhagens SiHa e HeLa, as quais apresentaram maior e menor expressão desta enzima, respectivamente, dentre as linhagens de câncer cervical estudadas. Pelo ensaio de *Wound-healing* pudemos observar uma maior capacidade migratória para a linhagem HeLa, em relação a linhagem SiHa, podendo este fato estar relacionado a baixa expressão e atividade desta enzima na HeLa. A fim de estabelecer uma relação mais clara entre a DPPIV/CD26 e a migração celular nestas células, realizamos este experimento na presença do inibidor específico da DPPIV/CD26, e observamos um aumento significativo da migração celular na linhagem SiHa, indicando que a atividade de ectopeptidase desta enzima deve estar relacionada a este processo, enquanto que para a linhagem HeLa, que apresentou baixa expressão e atividade desta enzima, observamos um aumento na migração que não se demonstrou significativo após a inibição da

atividade enzimática. Estes dados nos permitem inferir que a migração celular nestas linhagens é, ao menos em parte, influenciada pela atividade da DPPIV/CD26.

Sabe-se que a migração e invasão celular são facilitadas por quimiocinas, como o CXCL12, que é clivado pela DPPIV/CD26. Em um estudo com células de neuroblastoma, observou-se uma diminuição significativa no potencial de migração quando foi induzido um aumento na expressão da DPPIV/CD26, porém este efeito foi revertido quando utilizado um inibidor desta enzima, indicando a relação da atividade enzimática da DPPIV/CD26 sobre este mecanismo (Arscott *et al.*, 2009), este dado corrobora os resultados encontrados no nosso estudo.

Tendo em vista a ligação da DPPIV/CD26 às proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina e o colágeno, esta enzima apresenta também relação com a adesão celular. Nossos resultados para os ensaios de adesão celular demonstraram uma diminuição significativa na adesão quando as linhagens de câncer cervical foram incubadas na presença do inibidor seletivo da DPPIV/CD26. Estes achados sugerem que além da interação com as proteínas da matriz extracelular, a atividade enzimática da DPPIV/CD26 também parece estar relacionada ao processo de adesão celular.

Dados da literatura reportam que a introdução de DPPIV/CD26 em linhagens celulares de carcinoma de ovário provoca um aumento na adesão celular e uma redução significativa na migração e no potencial invasivo (Figura 5). Este grupo observou que a expressão de moléculas de adesão como E-caderina e E-catenina são positivamente correlacionadas com a expressão da DPPIV/CD26 e, além disso, a superexpressão da DPPIV/CD26 induz a expressão de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e reduz a expressão de metaloproteinase 2, um importante marcador associado ao potencial invasivo e metastático (Kajiyama *et al.*, 2003; Kikkawa *et al.*, 2005). Sendo assim, estudos demonstram que a inibição da progressão tumoral também pode ser mediada independente da atividade enzimática da DPPIV/CD26 (Busek *et al.*, 2012).

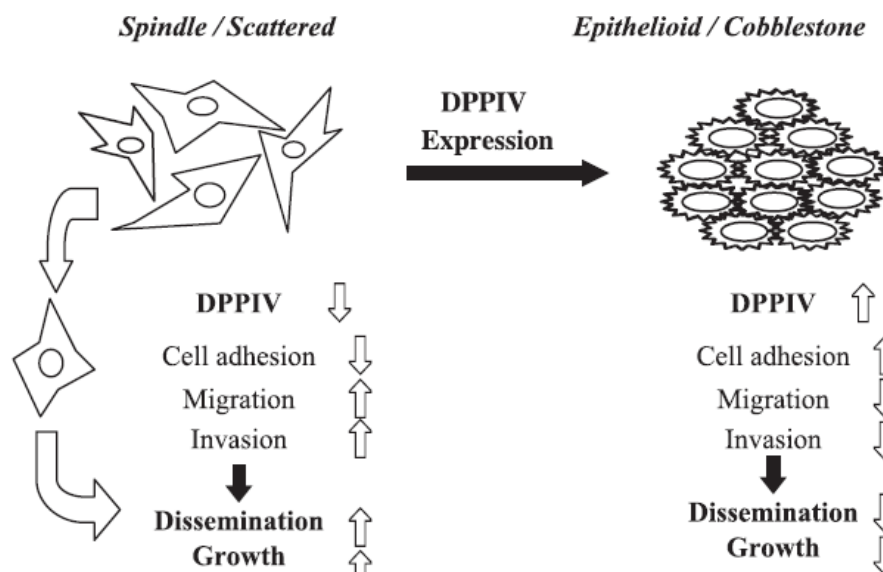


Figura 5: Possível mecanismo da DPPIV/CD26 em células de carcinoma altamente maligno. Adaptado de Kikkawa (2005). Cópia autorizada por Biochimica et Biophysica Acta (BBA).

Nesse estudo, caracterizamos, pela primeira vez, os níveis de expressão e atividade da DPPIV/CD26 em linhagens celulares de câncer cervical, em comparação a linhagem de queratinócitos imortalizados. Observamos que a migração e adesão celular das linhagens SiHa e HeLa foram afetadas pelo inibidor específico da DPPIV/CD26, indicando que a atividade enzimática da DPPIV/CD26 está relacionada a estes processos nas linhagens de câncer cervical estudadas. Porém, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais a DPPIV/CD26 se relaciona ao câncer cervical.

V. Conclusões gerais

Os resultados apresentados nesta dissertação permitem as seguintes conclusões:

1. As células de câncer cervical apresentam atividade enzimática da DPPIV/CD26 tanto na forma ligada à membrana como na forma solúvel, o que foi confirmado por meio da inibição da atividade enzimática com fosfato de sitagliptina;
2. Tanto nas células aderentes quanto no sobrenadante, as atividades de hidrólise foram mais elevadas nas linhagens HaCaT e SiHa, em comparação com as linhagens HeLa e C33A;
3. A expressão da DPPIV/CD26 foi mais elevada nas células HaCaT e SiHa, enquanto que na linhagem HeLa o RNAm para DPPIV/CD26 foi praticamente indetectável;
4. O ensaio de migração revelou uma maior capacidade migratória basal das células HeLa. No entanto, na presença do inibidor, as células SiHa apresentam um aumento significativo na migração, enquanto que para células HeLa não houve alteração significativa;
5. No ensaio de adesão, os resultados indicaram que na presença de fosfato de sitagliptina as linhagens SiHa e HeLa apresentam uma redução significativa na adesão celular;
6. A atividade enzimática da DPPIV/CD26 parece estar relacionada com os processos de migração e adesão celular nestas linhagens;
7. A baixa expressão e atividade da DPPIV/CD26 parece facilitar a progressão tumoral em células de câncer cervical;
8. Considerando que CD26/DPPIV desempenha um importante papel na biologia do tumor, esta proteína pode vir a se tornar, no futuro, um marcador de prognóstico ou um importante alvo terapêutico para o câncer cervical.

VI. Perspectivas

No sentido de melhor compreender a relação da DPPIV/CD26 com a carcinogênese cervical, algumas perspectivas são sugeridas:

1. Induzir a superexpressão da DPPIV/CD26 na linhagem HeLa, através da técnica de transfecção gênica desta proteína com vetor lentiviral, utilizando plasmídeos específicos (DPPIV/CD26) e DPPIV/CD26 mutada, desprovida de atividade enzimática (mutDPPIV/CD26);
2. Após transfecção gênica, iremos realizar os seguintes estudos comparativos entre as células da linhagem HeLa não transfectadas, transfectadas (DPPIV/CD26 e mutDPPIV/CD26) e controle (transfectadas apenas com vetor):
 - 2.1. Avaliar a atividade enzimática da DPPIV/CD26;
 - 2.2. Avaliar efeitos sobre a taxa de proliferação, migração, invasão e adesão celular e angiogênese;
 - 2.3. Avaliar a resistência das células frente a agentes antineoplásicos;
 - 2.4. Avaliar a expressão e atividade de metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs);
 - 2.5. Avaliar a expressão do receptor CXCR4 e de marcadores de transição epitelial-mesenquimal.
3. Avaliar a relação da expressão da DPPIV/CD26 com o HPV18 após expressão das oncoproteína E6 e E7 do HPV18 em queratinócitos.
4. Realizar estudos *in vivo*, por meio da indução de tumores em camundongos imunodeficientes do tipo nude (BALB/c nu-nu), com células expressando baixos e elevados níveis de DPPIV/CD26.

VII. Referências

- ARSCOTT, W. T.; LABAUVE, A. E.; MAY, V.; WESLEY, U. V. Suppression of Neuroblastoma Growth by Dipeptidyl Peptidase IV: Relevance of Chemokine Regulation and Caspase Activation. *Oncogene*, v.28, p. 479-91, 2009.
- BOONACKER, E.; VAN NOORDEN, C. J. The Multifunctional or Moonlighting Protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol*, v.82, p.53-73, 2003.
- BUSEK, P.; STREMENOVA, J.; SROMOVA, L.; HILSER, M.; BALAZIOVA, E.; KOSEK, D.; TRYLCOVA, J. Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibits Glioma Cell Growth Independent of Its Enzymatic Activity. *Int J Biochem Cell Biol*, v.44, p.738-47, 2012.
- CHENG, H. C.; ABDEL-GHANY, M.; PAULI, B. U. A Novel Consensus Motif in Fibronectin Mediates Dipeptidyl Peptidase IV Adhesion and Metastasis. *J Biol Chem*, v.278, p.24600-7, 2003.
- CORDERO, O. J.; SALGADO, F. J.; NOGUEIRA, M. On the Origin of Serum CD26 and Its Altered Concentration in Cancer Patients. *Cancer Immunol Immunother*, v.58, p.1723-47, 2009.
- CORDERO, O. J.; IMBERNON, M.; CHIARA, L. D.; MARTINEZ-ZORZANO, V. S.; AYUDE, D.; DE LA CADENA, M. P.; RODRIGUEZ-BERROCAL, F. J. Potential of Soluble CD26 as a Serum Marker for Colorectal Cancer Detection. *World J Clin Oncol*, v.2, p.245-61, 2011.
- DING, Y. L.; FU, Q. Y.; TANG, S. F.; ZHANG, J. L.; LI, Z. Y.; LI, Z. T. [Effect of Stromal Cell-Derived Factor-1 and Its Receptor CXCR4 on Liver Metastasis of Human Colon Cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, v.47, p.210-3, 2009.
- DONG, R. P.; TACHIBANA, K.; HEGEN, M.; MUNAKATA, Y.; CHO, D.; SCHLOSSMAN, S. F.; MORIMOTO, C. Determination of Adenosine Deaminase Binding Domain on CD26 and Its Immunoregulatory Effect on T Cell Activation. *J Immunol*, v.159, p.6070-6, 1997.
- DUGGAN, M. A. A Review of the Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Gan To Kagaku Ryoho*, v.29, p.176-93, 2002.
- FRANCO, R.; CASADO, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E. I.; LLUIS, C. Cell Surface Adenosine Deaminase: Much More Than an Ectoenzyme. *Prog Neurobiol*, v.52, p.283-94, 1997.
- HARTMANN, K.E.; HALL, S.A.; MYERS, E. *Screening for Cervical Cancer – Agency for Healthcare Research and Quality*. 2002.
- HAVRE, P. A.; ABE, M.; URASAKI, Y.; OHNUMA, K.; MORIMOTO, C.; DANG, N. H. The Role of CD26/Dipeptidyl Peptidase IV in Cancer. *Front Biosci*, v.13, p.1634-45, 2008.
- HERRERA, C.; MORIMOTO, C.; BLANCO, J.; MALLOL, J.; ARENZANA, F.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Comodulation of CXCR4 and CD26 in Human Lymphocytes. *J Biol Chem*, v.276, p.19532-9, 2001.

- HIRAI, K.; KOTANI, T.; ARATAKE, Y.; OHTAKI, S.; KUMA, K. Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV/CD26) Staining Predicts Distant Metastasis of 'Benign' Thyroid Tumor. *Pathol Int*, v.49, p.264-5, 1999.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estatísticas do Câncer, Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.html>>. Acesso em: 12 set. 2013.
- JAVIDROOZI, M.; ZUCKER, S.; CHEN, W. T. Plasma Seprase and DPP4 Levels as Markers of Disease and Prognosis in Cancer. *Dis Markers*, v.32, p.309-20, 2012.
- KAJIYAMA, H.; KIKKAWA, F.; SUZUKI, T.; SHIBATA, K.; INO, K.; MIZUTANI, S. Prolonged Survival and Decreased Invasive Activity Attributable to Dipeptidyl Peptidase IV Overexpression in Ovarian Carcinoma. *Cancer Res*, v.62, p.2753-7, 2002.
- KAJIYAMA, H.; KIKKAWA, F.; KHIN, E.; SHIBATA, K.; INO, K.; MIZUTANI, S. Dipeptidyl Peptidase IV Overexpression Induces up-Regulation of E-Cadherin and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases, Resulting in Decreased Invasive Potential in Ovarian Carcinoma Cells. *Cancer Res*, v.63, p.2278-83, 2003.
- KAJIYAMA, H.; SHIBATA, K.; TERAUCHI, M.; INO, K.; NAWA, A.; KIKKAWA, F. Involvement of DPPIV/CD26 in Epithelial Morphology and Suppressed Invasive Ability in Ovarian Carcinoma Cells. *Ann N Y Acad Sci*, v.1086, p. 233-40, 2006.
- KIKKAWA, F.; KAJIYAMA, H.; SHIBATA, K.; INO, K.; NOMURA, S.; MIZUTANI, S. Dipeptidyl Peptidase IV in Tumor Progression. *Biochim Biophys Acta*, v.1751, p.45-51, 2005.
- KRYCZEK, I.; WEI, S.; KELLER, E.; LIU, R.; ZOU, W. Stroma-Derived Factor (Sdf-1/Cxcl12) and Human Tumor Pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.292, p.987-95, 2007.
- LAMBEIR, A. M.; PROOST, P.; DURINX, C.; BAL, G.; SENTEN, K.; AUGUSTYNS, K.; SCHARPE, S.; VAN DAMME, J.; DE MEESTER, I. Kinetic Investigation of Chemokine Truncation by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV Reveals a Striking Selectivity within the Chemokine Family. *J Biol Chem*, v.276, p.29839-45, 2001.
- LIU, Y.; MCKALIP, A.; HERMAN, B. Human Papillomavirus Type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 Sensitize Human Keratinocytes to Apoptosis Induced by Chemotherapeutic Agents: Roles of P53 and Caspase Activation. *J Cell Biochem*, v.78, p.334-49, 2000.
- LORENZATTO, M.; CAUDROY, S.; BRONNER, C.; EVRARD, G.; SIMON, M.; DURLACH, A.; BIREMBAUT, P.; CLAVEL, C. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Human Pathology*, v.36, p.1101-7, 2005.

- MATIC, I. Z.; ETHORDIC, M.; GROZDANIC, N.; DAMJANOVIC, A.; KOLUNDZIJA, B.; ERIC-NIKOLIC, A.; DZODIC, R. Serum Activity of DPPIV and Its Expression on Lymphocytes in Patients with Melanoma and in People with Vitiligo. *BMC Immunol*, v.13, p.48, 2012.
- MONTESINOS, M. C.; DESAI, A.; CHEN, J. F.; YEE, H.; SCHWARZSCHILD, M. A.; FINK, J. S.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine Promotes Wound Healing and Mediates Angiogenesis in Response to Tissue Injury Via Occupancy of a(2a) Receptors. *Am J Pathol*, v.160, p.2009-18, 2002.
- MUJOOMDAR, M.; HOSKIN, D.; BLAY, J. Adenosine Stimulation of the Proliferation of Colorectal Carcinoma Cell Lines. Roles of Cell Density and Adenosine Metabolism. *Biochem Pharmacol*, v.66, p.1737-47, 2003.
- MUJOOMDAR, M.; BENNETT, A.; HOSKIN, D.; BLAY, J. Adenosine Stimulation of Proliferation of Breast Carcinoma Cell Lines: Evaluation of the [3h]Thymidine Assay System and Modulatory Effects of the Cellular Microenvironment in Vitro. *J Cell Physiol*, v.201, p.429-38, 2004.
- OLIVEIRA, A.; DELGADO, C.; VERDASCA, N.; PISTA, A. Biomarkers of cervical carcinogenesis associated with genital human papillomavirus infection. *Acta Med Port*, v.26, p.139-44, 2013.
- PANG, R.; LAW, W. L.; CHU, A. C.; POON, J. T.; LAM, C. S.; CHOW, A. K.; NG, L. A Subpopulation of CD26+ Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity in Human Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell*, v.6, p.603-15, 2010.
- PETHIYAGODA, C. L.; WELCH, D. R.; FLEMING, T. P. Dipeptidyl Peptidase IV (DPPIV) Inhibits Cellular Invasion of Melanoma Cells. *Clin Exp Metastasis*, v.18, p.391-400, 2000.
- RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F.; LONGATTO-FILHO, A.; GONTIJO, R. C.; SARIAN, L. O.; SYRJANEN, K.; ALDRIGHI, J. M. [Prevalence of Genital HPV Infection among Women Screened for Cervical Cancer]. *Rev Saude Publica*, v.42, p.123-30, 2008.
- RAMSEY, D. M.; MCALPINE, S. R. Halting Metastasis through CXCR4 Inhibition. *Bioorg Med Chem Lett*, v.23, p.20-5, 2013.
- RAPP, L.; CHEN, J. J. The Papillomavirus E6 Proteins. *Biochim Biophys Acta*, v.1378, p.1-19, 1998.
- RASMUSSEN, H. B.; BRANNER, S.; WIBERG, F. C.; WAGTMANN, N. Crystal Structure of Human Dipeptidyl Peptidase IV/CD26 in Complex with a Substrate Analog. *Nat Struct Biol*, v.10, p.19-25, 2003.
- RODEN, R.; WU, T. C. How Will HPV Vaccines Affect Cervical Cancer?. *Nat Rev Cancer*, v.6, p.753-63, 2006.
- SATO, T., YAMOCHI, T.; YAMOCHI, T.; AYTAC, U.; OHNUMA, K.; MCKEE, K. S.; MORIMOTO, C.; DANG, N. H. CD26 Regulates P38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Phosphorylation of Integrin Beta1, Adhesion to

- Extracellular Matrix, and Tumorigenicity of T-Anaplastic Large Cell Lymphoma Karpas 299. *Cancer Res*, v.65, p.6950-6, 2005.
- SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N.; WACHOLDER, S.; KINNEY, W.; GAGE, J. C.; CASTLE, P. E. Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. *J Natl Cancer Inst*, v.103, p.368-83, 2011.
- STEEG, C.; HARTWIG, U.; FLEISCHER, B. Unchanged Signaling Capacity of Mutant CD26/Dipeptidylpeptidase IV Molecules Devoid of Enzymatic Activity. *Cell Immunol*, v.164, p.311-5, 1995.
- SUN, Y. X.; PEDERSEN, E. A.; SHIOZAWA, Y.; HAVENS, A. M.; JUNG, Y.; WANG, J.; PIANTA, K. J.; TAICHMAN, R. S. CD26/Dipeptidyl Peptidase IV Regulates Prostate Cancer Metastasis by Degrading Sdf-1/CXCL12." *Clin Exp Metastasis*, v.25, p.765-76, 2008.
- TAN, E. Y.; MUJOOMDAR, M.; BLAY, J. Adenosine Down-Regulates the Surface Expression of Dipeptidyl Peptidase IV on Ht-29 Human Colorectal Carcinoma Cells: Implications for Cancer Cell Behavior. *Am J Pathol*, v.165, p.319-30, 2004.
- THOMPSON, M. A.; OHNUMA, K.; ABE, M.; MORIMOTO, C.; DANG, N. H. CD26/Dipeptidyl Peptidase IV as a Novel Therapeutic Target for Cancer and Immune Disorders. *Mini Rev Med Chem*, v.7, p.253-73, 2007.
- TJALMA, W. A.; ARBYN, M.; PAAVONEN, J.; VAN WAES, T. R.; BOGERS, J. J. Prophylactic Human Papillomavirus Vaccines: The Beginning of the End of Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer*, v.14, p.751-61, 2004.
- VARONA, A.; BLANCO, L.; PEREZ, I.; GIL, J.; IRAZUSTA, J.; LOPEZ, J. I.; CANDENAS, M. L.; PINTO, F. M.; LARRINAGA, G. Expression and Activity Profiles of DPP IV/CD26 and Nep/Cd10 Glycoproteins in the Human Renal Cancer Are Tumor-Type Dependent. *BMC Cancer*, v.10, p.193, 2010.
- WANG, T.; MI, Y.; PIAN, L.; GAO, P.; XU, H.; ZHENG, Y. RNAi targeting CXCR4 inhibits proliferation and invasion of esophageal carcinoma cells. *Diagnostic pathology*, v.8, p.104, 2013.
- WESLEY, U. V.; ALBINO, A. P.; TIWARI, S.; HOUGHTON, A. N. A Role for Dipeptidyl Peptidase IV in Suppressing the Malignant Phenotype of Melanocytic Cells. *J Exp Med*, v.190, p.311-22, 1999.
- WESLEY, U. V.; TIWARI, S.; HOUGHTON, A. N. Role for Dipeptidyl Peptidase Iv in Tumor Suppression of Human Non Small Cell Lung Carcinoma Cells. *Int J Cancer*, v.109, p.855-66, 2004.
- WESLEY, U. V.; MCGROARTY, M.; HOMOYOUNI, A. Dipeptidyl Peptidase Inhibits Malignant Phenotype of Prostate Cancer Cells by Blocking Basic Fibroblast Growth Factor Signaling Pathway. *Cancer Res*, v.65, p.1325-34, 2005.