

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

Relação da expressão da DPPIV/CD26 com a progressão tumoral do carcinoma cervical humano e proteínas oncogênicas do HPV

ALINE BECKENKAMP

PORTO ALEGRE, 2017

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

Relação da expressão da DPPIV/CD26 com a progressão tumoral do carcinoma cervical humano e proteínas oncogênicas do HPV

Tese apresentada por
Aline Beckenkamp para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Buffon

Co-orientador: Prof. Dr. Guido Lenz

Porto Alegre, 2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 de Julho de 2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Elizandra Braganhol
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dr. Fabrício Figueiró
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Fernanda Visioli
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Beckenkamp, Aline
Relação da expressão da DPPIV/CD26 com a
progressão tumoral do carcinoma cervical humano e
proteínas oncogênicas do HPV / Aline Beckenkamp. --
2017.
154 f.

Orientador: Andréia Buffon.
Coorientador: Guido Lenz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2017.

1. Câncer cervical. 2. HPV. 3. DPPIV/CD26. I.
Buffon, Andréia, orient. II. Lenz, Guido, coorient.
III. 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 e no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular (LabSinal) do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Andréia Buffon pelos oito anos de orientação. Por todos os ensinamentos, disponibilidade, apoio e amizade. Por acreditar em mim e ter me dado a oportunidade de participar da evolução do laboratório. Pelo exemplo de profissional dedicada. Certamente foi uma pessoa muito importante para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu co-orientador, prof. Dr. Guido Lenz, agradeço por todo aprendizado em novas metodologias, por seu profissionalismo e sua visão crítica.

Ao prof. Dr. Diogo André Pilger, agradeço por todo apoio, incentivo, discussão de resultados, conversas e conselhos.

Ao prof. Dr. Enrique Boccardo, pela disponibilidade e oportunidade de desenvolver parte do meu trabalho em colaboração com seu grupo de pesquisa.

Aos meus queridos colegas e ex-colegas do Laboratório de Análise Bioquímica e Citológica - Aline Schuster, Camila, Débora, Denise, Franceli, Jéssica, Júlia, Manu, Paola, Samuel e Sílvia - agradeço pela convivência, amizade, apoio, incentivo e por tornarem meus dias no laboratório mais divertidos.

À Fran pela incansável ajuda no desenvolvimento dos plasmídeos. À Bele, que foi minha parceira no início desta jornada, pela companhia, apoio e discussões de resultados. Aos demais alunos do LabSinal pela convivência e por me receberem bem no laboratório.

À Bruna Prati por toda ajuda, colaboração e troca de experiências.

À todos os colaboradores que participaram do desenvolvimento desta tese, muito obrigada pelo auxílio e colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade. E à CAPES pelo auxílio financeiro.

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

À minha vó agradeço pelo amor e apoio incondicional. Pelas rezas e torcida para que meus experimentos dessem certo. Por se interessar e se esforçar em entender o meu trabalho.

Ao Dé, dinda e Nicolas agradeço por todo incentivo, amor e carinho.

Ao Gabriel, pelo amor e companheirismo, por fazer meus dias mais felizes. Por me encorajar e apoiar na busca de novos objetivos.

“Now this is not the end. It is not even the beginning of the end.

But it is, perhaps, the end of the beginning.”

Winston Churchill

RESUMO

O câncer cervical é uma neoplasia muito prevalente na população feminina e está associado à infecção pelo papilomavírus humano (HPV). As oncoproteínas E6 e E7 de HPV de alto risco são as principais responsáveis pelas alterações celulares que levam ao desenvolvimento deste tipo tumoral. A dipeptidil peptidase IV (DPPIV/CD26) é uma enzima que exerce importantes funções relacionadas à progressão tumoral. Diversos estudos demonstram alterações na expressão e atividade desta proteína em diferentes tipos de câncer. Tendo em vista a relação entre a DPPIV/CD26 e o câncer, e que ainda não existem estudos relacionando esta proteína ao câncer cervical, neste estudo inicialmente investigamos a expressão e atividade da DPPIV/CD26 em linhagens celulares de carcinoma cervical humano (SiHa, HeLa e C33A) e em queratinócitos imortalizados (HaCaT). Nossos resultados demonstram uma baixa expressão da DPPIV/CD26 nas linhagens celulares estudadas, sendo praticamente indetectável na linhagem HeLa. Foi verificada a atividade enzimática dipeptidilpeptidásica tanto ligada à membrana quanto solúvel em todas as linhagens. Na presença do inibidor de DPPIV/CD26 (fosfato de sitagliptina) observamos que a linhagem SiHa apresentou um aumento na migração celular, e assim sugerimos que ao menos em parte a migração nesta linhagem é regulada pela atividade enzimática da DPPIV/CD26. A fim de investigar a relação da expressão da DPPIV/CD26 com as oncoproteínas E6 e E7 do HPV, avaliamos sua expressão em queratinócitos normais e transduzidos com estas oncoproteínas. Verificamos que queratinócitos expressando E6 de HPV de alto risco apresentam uma redução na expressão da DPPIV/CD26, e esta regulação parece ser dependente da degradação da p53. Considerando que as linhagens celulares estudadas apresentam baixa expressão e atividade da DPPIV/CD26, para melhor compreender a importância da expressão desta proteína, nós induzimos a superexpressão da DPPIV/CD26 em linhagem de câncer cervical (HeLa) para posterior avaliação dos efeitos em diferentes mecanismos tumorais. Os resultados demonstram uma redução no crescimento de células expressando DPPIV/CD26, sendo este efeito independente da atividade enzimática. Além disso, foi demonstrado que a indução da expressão de DPPIV/CD26 não afeta os mecanismos de migração e adesão celular na linhagem HeLa. Sendo assim, acreditamos que o esclarecimento do papel da DPPIV/CD26 no contexto do câncer cervical possibilita que novas abordagens diagnósticas e terapêuticas sejam implementadas no futuro.

Palavras-chave: DPPIV/CD26, câncer cervical, fosfato de sitagliptina, HPV, p53, progressão tumoral, biomarcador, alvo terapêutico, crescimento celular.

ABSTRACT

Cervical cancer is a very prevalent neoplasm in female population and is associated with human papillomavirus (HPV) infection. The high risk HPV E6 and E7 oncoproteins are responsible for cellular alterations that lead to the development of this tumor type. The dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) is an enzyme that exerts important functions related to tumor progression. Several studies have shown changes in the expression and activity of this protein in different types of cancer. Considering the relationship between DPPIV/CD26 and cancer, and that there are still no studies relating this protein to cervical cancer, in the present study we first investigated the DPPIV/CD26 expression and activity in human cervical carcinoma cell lines (SiHa, HeLa and C33A) and in immortalized keratinocytes (HaCaT). Our results demonstrate a low DPPIV/CD26 expression in the studied cell lines, being almost undetectable in HeLa cell line. The dipeptidylpeptidasic enzymatic activity was verified both membrane bound and in the soluble form in all cell lines. In the presence of the DPPIV/CD26 inhibitor (sitagliptin phosphate) we observed that SiHa cell line showed an increase in cell migration, thus we suggest that at least in part cell migration in this cell line is regulated by DPPIV/CD26 enzymatic activity. In order to investigate the relationship between DPPIV/CD26 expression and HPV E6 and E7 oncoproteins, we evaluated the expression of this protein in normal keratinocytes or transduced with these oncoproteins. We have found that keratinocytes expressing high-risk HPV E6 present a reduction in DPPIV/CD26 expression, and this regulation appears to be dependent on p53 degradation. Considering that the cell lines studied have low DPPIV/CD26 expression and activity, in order to better understand the importance of the expression of this protein, we induced the DPPIV/CD26 overexpression in a cervical cancer cell line (HeLa) for further evaluation of the effects on different tumor mechanisms. The results demonstrate a reduction in cell growth of DPPIV/CD26 expressing cells, being this effect independent of the enzymatic activity. In addition, it has been demonstrated that the induction of DPPIV/CD26 expression does not affect the cell migration and adhesion mechanisms in the HeLa cell line. Thus, we believe that the elucidation of the DPPIV/CD26 role in the context of cervical cancer enables new diagnostic and therapeutic approaches to be implemented in the future.

Keywords: DPPIV/CD26, cervical cancer, sitagliptin phosphate, HPV, p53, tumor progression, biomarker, therapeutic target, cell growth.

SUMÁRIO

I. Introdução

| | |
|---|----|
| I.1. Câncer cervical e HPV..... | 21 |
| I.2. Família dipeptidil peptidase IV..... | 24 |
| I.3. Estrutura e funções da DPPIV/CD26..... | 25 |
| I.4. DPPIV/CD26 e câncer..... | 27 |
| I.5. DPPIV/CD26 como marcador tumoral..... | 28 |
| I.6. DPPIV/CD26 como alvo terapêutico..... | 29 |

II. Objetivos.....31

III. Artigos científicos

| | |
|---|-----------|
| III. 1. CAPÍTULO 1 - <u>Aline Beckenkamp</u>, Samuel Davies, Júlia Biz Willig, Andréia Buffon. DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? <i>Tumor Biol.</i> 2016 Jun; 37(6): 7059-73. doi: 10.1007/s13277-016-5005-2. Review..... | 37 |
|---|-----------|

| | |
|---|-----------|
| III. 2. CAPÍTULO 2 - <u>Aline Beckenkamp</u>, Júlia Biz Willig, Danielle Bertodo Santana, Jéssica Nascimento, Juliano Domiraci Paccez, Luiz Fernando Zerbini, Alessandra Nejar Bruno, Diogo André Pilger, Márcia Rosângela Wink, Andréia Buffon. Differential Expression and Enzymatic Activity of DPPIV/CD26 Affects Migration Ability of Cervical Carcinoma Cells. <i>PLoS ONE.</i> 2015 Jul; 10(7): e0134305. doi:10.1371/journal.pone.0134305. | 55 |
|---|-----------|

| | |
|--|-----------|
| III. 3. CAPÍTULO 3 - <u>Aline Beckenkamp</u>, Bruna Prati, Silvy Stuchi Maria-Engler, Diogo André Pilger, Enrique Boccardo, Andréia Buffon. HPV16 E6 oncoprotein lead to DPPIV/CD26 downregulation in primary keratinocytes..... | 79 |
|--|-----------|

| | |
|--|------------|
| III. 4. CAPÍTULO 4 - <u>Aline Beckenkamp</u>, Júlia Biz Willig, Franciele Cristina Kipper, Guido Lenz, Andréia Buffon. DPPIV/CD26 overexpression inhibits cervical cancer cell growth..... | 99 |
| IV. Discussão geral..... | 125 |
| V. Conclusões gerais..... | 137 |
| VI. Referências..... | 141 |
| VII. Biografia..... | 151 |

I. Introdução

I.1. Câncer cervical e HPV

O câncer da cérvix uterina segue como uma das neoplasias que mais atinge as mulheres. O último levantamento realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostrou que no Brasil o câncer cervical ocupa a terceira posição entre os tipos de câncer mais frequentes na população feminina, perdendo apenas para o câncer de mama e colorretal. Além disso, representa a quarta causa de morte de mulheres por câncer (INCA, 2016).

As diferenças observadas nos índices de incidência e mortalidade por esta patologia em diferentes regiões se devem em grande parte à falta de acesso da população ao sistema de rastreamento e prevenção em regiões menos desenvolvidas. O exame preventivo Papanicolaou é capaz de identificar alterações celulares iniciais, que levam ao desencadeamento do câncer cervical. Se detectado precocemente, a chance de cura é elevada, visto que a sobrevivência de pacientes com câncer cervical depende fortemente do estágio em que a doença se encontra ao diagnóstico (Hartmann *et al.*, 2002).

O desenvolvimento do câncer cervical está diretamente relacionado com a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), um agente infeccioso transmitido principalmente por via sexual (Rama *et al.*, 2008). Os genótipos de HPV são classificados de acordo com seu potencial oncogênico, onde os HPVs de alto risco, tais como os genótipos 16 e 18, são geralmente associados às neoplasias intraepiteliais e invasoras do colo uterino, sendo estes os mais frequentemente detectados. Já os HPVs de baixo risco oncogênico, como os genótipos 6 e 11, estão relacionados com a ocorrência de verrugas genitais (Clifford *et al.*, 2003; Munoz *et al.*, 2003). Vacinas contra o HPV foram aprovadas para uso em diversos países na tentativa de reduzir a infecção por este vírus e o consequente desenvolvimento tumoral (Roden *et al.*, 2006; Elzein *et al.*, 2016).

O genoma do HPV é composto por oito genes, onde L1 e L2 codificam proteínas estruturais do capsídeo viral, e os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 codificam diferentes proteínas envolvidas na regulação e transcrição de genes virais, replicação do DNA viral e transformação celular (Ruttkay-Nedecky *et al.*,

2013). Os oncogenes E6 e E7 são os responsáveis pelas propriedades transformantes dos HPVs de alto risco. Em lesões malignas, associadas à infecção persistente por HPV de alto risco, ocorre a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro. Durante este processo de integração acontece uma quebra no genoma viral, geralmente na região E2 do vírus, com perda das funções deste gene. Assim, E2 não exerce mais o controle e regulação negativa sobre E6 e E7 e ocorre um aumento da expressão destas oncoproteínas (Woodman *et al.*, 2007) (Figura 1). As proteínas codificadas por estes genes inativam genes supressores tumorais que atuam regulando a apoptose e o ciclo celular (zur Hausen *et al.*, 2002).

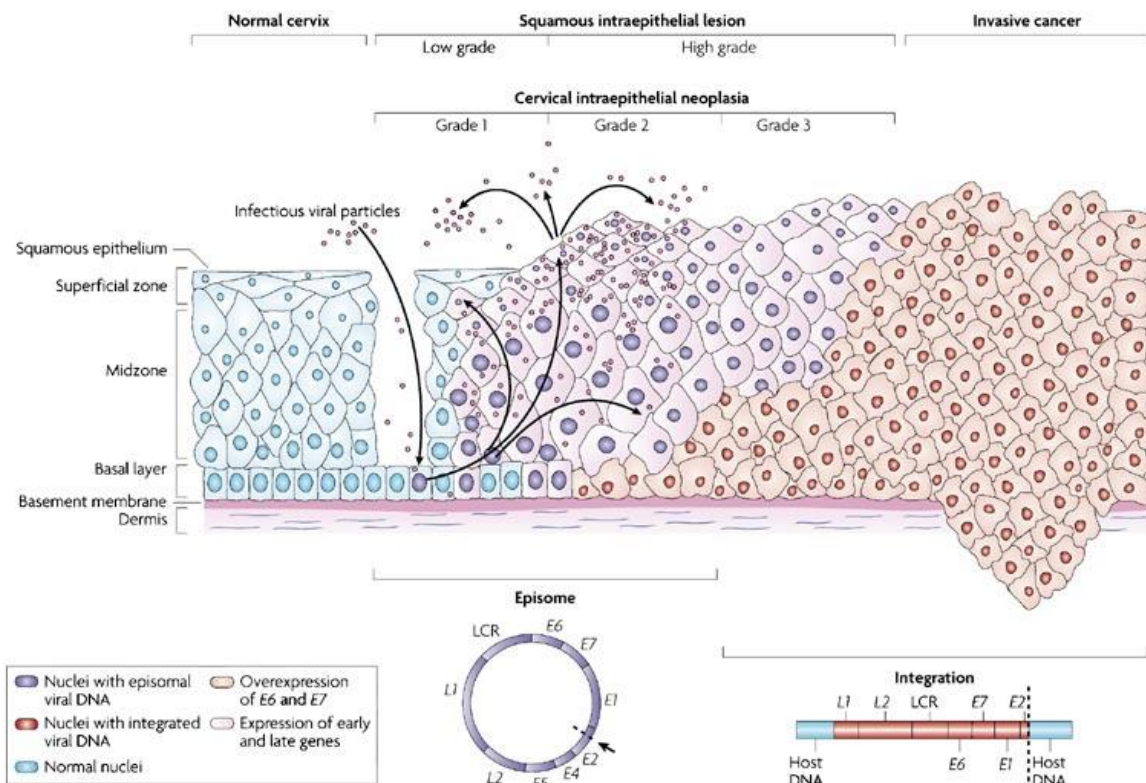


Figura 1: Carcinogênese cervical pelo HPV. Após a infecção dos queratinócitos basais pelo HPV, os genes precoces do HPV E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são expressos e o DNA viral replica na forma episomal (núcleos roxos). L1 e L2 sintetizam o capsídeo viral e novas partículas virais são liberadas e a infecção pode reiniciar. Um número significativo de infecções por HPVs de alto risco progridem para lesões intra-epiteliais de alto grau (HSIL), que podem ser detectadas pelo exame de Papanicolau e efetivamente tratadas por excisão. A progressão de lesões não tratadas ao carcinoma invasor está associada com a integração do DNA do HPV ao genoma do hospedeiro (núcleos vermelhos), ocorre a quebra e perda de função de E2 e o aumento na expressão dos oncogenes E6 e E7. Adaptado de Woodman *et al.*, 2007. Cópia autorizada por Nature Publishing Group (4138790935770).

A oncoproteína E6 atua promovendo a carcinogênese através de diferentes mecanismos como a degradação de p53 e ativação de telomerase. Sua ação mais bem descrita ocorre através de sua ligação à proteína associada, ubiquitina-ligase E6AP, e este complexo se liga à p53 promovendo sua degradação mediada por proteassomo (Howie *et al.*, 2009; Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013) (Figura 2). O p53 é um gene supressor tumoral com importante ação na regulação da proliferação celular, com sua degradação induzida pela E6 ocorre a inibição da atividade pró-apoptótica e um crescimento celular descontrolado.

A oncoproteína E7 se liga à proteína do retinoblastoma (pRb) e interage com outras proteínas que são importantes reguladoras do ciclo celular. Normalmente pRb se liga ao fator de transcrição E2F, bloqueando sua atividade. Quando E7 se liga à pRb ocorre a inativação desta proteína e a liberação de E2F que pode se ligar ao DNA induzindo a progressão do ciclo celular (Chellappan *et al.*, 1992; Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013) (Figura 2).

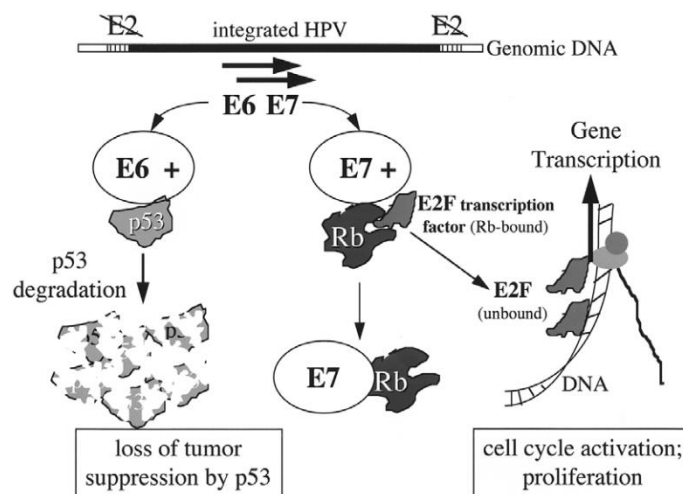


Figura 2: Ação das oncoproteínas E6 e E7. A oncoproteína E6 se liga à p53 e induz sua degradação, e E7 se liga à pRb deixando o fator de transcrição E2F livre para agir induzindo a ativação do ciclo celular e proliferação celular. Adaptado de Janicek *et al.*, 2001. Cópia autorizada por John Wiley and Sons (4138850184312).

Este é um dos principais mecanismos sugeridos para a indução da formação tumoral pelos HPVs de alto risco. Porém, apesar da infecção pelo HPV ser um fator essencial, ela não é suficiente para desencadear o processo de carcinogênese cervical (Schiffman *et al.*, 2011; Pontillo *et al.*, 2016).

I.2. Família dipeptidil peptidase IV

A família da dipeptidil peptidase IV (DPPIV) é composta por seis diferentes proteínas (Figura 3), sendo que quatro delas apresentam atividade enzimática (DPPIV/CD26, DPP8, DPP9 e FAP), com uma rara especificidade sobre substratos, clivando dipeptídeos da extremidade N-terminal após a presença de resíduos de prolina (Gorrell *et al.*, 2005). As proteínas DPP6/DPPL1 e DPP10/DPPL2 constituem os membros desta família sem atividade enzimática e são expressas no tecido cerebral como moduladores de canais de potássio dependentes de voltagem (Yu *et al.*, 2010).

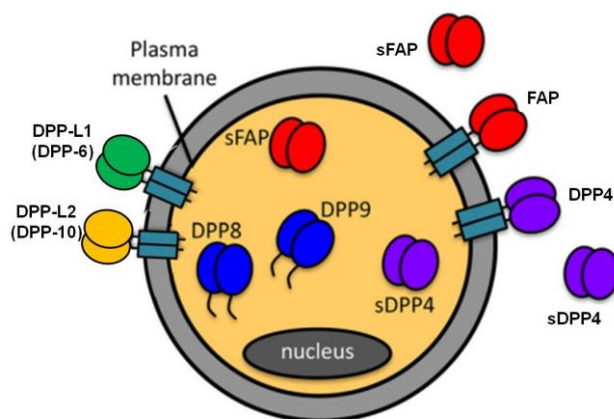


Figura 3: Localização celular das seis proteínas da família da DPPIV. DPPIV/CD26 (DPP4) e FAP são proteínas de membrana, que também apresentam formas solúveis (intra e extracelulares). DPP8 e DPP9 são proteínas intracelulares. DPP6/DPPL1 e DPP10/DPPL2 sofreram mutações no sítio catalítico e assim constituem os membros sem atividade enzimática desta família, são proteínas ancoradas à membrana. Adaptado de Hamson *et al.*, 2014. Cópia autorizada por John Wiley and Sons (4163850262283).

Embora DPPIV/CD26, DPP8, DPP9 e FAP sejam proteínas estruturalmente conservadas e possuam atividades enzimáticas semelhantes, elas apresentam diferentes padrões de expressão, localização e funções distintas. FAP, diferente dos demais membros desta família, apresenta atividade de gelatinase e collagenase, relacionando-se com o remodelamento de tecidos. Esta proteína não é expressa em tecidos normais e tem sido descrita como uma proteína reguladora do crescimento tumoral e metástase. DPP8 e DPP9 são proteínas citoplasmáticas amplamente distribuídas, porém suas funções ainda não estão bem estabelecidas (Yu *et al.*, 2010; Waumans *et al.*, 2015). Recentemente foi descrito que a DPP9 está relacionada com a

tumorigênese, metástase e pior prognóstico em câncer de pulmão de não pequenas células (Tang *et al.*, 2017). A DPPIV/CD26 é o membro mais estudado desta família, e apresenta diversas funções no metabolismo, endocrinologia, sistema imune e biologia tumoral (Yu *et al.*, 2010).

Devido à homologia estrutural e semelhanças na especificidade de substratos, recentemente outras proteínas tem sido relacionadas à família da DPPIV, são elas a DPP2, prolil carboxipeptidase (PRCP) e prolil oligopeptidase (PREP ou POP) (Waumans *et al.*, 2015). Embora a DPP2 clive diversos substratos da DPPIV/CD26 *in vitro*, até o momento não se tem relatos de substratos naturais para esta enzima (Mentlein *et al.*, 1989; Waumans *et al.*, 2015). PRCP cliva peptídeos da extremidade C-terminal, é uma enzima lisossomal envolvida no sistema renina-angiotensina, clivando peptídeos vasoativos, e relacionada ao controle de peso por inativar neuromoduladores anorexígenos (Ody *et al.*, 1978; Diano *et al.*, 2011). PREP apresenta atividade de endopeptidase, localiza-se no citoplasma e é importante na quimiotaxia de neutrófilos, também desempenha suas funções via interação com outras proteínas e parece estar relacionada à memória (D'Agostino *et al.*, 2013).

I.3. Estrutura e funções da DPPIV/CD26

A exoprotease DPPIV/CD26 é uma glicoproteína constituída pelos domínios extracelular, transmembrana e citoplasmático, expressa na forma dimérica em uma variedade de tipos celulares (Rasmussen *et al.*, 2003; Havre *et al.*, 2008; Cordero *et al.*, 2009). Embora seja encontrada principalmente ancorada na membrana das células, esta proteína também possui uma forma solúvel (sDPPIV/sCD26) enzimaticamente ativa em fluidos biológicos (Havre *et al.*, 2008). A sDPPIV/sCD26 não possui a região transmembrana e os resíduos citoplasmáticos, e também é expressa na forma dimérica (Lambeir *et al.*, 2001).

O domínio extracelular da DPPIV/CD26 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 já foi descrito que várias citocinas, quimiocinas e integrinas são clivadas por esta enzima (Cordero *et al.*, 2009). Para que a atividade enzimática da DPPIV/CD26 seja preservada são importantes os resíduos que formam a tríade catalítica (Ser⁶³⁰, Asp⁷⁰⁸ e His⁷⁴⁰) e Tyr⁵⁴⁷ que estabiliza a forma intermediária do substrato (Bjelke *et al.*, 2004; Gorrel *et al.*, 2005). Tem sido descrito um modelo experimental de DPPIV/CD26 mutante, desprovida de atividade serina protease, que consiste na substituição do resíduo de serina da posição 630 por alanina (S630A) (Steeg *et al.*, 1995).

A DPPIV/CD26 também apresenta funções não enzimáticas, ancorando a adenosina deaminase (ADA) à membrana celular (Dong *et al.*, 1997), facilitando a desaminação da adenosina no meio extracelular (Franco *et al.*, 1997). Além disso, a DPPIV/CD26 interage com proteínas da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina (Cheng *et al.*, 2003) e também atua em diferentes vias de sinalização (Havre *et al.*, 2008). Uma unidade desta proteína é capaz de desempenhar todas estas diferentes funções (Figura 4).

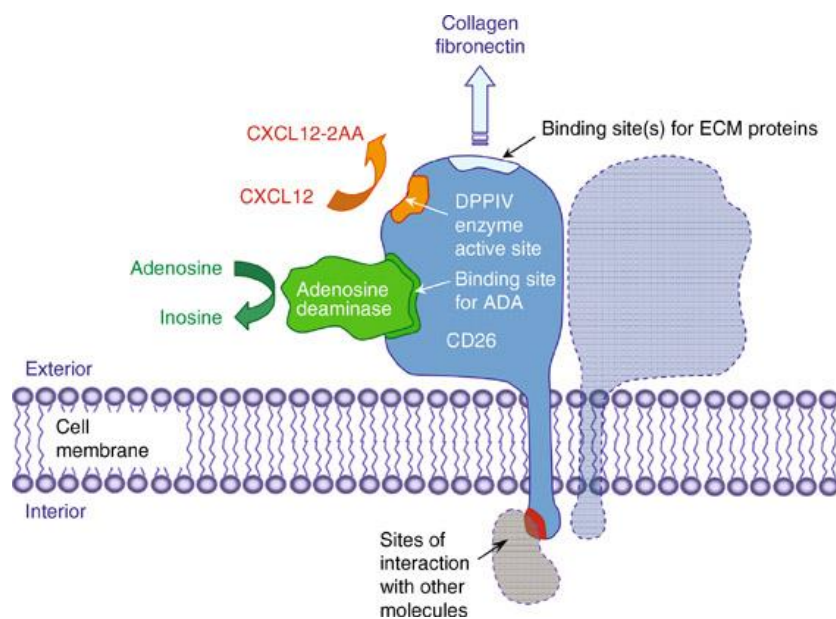


Figura 4: Diferentes domínios e funções da DPPIV/CD26. O esquema demonstra o sítio catalítico desta proteína responsável pela atividade enzimática da DPPIV/CD26, clivando diferentes peptídeos. Outro domínio é responsável pela ligação à ADA, e há também locais para a ligação de proteínas da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina. A porção intracelular da DPPIV/CD26 é curta e pode sinalizar intracelularmente por acoplamento com outros componentes celulares. Adaptado de Blay *et al.*, 2009. Cópia autorizada por Springer (4163851444759).

I.4. DPPIV/CD26 e câncer

As diferentes funções da DPPIV/CD26 se relacionam com processos envolvidos na progressão tumoral. Tendo em vista a diversidade de substratos clivados pela DPPIV/CD26, esta regula diversos processos fisiológicos como migração, adesão, invasão, apoptose e imunomodulação (Havre *et al.*, 2008). O fator derivado de células estromais (SDF-1 ou CXCL12) tem sido descrito como um dos principais substratos da DPPIV/CD26 relacionado com a carcinogênese. Via ativação do receptor CXCR4, SDF-1 atua promovendo metástases, e desempenha um papel importante na angiogênese, recrutando células endoteliais progenitoras da medula óssea, além de promover o crescimento tumoral e contribuir para vias de imunossupressão (Kryczek *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2009; Cavallaro *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2013).

Além disso, o complexo DPPIV/CD26-ADA facilita a degradação da adenosina no meio extracelular. Alguns tipos de câncer são acompanhados por uma baixa expressão da DPPIV/CD26, causando assim uma redução nas atividades da DPPIV/CD26 e da eADA. Esta redução por sua vez, leva a consequente diminuição na degradação local de SDF-1 e de adenosina. Foi demonstrado que o nucleosídeo adenosina promove angiogênese, estimula a motilidade e crescimento celular, suprime o sistema imunológico e facilita a sobrevivência de tumores (Mujoomdar *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2004; Antonioli *et al.*, 2013).

Ainda, ao interagir com proteínas da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina (Cheng *et al.*, 2003), a DPPIV/CD26 se relaciona com processos de adesão, migração celular e metástase. Também participa de diferentes vias de sinalização através da associação com FAP, proteína tirosina fosfatase CD45 e com o receptor CXCR4 (Herrera *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2007; Havre *et al.*, 2008). Regula a expressão de diversas moléculas de adesão, proteínas relacionadas à transição epitelial-mesenquimal e invasão, como as metaloproteinases (Kajiyama *et al.*, 2003; Pang *et al.*, 2010). Tendo em vista estas funções, a DPPIV/CD26 pode controlar a transformação neoplásica regulando diversos processos biológicos como a diferenciação celular, adesão, imunomodulação e apoptose (Arscott *et al.*, 2009).

Embora a relação entre a DPPIV/CD26 e a progressão tumoral já tenha sido amplamente estudada, a expressão desta enzima em diferentes tipos de tumores ainda é contraditória, apresentando níveis aumentados em alguns tumores e diminuídos em outros (Havre *et al.*, 2008; Beckenkamp *et al.*, 2016). Alguns estudos descrevem que a expressão da DPPIV/CD26 está associada com a malignidade tumoral, como descrito para neoplasias hematológicas (Sato *et al.*, 2005; Havre *et al.*, 2009), câncer colorretal (Pang *et al.*, 2010), mesotelioma maligno (Okamoto *et al.*, 2014), sarcoma de Ewing (Lu *et al.*, 2011), câncer de mama (Choi *et al.*, 2015), carcinoma urotelial (Liang *et al.*, 2017) e de tireóide (Lee *et al.*, 2017). Também tem sido descrita recentemente como um marcador de células tronco tumorais (Davies *et al.*, 2015). Por outro lado, diversos estudos indicam que a DPPIV/CD26 atua como um supressor tumoral, como demonstrado em câncer de ovário (Kajiyama *et al.*, 2002; Kikkawa *et al.*, 2003), próstata (Wesley *et al.*, 2005), não-pequenas células de pulmão (Wesley *et al.*, 2004), endometrial (Mizokami *et al.*, 2004), melanoma (Wesley *et al.*, 1999), neuroblastoma (Arscott *et al.*, 2009) e glioma (Busek *et al.*, 2012). Este assunto será abordado em detalhes no artigo de Revisão que consta no Capítulo I desta tese (Beckenkamp *et al.*, 2016).

I.5. DPPIV/CD26 como marcador tumoral

A presença de sDPPIV/sCD26 em fluidos biológicos está relacionada com a secreção ou extravasamento desta proteína por diferentes tipos celulares, especialmente pelos linfócitos T, porém ainda não se sabe se este processo é regulado ou não (Cordero *et al.*, 2009). Em alguns tipos celulares foi demonstrado que a liberação da sDPPIV/sCD26 ocorre através da clivagem desta proteína da membrana celular por metaloproteinases (Rohrbom *et al.*, 2014). Recentemente, diversos estudos tem demonstrado que a forma solúvel da DPPIV/CD26 apresenta-se como um promissor biomarcador em diferentes neoplasias.

Estudos demonstraram que pacientes com carcinoma colorretal apresentam elevados níveis desta enzima no soro quando comparados a

indivíduos saudáveis (de la Haba *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrado que pacientes com metástases apresentavam níveis ainda mais elevados de sDPPIV/sCD26. Assim, esta proteína tem seus níveis aumentados, de forma gradativa, acompanhando os estágios da doença, o que a caracteriza como um indicador de malignidade (Lam *et al.*, 2014). A presença de células tumorais DPPIV/CD26⁺ circulantes também foi associada ao pior prognóstico e maiores taxas de recorrência em pacientes com câncer colorretal (Lieto *et al.*, 2015).

Já em melanoma foi demonstrado que a perda de expressão de DPPIV/CD26 é um evento importante para o desenvolvimento deste tipo de câncer. Pacientes com melanoma apresentam baixa expressão desta proteína e reduzida atividade enzimática no soro (Roesch *et al.*, 2006; Matic *et al.*, 2012). Da mesma forma, pacientes com câncer de próstata metastático apresentam baixos níveis de atividade de sDPPIV/sCD26 quando comparados com pacientes com a doença localizada e indivíduos saudáveis (Nazarian *et al.*, 2014). A sDPPIV/sCD26 também já foi proposta como um marcador auxiliar no diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer de pulmão (Blanco-prieto *et al.*, 2015), gástrico (Boccardi *et al.*, 2015) e mesotelioma maligno (Fujimoto *et al.*, 2014).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstram uma redução na atividade enzimática da sDPPIV/sCD26 no plasma de pacientes com lesões de alto grau e câncer cervical, quando comparado com pacientes saudáveis (Borowicz *et al.*, dados não publicados). Considerando que a determinação da atividade enzimática da DPPIV/CD26 no soro de pacientes e a avaliação de sua expressão em células circulantes é um método simples, barato e minimamente invasivo, acredita-se que esta pode vir futuramente a se tornar uma importante ferramenta no diagnóstico de diferentes tipos de câncer.

I.6. DPPIV/CD26 como alvo terapêutico

Considerando que a DPPIV/CD26 cliva e inativa diferentes peptídeos biológicos ela vem sendo explorada como um importante alvo terapêutico em diferentes patologias. Tendo em vista que entre os substratos da DPPIV/CD26

encontram-se o GLP-1 (glucagon-like peptide) e GIP (glucose-dependent insulinotropic peptide), atualmente inibidores de DPPIV/CD26 são amplamente utilizados no tratamento da diabetes mellitus tipo 2 (Baggio *et al.*, 2007). Estas incretinas são liberadas pelo trato gastrointestinal em resposta à ingestão de alimentos e estimulam a secreção de insulina e a redução da liberação de glucagon. Desta forma, o uso de inibidores de DPPIV/CD26, conhecidos como gliptinas, constitui um importante alvo terapêutico para esta patologia, impedindo a degradação destes peptídeos pela DPPIV/CD26, permitindo que eles desempenhem suas funções controlando os níveis de glicose (Drucker *et al.*, 2010). Os inibidores sitagliptina e alogliptina são altamente seletivos para a inibição da DPPIV/CD26, enquanto que vildagliptina, saxagliptina e linagliptina são menos seletivos, inibindo também DPP8, DPP9 e FAP (Deacon *et al.*, 2011).

Tendo em vista a relação da DPPIV/CD26 com diferentes tipos de câncer, esta proteína vem sendo explorada como um possível alvo terapêutico para o tratamento desta doença. Estudos tem demonstrado que pacientes diabéticos com leucemia mielóide crônica que utilizam inibidores de DPPIV/CD26 apresentam maior sobrevida e redução nos níveis da oncoproteína BCR/ABL1 (Herrmann *et al.*, 2014). Além disso, foi descrito que o uso de vildagliptina pode reduzir a ocorrência de metástases em um modelo *in vivo* de camundongos com câncer colorretal (Jang *et al.*, 2015). Ainda foi demonstrado que a sitagliptina é capaz de reduzir a proliferação celular, a formação de colônias e a tumorigênese em modelos de câncer de mama (Choi *et al.*, 2015). Recentemente um estudo com carcinoma de tireóide revelou que o tratamento com sitagliptina é capaz de reduzir a formação de colônias, a migração e invasão, *in vitro*, bem como dificultar o crescimento tumoral *in vivo* (Lee *et al.*, 2017). O uso de anticorpos anti-DPPIV/CD26 também vem sendo avaliado, e em carcinoma renal, linfoma e mesotelioma maligno já foi demonstrado seus efeitos reduzindo o crescimento tumoral e aumentando a sobrevivência (Ho *et al.*, 2001; Ohnuma *et al.*, 2002; Inamoto *et al.*, 2006 e 2007; Angevin *et al.*, 2017).

II. Objetivos

Considerando o papel da DPPIV/CD26 na progressão tumoral em diferentes tipos de câncer e a necessidade da busca por novos biomarcadores e alvos terapêuticos para o tratamento do câncer cervical, este estudo tem como objetivo geral estudar o envolvimento da proteína DPPIV/CD26 no desenvolvimento do câncer cervical.

Assim, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Revisar a literatura relacionada ao papel da DPPIV/CD26 em diferentes tipos tumorais;
2. Analisar a expressão da DPPIV/CD26 em cultura de células de carcinoma cervical (SiHa, HeLa e C33A), em comparação com linhagem de queratinócitos imortalizados (HaCaT);
3. Padronizar a técnica e determinar a atividade enzimática da DPPIV/CD26 ligada à membrana e solúvel em culturas de células de carcinoma cervical e queratinócitos imortalizado;
4. Investigar o efeito do inibidor de DPPIV/CD26 (fosfato de sitagliptina) sobre os mecanismos de migração e adesão celular, em culturas de células de carcinoma cervical;
5. Avaliar a relação da DPPIV/CD26 com as oncoproteínas E6 e E7 do HPV;
6. Desenvolver plasmídeos contendo a sequência da DPPIV/CD26, em sua forma íntegra (wt) e mutada (mut), que possibilitem a indução da expressão desta proteína em linhagens celulares de carcinoma cervical;
7. Induzir a superexpressão de DPPIV/CD26 em células de carcinoma cervical (HeLa) e confirmar sua expressão e funcionalidade;
8. Após transfecção gênica, investigar o papel da expressão e atividade da DPPIV/CD26 em diferentes mecanismos tumorais, como proliferação, migração e adesão celular.

III. Artigos científicos

III. 1. CAPÍTULO 1 - Aline Beckenkamp, Samuel Davies, Júlia Biz Willig, Andréia Buffon. DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy?

O Capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 38 – 54.

Beckenkamp A, Davies S, Willig JB, Buffon A. DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? *Tumor Biol.* 2016 Jun; 37(6):7059-73. doi: 10.1007/s13277-016-5005-2.

III. 2. CAPÍTULO 2 - Aline Beckenkamp, Júlia Biz Willig, Danielle Bertodo Santana, Jéssica Nascimento, Juliano Domiraci Paccez, Luiz Fernando Zerbini, Alessandra Nejar Bruno, Diogo André Pilger, Márcia Rosângela Wink, Andréia Buffon. **Differential Expression and Enzymatic Activity of DPPIV/CD26 Affects Migration Ability of Cervical Carcinoma Cells.**

O Capítulo 2 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 56 – 78.

Beckenkamp A, Willig JB, Santana DB, Nascimento J, Paccez JD, Zerbini LF, Bruno AN, Pilger DA, Wink MR, Buffon A. Differential Expression and Enzymatic Activity of DPPIV/CD26 Affects Migration Ability of Cervical Carcinoma Cells. *Plos One*. 2015 Jul; 10 (7): e0134305.
doi: 10.1371/journal.pone.0134305.

III.3. CAPÍTULO 3 – Aline Beckenkamp, Bruna Prati, Silvy Stuchi Maria-Engler, Diogo André Pilger, Enrique Boccardo, Andréia Buffon. HPV16 E6 oncoprotein lead to DPPIV/CD26 downregulation in primary keratinocytes.

O texto completo do capítulo 3, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 80 – 98 foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da avaliação da relação da expressão da proteína DPPIV/CD26 com as oncoproteínas E6 e E7 do HPV, utilizando-se queratinócitos transduzidos com estes oncogenes. Por PCR e citometria de fluxo foi possível observar uma redução na expressão de DPPIV/CD26 quando foi induzida a expressão de E6 de HPV de alto risco em queratinócitos.

III.4. CAPÍTULO 4 – Aline Beckenkamp, Júlia Biz Willig, Franciele Cristina Kipper, Guido Lenz, Andréia Buffon. **DPPIV/CD26 overexpression inhibits cervical cancer cell growth.**

O texto completo do capítulo 4, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 100 – 124 foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da indução da expressão de DPPIV/CD26 em linhagem de câncer cervical e posterior avaliação dos efeitos desta proteína sobre diferentes mecanismos tumorais. Foi observada uma redução na proliferação de células expressando DPPIV/CD26, sugerindo que esta proteína pode atuar como um supressor tumoral no câncer cervical.

IV. Discussão Geral

Apesar da existência de métodos de prevenção primária ao câncer cervical, através da vacinação contra a infecção pelo HPV, e prevenção secundária pelo exame de Papanicolaou, para detectar lesões pré-cancerosas da cérvix uterina, o câncer cervical ainda é uma importante patologia que acomete um elevado número de mulheres no mundo todo (El-zein *et al.*, 2016). Então acreditamos que ainda se faz necessária a busca de novas técnicas que auxiliem no diagnóstico e tratamento desta doença.

A DPPIV/CD26 é uma proteína multifuncional que vem sendo amplamente estudada em diferentes tipos tumorais. O interesse no estudo desta proteína se deve às suas diferentes funções que se correlacionam com importantes processos biológicos implicados no câncer. Onde podemos destacar sua capacidade de clivar e modular a atividade de diferentes peptídeos biológicos (Cordero *et al.*, 2009), sua ação como proteína responsável por ancorar a ADA à superfície celular facilitando a degradação da adenosina (Dong *et al.*, 1997), sua ligação à proteínas da matriz extracelular (Cheng *et al.*, 2003) e sua interação com diferentes vias regulando proteínas relacionadas à tumorigênese (Havre *et al.*, 2008; Beckenkamp *et al.*, 2016).

Considerando que não existiam pesquisas relacionando o câncer de colo de útero com a DPPIV/CD26, nosso objetivo inicial foi determinar a expressão e atividade desta proteína em células de câncer cervical, em comparação com queratinócitos imortalizados. Para este estudo foram utilizadas linhagens de câncer cervical SiHa (contém cópias do HPV 16 incorporado ao seu genoma), HeLa (contém cópias do HPV 18 incorporado ao seu genoma) e C33A (não contém cópias do HPV), além disso como controle não tumoral foi utilizada a linhagem de queratinócitos imortalizados, HaCaT.

Inicialmente avaliamos a atividade enzimática da DPPIV/CD26 em células aderentes utilizando o substrato artificial Gli-Pro-p-nitroanilida. Observamos a formação de p-nitroanilina *in vitro* para todas as linhagens estudadas, indicando que estas células apresentam atividade enzimática dipeptidilpeptidásica, a qual se mostrou linear dentro de um período de incubação de 2 horas.

Tendo em vista a existência de outras enzimas com atividade semelhante a da DPPIV/CD26, avaliamos se a atividade determinada era realmente atribuída à ação desta enzima, através do uso de inibidores e diferentes condições de reação. Sabe-se que FAP apresenta baixa afinidade pelo substrato Gli-Pro-p-nitroanilida. DPP8 e DPP9 são enzimas citoplasmáticas e não existem evidências de que sejam secretadas. Por outro lado, sabe-se que a DPP2 pode ser secretada para o meio extracelular (Gorrell *et al.*, 2005). Para excluir a atividade de DPP8 e DPP9 utilizamos o inibidor enzimático N-Etilmaleimida (NEM), e para eliminar a ação da DPP2, que é ativa em pH ácido, utilizamos tampão TE com pH=8 (Yu *et al.*, 2009). Ainda utilizamos o inibidor da DPPIV/CD26, fosfato de sitagliptina. Assim, padronizamos a determinação específica da atividade da DPPIV/CD26 em monocamada de células, que pode ser determinada em temperatura ambiente e pH=8, tendo em vista que em pH= 7,4 a 37°C, parece haver uma ação conjunta da DPPIV/CD26 e DPP2. DPP8 e DPP9 não demonstraram atividade enzimática em células íntegras em monocamada. As células de câncer cervical demonstraram atividades enzimáticas inferiores à linhagem não tumoral (HaCaT). Mas em geral a atividade da DPPIV/CD26 nestas células pode ser considerada baixa.

Considerando a existência da forma solúvel desta enzima, avaliamos a atividade enzimática no sobrenadante após 1 hora de contato do meio com as células aderentes. Foi observada atividade da sDPPIV/sCD26 no sobrenadante de todas as linhagens. Assim, foi demonstrada uma importante atividade da sDPPIV/sCD26 após um curto período de liberação desta enzima para o sobrenadante da cultura celular. A sDPPIV/sCD26 representa atualmente um promissor biomarcador para diferentes tipos de câncer (Cordero *et al.*, 2011). Estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa apontam para uma atividade reduzida da sDPPIV/sCD26 no plasma de pacientes com câncer cervical, quando comparado com indivíduos saudáveis (Borowicz *et al.*, dados não publicados).

A fim de avaliar o perfil de expressão da DPPIV/CD26 entre as diferentes linhagens celulares foram realizadas as técnicas de *real time* PCR e citometria de fluxo. Verificou-se uma baixa expressão de DPPIV/CD26 nas

linhagens celulares estudadas, sendo que entre estas, as linhagens HaCaT e SiHa apresentaram maior expressão de DPPIV/CD26, seguidas da C33A e na linhagem HeLa esta expressão foi praticamente indetectável, tanto à nível de RNAm quanto de proteína. Os níveis de expressão da DPPIV/CD26 se correlacionaram com a atividade enzimática observada nestas células.

Sendo assim, 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 (Beckenkamp *et al.*, 2015). Recentemente Liu e colaboradores demonstraram que a DPPIV/CD26 é expressa em baixos níveis e encontra-se hipermetilada em amostras de pacientes com câncer cervical (Liu *et al.*, 2016).

Tendo em vista a baixa expressão de DPPIV/CD26 em linhagens celulares (Beckenkamp *et al.*, 2016) e pacientes com câncer cervical (Liu *et al.*, 2016), e que a infecção pelo HPV é um fator determinante para o desenvolvimento deste tipo tumoral, nosso próximo objetivo foi avaliar se existe alguma relação entre a expressão de DPPIV/CD26 e a expressão das oncoproteínas E6 e E7 do HPV.

O HPV é considerado como um agente etiológico do câncer cervical. Porém, sabe-se que a infecção pelo HPV é um fator necessário, mas não suficiente, para o desenvolvimento deste tipo de câncer (zur Hausen *et al.*, 2009). Os genótipos de HPV são classificados como de alto ou baixo risco, de acordo com seu potencial oncogênico. A infecção persistente por HPV de alto risco, com integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, leva a uma superexpressão das oncoproteínas E6 e E7, as quais são as principais responsáveis pela transformação celular (McLaughlin-Drubin *et al.*, 2009).

A oncoproteína E6 leva à degradação e inativação do produto do gene supressor de tumor p53, via ligação à E6AP, inibindo a apoptose, e E7 inibe a proteína do retinoblastoma (pRb), a qual inibe a progressão do ciclo celular (Dyson *et al.*, 1989; Werness *et al.*, 1990). Desta forma, ocorre a inibição da atividade pró-apoptótica e a progressão do ciclo celular, e as células com DNA danificado podem replicar.

Nosso estudo demonstrou que queratinócitos expressando a oncoproteína E6 de HPV de alto risco apresentam uma expressão reduzida de DPPIV/CD26, à nível de RNAm e proteína, quando comparados com queratinócitos controle (transduzidos com o vetor vazio). Por outro lado, a expressão da oncoproteína E7 não apresentou efeito sobre os níveis de DPPIV/CD26.

Apesar de todos os tipos de HPV possuírem genes E6 e E7 homólogos, estes não são idênticos. Assim, as proteínas virais E6 e E7 de HPVs de baixo risco possuem baixa afinidade de ligação à p53 e pRb, respectivamente. Desta forma E6 não é capaz de degradar p53, e E7 não induz a desestabilização de pRb (Gage *et al.*, 1990; Werness *et al.*, 1990; Munger *et al.*, 2004). Os HPVs de baixo risco causam lesões benignas, como condilomas (verrugas), que afetam a região anogenital.

Tendo em vista a relação observada entre a DPPIV/CD26 e a oncoproteína E6, e sabendo que esta atua principalmente via degradação de p53, investigamos o envolvimento desta via na regulação da expressão de DPPIV/CD26. Para isto utilizamos queratinócitos expressando as oncoproteínas de HPV de baixo risco, que como descrito acima, apresentam baixa afinidade de ligação à p53 e pRb (Guess e McCance 2005). E também utilizamos uma forma mutada de E6 de HPV de alto risco caracterizada pela deleção de cinco aminoácidos (Δ 118-122) no segundo dedo de zinco. Esta alteração em uma região funcionalmente importante confere a perda da capacidade de ligação e degradação de p53 (Foster *et al.*, 1994).

Foi possível observar que queratinócitos transduzidos tanto com a oncoproteína E6 de HPV de baixo risco, quanto com a E6 mutada, não apresentaram alteração na expressão de DPPIV/CD26. Sendo assim, podemos inferir que a degradação da p53 pela E6 é um processo necessário para a regulação negativa da DPPIV/CD26 nestas células. Até o momento nenhum estudo havia descrito a relação entre a DPPIV/CD26 e p53. Neste trabalho pudemos observar uma correlação positiva entre estas duas proteínas relacionadas à carcinogênese.

Ainda avaliamos a expressão de DPPIV/CD26 em um modelo de cultura organotípica, onde a proliferação e diferenciação celular ocorrem de uma forma muito semelhante àquela que acontece no epitélio escamoso, constituindo uma ferramenta muito interessante para o estudo da carcinogênese. Observamos que culturas organotípicas de queratinócitos expressando as oncoproteínas E6E7 de HPV de alto risco apresentam reduzida expressão de DPPIV/CD26. Nestas culturas também foi possível observar alterações celulares como coilocitose, figuras de mitose e padrão alterado de diferenciação do epitélio, que são também características de neoplasias intraepiteliais cervicais observadas *in vivo*.

Desta forma, estes resultados indicam que a oncoproteína E6 de HPV de alto risco regula negativamente a expressão de DPPIV/CD26, por uma via dependente da degradação de p53. Este achado pode explicar, ao menos em parte, a baixa expressão de DPPIV/CD26 encontrada em pacientes e células de câncer cervical, tendo em vista a importância da infecção pelo HPV e expressão de suas oncoproteínas para o desenvolvimento deste tipo tumoral.

Apesar destes estudos demonstrarem a baixa expressão de DPPIV/CD26 no câncer cervical, até o momento o papel desta proteína ainda não foi investigado neste tipo de câncer. Sendo assim, nosso próximo objetivo foi induzir a expressão de DPPIV/CD26 em células de câncer cervical para posterior avaliação dos efeitos desta proteína. Para isto construímos plasmídeos contendo a sequência codificante da DPPIV/CD26, tanto em sua forma íntegra (wt) quanto na forma mutada (mut), induzida pela substituição do resíduo de serina na posição 630 por alanina.

Para a construção do plasmídeo foi utilizado um vetor lentiviral apropriado para transdução gênica (pLR2). O pLR2 contém a sequência da proteína verde fluorescente (GFP) como gene repórter (Vargas *et al.*, 2012). A inserção da sequência da DPPIV/CD26 ao pLR2 foi confirmada através da clivagem dos plasmídeos com enzimas de restrição e por sequenciamento de DNA. Neste último ensaio também foi possível confirmar a mutação S630A no plasmídeo pLR2CD26mut.

Células da linhagem HeLa, a qual apresentou níveis quase indetectáveis de DPPIV/CD26, foram transfectadas com os plasmídeos construídos. Após transfecção foi possível observar células GFP⁺, confirmando a eficiência do processo. O pico de expressão foi determinado e demonstrou ocorrer após 48 horas do momento da transfecção. A expressão da DPPIV/CD26 à nível de RNAm foi confirmada por RT-PCR e sua expressão na superfície celular foi verificada por citometria de fluxo. Além disso, as células transfectadas com pLR2CD26wt apresentaram um aumento significativo na atividade enzimática desta proteína, o que não foi observado em células transfectadas com pLR2CD26mut, confirmando o efeito da mutação S630A da DPPIV/CD26. Sendo assim, confirmamos a funcionalidade dos plasmídeos construídos.

A indução da expressão de DPPIV/CD26 de forma estável, realizada por transdução gênica empregando o uso de lentivírus não foi alcançada com êxito devido à baixa eficiência de transdução (provavelmente devido à dificuldade de empacotamento dos plasmídeos, tendo em vista seu tamanho de 10.496pb). Além disso, mesmo após a purificação das células transduzidas, por *sorting*, ainda foi observada uma população mista, contendo células GFP⁺ e GFP⁻. Ao longo da expansão destas células foi observada uma redução do percentual GFP⁺, o que pode ser devido à redução na proliferação celular causada pela DPPIV/CD26 (dados não mostrados).

Inicialmente observamos que células HeLa transfectadas com a sequência da DPPIV/CD26 apresentavam um reduzido crescimento celular quando comparadas com células controle transfectadas com o vetor vazio (pLR2). Além da redução na contagem de células expressando DPPIV/CD26, observamos uma dificuldade na formação de novos clones e uma menor expressão do marcador de proliferação celular, Ki67, nestas células.

Da mesma forma, um estudo utilizando células de carcinoma endometrial com expressão induzida de DPPIV/CD26 demonstrou uma redução na taxa de proliferação, acompanhada pela diminuição nos níveis de SDF-1, indicando a importância da atividade catalítica da DPPIV/CD26 no processo de proliferação celular (Mizokami *et al.*, 2004). Porém, tendo em vista que nos nossos experimentos utilizando células expressando a forma mutada

da DPPIV/CD26 (S630A) desprovida de atividade serina protease também encontramos uma redução na proliferação celular, acreditamos que mecanismos não proteolíticos devem contribuir para este efeito da DPPIV/CD26. De acordo com este achado, em diferentes estudos a expressão da forma mutada da DPPIV/CD26 demonstrou resultados semelhantes aos encontrados quando a expressão de DPPIV/CD26 “wild-type” foi induzida (Wesley *et al.*, 2004; Busek *et al.*, 2012).

Tendo em vista que estudos demonstram que a expressão da DPPIV/CD26 está relacionada com o processo de migração celular (Kajiyama *et al.*, 2002; Wesley *et al.*, 2005; Arscott *et al.*, 2009; Busek *et al.*, 2012), inicialmente avaliamos este parâmetro nas linhagens SiHa e HeLa, as quais apresentaram maior e menor expressão desta enzima, respectivamente, dentre as linhagens de câncer cervical estudadas (capítulo 2). Pelo ensaio de *Wound-healing* pudemos observar um aumento significativo da migração celular na linhagem SiHa na presença do inibidor específico da DPPIV/CD26 (fosfato de sitagliptina). Estes dados nos permitiram inferir que a migração celular nesta linhagem é ao menos em parte influenciada pela atividade da DPPIV/CD26 (Beckenkamp *et al.*, 2015).

A migração e invasão celular são facilitadas por quimiocinas, como o SDF-1, substrato que é clivado e inativado pela DPPIV/CD26. Um estudo com células de neuroblastoma demonstrou uma redução significativa no potencial de migração quando foi induzido um aumento na expressão da DPPIV/CD26. E 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), corroborando os resultados encontrados no nosso estudo para a linhagem SiHa. Além disso, células de neuroblastoma com expressão induzida de DPPIV/CD26 apresentaram redução dos níveis de SDF-1 e na expressão do receptor CXCR4 (Arscott *et al.*, 2009).

Porém, avaliando a migração em células HeLa com expressão induzida de DPPIV/CD26 não encontramos modificações neste parâmetro celular em comparação com o controle transfectado com o vetor vazio (pLR2). Sendo assim, na linhagem HeLa a expressão da DPPIV/CD26 não parece estar

relacionada com a migração celular (capítulo 4). Porém, uma limitação deste ensaio foi a baixa taxa de migração observada em todas as células transfectadas durante o período avaliado. Além disso, observamos que esta linhagem celular não expressa SDF-1. Isto pode justificar o fato desta proteína não influenciar na migração celular, pois o substrato não está disponível no meio celular. Porém, apesar de células HeLa não expressarem SDF-1, elas apresentam elevada expressão gênica do receptor CXCR4, a qual não foi afetada pela indução na expressão de DPPIV/CD26. Um estudo demonstrou que a adição exógena de SDF-1 em células HeLa levou a um aumento na migração celular (Dillenburg-Pilla *et al.*, 2015). Sendo assim, o ideal seria realizar o ensaio de migração celular na presença deste substrato, a fim de confirmar a importância da DPPIV/CD26 na migração celular.

A DPPIV/CD26 também está envolvida na transição epitelial-mesenquimal, regulando a expressão de marcadores como E-caderina, N-caderina, slug, twist e vimentina, além de metaloproteinases (MMPs), que se relacionam à invasão tumoral (Kajiyama *et al.*, 2003; Pang *et al.*, 2010; Beckenkamp *et al.*, 2016). Ao avaliar a expressão gênica de marcadores de transição epitelial-mesenquimal, E-caderina e N-caderina, em células expressando DPPIV/CD26 não foi observada diferença significativa quando comparado com células não transfectadas e transfectadas com o vetor vazio. Além disso, destacamos que células HeLa apresentam uma expressão muito baixa de E-caderina e uma maior expressão de N-caderina, indicando características mesenquimais. Ainda avaliamos a expressão de MMP2 e MMP9, onde também não encontramos diferença significativa em relação à expressão de DPPIV/CD26. Notamos que células HeLa apresentam expressão de MMP2, porém não expressam MMP9.

Foi demonstrado que um dos principais mecanismos pelo qual a DPPIV/CD26 regula o processo neoplásico está envolvido com sua modulação sobre a expressão de diversas proteínas relacionadas à adesão celular, como E-caderina, β -catenina, integrina β 1, versican, periostina e CD44. Além disso, a DPPIV/CD26 interage com proteínas da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina, apresentando relação com a adesão celular (Cheng *et al.*, 2003).

Avaliando a adesão de células das linhagens SiHa e HeLa observamos uma diminuição significativa deste processo quando foram incubadas na presença do inibidor seletivo da DPPIV/CD26 (capítulo 2). Porém, como a linhagem HeLa apresenta baixa atividade e expressão desta proteína e também teve a adesão reduzida na presença do inibidor, estes achados sugerem que o fosfato de sitagliptina afeta a adesão por algum mecanismo independente da DPPIV/CD26. Sendo assim, também não se descarta a possibilidade de o efeito do fosfato de sitagliptina sobre a migração celular na linhagem SiHa ser independente desta proteína. Além disso, células HeLa transfectadas com a sequência da DPPIV/CD26 não apresentaram diferença na adesão celular, nem ao plástico, e nem à matrizes extracelulares (colágeno e fibronectina) em relação à células transfectadas com o vetor vazio (capítulo 4).

Entre as funções da DPPIV/CD26 também se destaca o seu papel como a principal proteína responsável por ancorar a ADA à superfície celular, facilitando o metabolismo da adenosina a inosina (Dong *et al.*, 1997). Em determinados tipos de câncer é observada baixa expressão de DPPIV/CD26, com conseqüente redução na atividade da ADA (Lefort *et al.*, 2011). Assim, a adenosina acumula e atua favorecendo a angiogênese, estimulando a motilidade e crescimento celular, suprimindo o sistema imunológico e facilitando a sobrevivência de tumores (Mujoomdar *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2004). Além disso, foi descrito que a adenosina regula negativamente a expressão de DPPIV/CD26 em células de câncer colorretal, desta forma ocorre uma redução na atividade intrínseca da DPPIV/CD26, na ligação à ADA e na interação com proteínas da matriz extracelular, facilitando ainda mais os efeitos da adenosina e de quimiocinas que acumulam no microambiente tumoral (Tan *et al.*, 2004).

Neste estudo demonstramos que células HeLa com expressão induzida de DPPIV/CD26 apresentaram um aumento estatisticamente significativo na expressão e atividade de ADA. Apesar de a expressão e atividade quase duplicar nestas células, este efeito não deve ser considerado significativo biologicamente, pois a expressão e atividade desta proteína nesta linhagem são praticamente indetectáveis, permanecendo em níveis muito baixos mesmo

após a expressão de DPPIV/CD26. Mas este achado indica uma correlação positiva entre a DPPIV/CD26 e ADA, corroborando os achados descritos em células de câncer colorretal (Tan *et al.*, 2004).

A DPPIV/CD26 é uma proteína multifuncional, que pode atuar como um supressor tumoral ou como um marcador de agressividade, dependendo da localização do tumor, do tipo celular e do microambiente tumoral. Nossos resultados indicam uma redução na expressão da DPPIV/CD26 durante a progressão do câncer cervical, a qual parece estar relacionada à expressão da oncoproteína E6 de HPV de alto risco, e à degradação de p53. Além disso, este estudo apresenta evidências que apontam para o papel da DPPIV/CD26 como um supressor tumoral no câncer cervical, levando a uma redução no crescimento celular. Sendo assim, acreditamos que esta proteína possa vir a se tornar um biomarcador e um possível alvo terapêutico para o câncer cervical.

V. Conclusões gerais

Os resultados apresentados nesta tese permitem as seguintes conclusões:

1. Os estudos relacionando a DPPIV/CD26 com a carcinogênese são controversos, existindo aqueles que atribuem à DPPIV/CD26 um papel de gene supressor tumoral, e por outro lado temos os que relacionam esta proteína como um marcador de agressividade tumoral;
2. As linhagens celulares de câncer cervical apresentam baixa atividade enzimática da DPPIV/CD26. Esta proteína está ativa tanto na forma ligada à membrana celular quanto na forma solúvel, presente no sobrenadante celular;
3. A expressão gênica e proteica da DPPIV/CD26 demonstrou ser mais elevada nas linhagens HaCaT e SiHa, seguidas pela C33A, e na HeLa esta expressão foi praticamente indetectável;
4. A migração celular na linhagem SiHa parece estar relacionada à atividade da DPPIV/CD26, tendo em vista que na presença de seu inibidor (fosfato de sitagliptina) foi observado um aumento na capacidade de migração destas células;
5. O fosfato de sitagliptina foi capaz de reduzir a adesão celular em linhagens SiHa e HeLa, porém acreditamos que este efeito ocorra de forma independente da DPPIV/CD26;
6. A redução da expressão da DPPIV/CD26 durante a progressão do câncer cervical parece estar associada à expressão da oncoproteína E6 de HPV de alto risco, e à degradação de p53;
7. Foi possível induzir a superexpressão da DPPIV/CD26 em linhagem de câncer cervical utilizando os plasmídeos construídos;
8. A DPPIV/CD26 parece atuar como um supressor tumoral na linhagem HeLa, onde demonstramos que a indução da expressão desta proteína encontra-se associada à uma redução na proliferação celular;
9. A indução da expressão de DPPIV/CD26 não afetou os processos de migração e adesão celular na linhagem HeLa;
10. Verificamos uma correlação positiva entre a DPPIV/CD26 e a ADA.

VI. Referências

- ANGEVIN, E.; ISAMBERT, N.; TRILLET-LENOIR, V.; YOU, B.; ALEXANDRE, J.; ZALCMAN, G.; et al. First-in-human phase 1 of YS110, a monoclonal antibody directed against CD26 in advanced CD26-expressing cancers. *British journal of cancer*, v.116, p. 1126-34, 2017.
- ANTONIOLI, L.; BLANDIZZI, C.; PACHER, P.; HASKO, G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*, v.13, p. 842-857, 2013
- 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.
- BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, v.132, p. 2131-2157, 2007.
- BECKENKAMP, A.; WILLIG, J. B.; SANTANA, D. B.; NASCIMENTO, J.; PACCEZ, J. D.; ZERBINI, L. F.; BRUNO, A. N.; PILGER, D. A.; WINK, M. R.; BUFFON, A. Differential Expression and Enzymatic Activity of DPP/IV/CD26 Affects Migration Ability of Cervical Carcinoma Cells. *PLoS One*, v.10, e0134305, 2015.
- BECKENKAMP, A.; DAVIES, S.; WILLIG, J. B.; BUFFON, A. DPP/IV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? *Tumour Biol.*, 2016
- BJELKE, J. R.; CHRISTENSEN, J.; BRANNER, S.; WAGTMANN, N.; OLSEN, C.; KANSTRUP, A. B.; RASMUSSEN, H. B. Tyrosine 547 constitutes an essential part of the catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem*, v.279, p. 34691-34697, 2004.
- BLANCO-PRIETO, S.; VAZQUEZ-IGLESIAS, L.; RODRIGUEZ-GIRONDO, M.; BARCIA-CASTRO, L.; FERNANDEZ-VILLAR, A.; BOTANA-RIAL, M. I.; RODRIGUEZ-BERROCAL, F. J.; DE LA CADENA, M. P. Serum calprotectin, CD26 and EGF to establish a panel for the diagnosis of lung cancer. *PLoS One*, v.10, e0127318, 2015.
- BLAY, J. CD26/DPP/IV in Cancer Progression and Spread. *Encyclopedia of Cancer*. M. Schwab. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: p. 541-544, 2009.
- BOCCARDI, V.; MARANO, L.; ROSSETTI, R. R.; RIZZO, M. R.; DI MARTINO, N.; PAOLISSO, G. Serum CD26 levels in patients with gastric cancer: a novel potential diagnostic marker. *BMC Cancer*, v.15, p. 703, 2015.
- BOONACKER, E.; VAN NOORDEN, C. J. The Multifunctional or Moonlighting Protein CD26/DPP/IV. *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.738-747, 2012.
- CAVALLARO, S. CXCR4/CXCL12 in Non-Small-Cell Lung Cancer Metastasis to the Brain. *Int J Mol Sci*, v.14, p. 1713-1727, 2013.
- CHELLAPPAN, S.; KRAUS, V. B.; KROGER, B.; MUNGER, K.; HOWLEY, P. M.; PHELPS W. C.; NEVINS, J. R. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.89, p. 4549-53, 1992.
- 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.24600-24607, 2003.

- CHOI, H. J.; KIM, J. Y.; LIM, S. C.; KIM, G.; YUN, H. J.; CHOI, H. S. Dipeptidyl peptidase 4 promotes epithelial cell transformation and breast tumourigenesis via induction of PIN1 gene expression. *British journal of pharmacology*, v.172, p. 5096-109, 2015.
- CLIFFORD, G. M.; SMITH, J. S.; PLUMMER, M.; MUNOZ, N.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br. J. Cancer*, v.88, p. 63–73, 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.1723-1747, 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.245-261, 2011.
- D'AGOSTINO, G.; KIM, J. D.; LIU, Z. W.; JEONG, J. K.; SUYAMA, S.; CALIGNANO, A.; GAO, X. B.; SCHWARTZ, M.; DIANO, S. Prolyl endopeptidase-deficient mice have reduced synaptic spine density in the CA1 region of the hippocampus, impaired LTP, and spatial learning and memory. *Cereb Cortex*, v.23, p. 2007-2014, 2013.
- DAVIES, S.; BECKENKAMP, A.; BUFFON, A. CD26 a cancer stem cell marker and therapeutic target. *Biomed Pharmacother*, v.71, p. 135-138, 2015.
- DE LA HABA-RODRIGUEZ, J.; MACHO, A.; CALZADO, M. A.; BLAZQUEZ, M. V.; GOMEZ, M. A.; MUNOZ, E. E.; ARANDA, E. Soluble dipeptidyl peptidase IV (CD-26) in serum of patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma*, v.49, p. 307-311, 2002.
- DEACON, C. F. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review. *Diabetes Obes Metab*, v.13, p. 7-18, 2011.
- DIANO, S. New aspects of melanocortin signaling: a role for PRCP in alpha-MSH degradation. *Front Neuroendocrinol*, v.32, p. 70-83, 2011.
- DILLENBURG-PILLA, P.; PATEL, V.; MIKELIS, C. M.; ZARATE-BLADES, C. R.; DOCI, C. L.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; et al. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/Galphai/mTORC1 axis. *FASEB journal*, v.29, p.1056-68, 2015.
- 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.
- DRUCKER, D. J.; SHERMAN, S. I.; GORELICK, F. S.; BERGENSTAL, R. M.; SHERWIN, R. S.; BUSE, J. B. Incretin-based therapies for the treatment of type 2 diabetes: evaluation of the risks and benefits. *Diabetes Care*, v.33, p. 428-433, 2010.
- DYSON, N.; HOWLEY, P. M.; MÜNGER, K.; HARLOW, E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, v.243, p. 934–937, 1989.
- EL-ZEIN, M.; RICHARDSON, L.; FRANCO, E. L. Cervical Cancer Screening of HPV Vaccinated Populations: Cytology, Molecular Testing, Both or None. *J Clin Virol*, v.76, p.62-8, 2016.

- FOSTER, S. A.; DEMERS, G. W.; ETSCHIED, B. G.; GALLOWAY, D. A. The Ability of Human Papillomavirus E6 Proteins to Target P53 for Degradation in Vivo Correlates with Their Ability to Abrogate Actinomycin D-Induced Growth Arrest. *J Virol*, v.68, p.5698-705, 1994.
- 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. 283-294, 1997.
- FUJIMOTO, N.; OHNUMA, K.; AOE, K.; HOSONO, O.; YAMADA, T.; KISHIMOTO, T.; MORIMOTO, C. Clinical significance of soluble CD26 in malignant pleural mesothelioma. *PLoS One*, v.9, e115647, 2014.
- GAGE, J. R.; MEYERS, C.; WETTSTEIN, F. O. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *Journal of virology*, v.64, p. 723-30, 1990.
- GORRELL, M. D. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond)*, v.108, p. 277-292, 2005.
- GUESS, J. C.; MCCANCE, D. J. Decreased Migration of Langerhans Precursor-Like Cells in Response to Human Keratinocytes Expressing Human Papillomavirus Type 16 E6/E7 Is Related to Reduced Macrophage Inflammatory Protein-3alpha Production. *J Virol*, v.79, p.14852-62, 2005.
- HAMSON, E. J.; KEANE, F. M.; THOLEN, S.; SCHILLING, O.; GORRELL, M. D. Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. *Proteomics Clinical applications*, v.8, p. 454-63, 2014.
- 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.
- HAVRE, P. A.; ABE, M.; URASAKI, Y.; OHNUMA, K.; MORIMOTO, C.; DANG, N. H. CD26 expression on T cell lines increases SDF-1-alpha-mediated invasion. *Br J Cancer*, v.101, p. 983-991, 2009.
- 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.19532-19539, 2001.
- HERRMANN, H.; SADOVNIK, I.; CERNY-REITERER, S.; RULICKE, T.; STEFANZL, G.; WILLMANN, M. Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood*, v.123, p. 3951-3962, 2014.
- HO, L.; AYTAC, U.; STEPHENS, L. C.; OHNUMA, K.; MILLS, G. B.; MCKEE, K. S.; NEUMANN, C. In vitro and in vivo antitumor effect of the anti-CD26 monoclonal antibody 1F7 on human CD30+ anaplastic large cell T-cell lymphoma Karpas 299. *Clin Cancer Res*, v.7, p. 2031-2040, 2001.
- HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, v.384, p. 324-34, 2009.
- INAMOTO, T.; YAMOCHI, T.; OHNUMA, K.; IWATA, S.; KINA, S.; INAMOTO, S.; TACHIBANA, M.; KATSUOKA, Y.; DANG, N. H.; MORIMOTO, C. Anti-CD26 monoclonal antibody-mediated G1-S arrest of human renal clear cell carcinoma Caki-2 is associated with retinoblastoma substrate dephosphorylation, cyclin-dependent kinase 2 reduction, p27(kip1) enhancement, and disruption of binding to the extracellular matrix. *Clin Cancer Res*, v.12, p. 3470-3477, 2006.

- INAMOTO, T.; YAMADA, T.; OHNUMA, K.; KINA, S.; TAKAHASHI, N.; YAMOCHI, T.; INAMOTO, S.; KATSUOKA, Y.; HOSONO, O.; TANAKA, H.; DANG, N. H.; MORIMOTO, C. Humanized anti-CD26 monoclonal antibody as a treatment for malignant mesothelioma tumors. *Clin Cancer Res*, v.13, p. 4191-4200, 2007.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>>. Acesso em: 29 jun. 2017.
- JANG, J. H.; BAERTS, L.; WAUMANS, Y.; DE MEESTER, I.; YAMADA, Y.; LIMANI, P.; GILBAZO, I.; WEDER, W.; JUNGRAITHMAYR, W. Suppression of lung metastases by the CD26/DPP4 inhibitor Vildagliptin in mice. *Clin Exp Metastasis*, v.32, p. 677-687, 2015.
- JANICEK, M. F.; AVERETTE, H. E. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA: a cancer journal for clinicians*, v.51, p. 92-114, 2001.
- 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.
- KIKKAWA, F.; KAJIYAMA, H.; INO, K.; SHIBATA, K.; MIZUTANI, S. Increased adhesion potency of ovarian carcinoma cells to mesothelial cells by overexpression of dipeptidyl peptidase IV. *Int J Cancer*, v.105, p. 779-783, 2003.
- KIRBY, M.; YU, D. M.; O'CONNOR, S.; GORRELL, M. D. Inhibitor selectivity in the clinical application of dipeptidyl peptidase-4 inhibition. *Clin Sci (Lond)*, v.118, p. 31-41, 2010.
- 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. 987-995, 2007.
- LAM, C. S.; CHEUNG, A. H.; WONG, S. K.; WAN, T. M.; NG, L.; CHOW, A. K.; CHENG, N. S. Prognostic significance of CD26 in patients with colorectal cancer. *PLoS One*, v.9, e98582, 2014.
- 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.29839-29845, 2001.
- LEE, J. J.; WANG, T. Y.; LIU, C. L.; CHIEN, M. N.; CHEN, M. J.; HSU, Y. C.; LEUNG, C. H.; CHENG, S. P. Dipeptidyl peptidase IV as a prognostic marker and therapeutic target in papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2017.
- LEFORT, E. C.; BLAY, J. The dietary flavonoid apigenin enhances the activities of the anti-metastatic protein CD26 on human colon carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*, v.28, p. 337-349, 2011.
- LIANG, P. I.; YE, B. W.; LI, W. M.; CHAN, T. C.; CHANG, I. W.; HUANG, C. N.; et al. DPP4/CD26 overexpression in urothelial carcinoma confers an independent prognostic impact and correlates with intrinsic biological aggressiveness. *Oncotarget*, v.8, p. 2995-3008, 2017.
- LIETO, E.; GALIZIA, G.; ORDITURA, M.; ROMANO, C.; ZAMBOLI, A.; CASTELLANO, P.; MABILIA, A.; AURICCHIO, A. CD26-positive/CD326-negative circulating cancer cells as prognostic markers for colorectal cancer recurrence. *Oncol Lett*, v.9, p. 542-550, 2015.

- LIU, M. Y.; ZHANG, H.; HU, Y. J.; CHEN, Y. W.; ZHAO, X. N. Identification of Key Genes Associated with Cervical Cancer by Comprehensive Analysis of Transcriptome Microarray and Methylation Microarray. *Oncol Lett*, v.12, p.473-78, 2016.
- LU, C.; TILAN, J. U.; EVERHART, L.; CZARNECKA, M.; SOLDIN, S. J.; MENDU, D. R.; JEHA, D.; HANAFY, J.; LEE, C. K.; SUN, J.; IZYCKA-SWIESZEWSKA, E.; TORETSKY, J. A.; KITLINSKA, J. Dipeptidyl peptidases as survival factors in Ewing sarcoma family of tumors: implications for tumor biology and therapy. *J Biol Chem*, v.286, p. 27494-27505, 2011.
- 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.
- MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MUNGER, K. Oncogenic Activities of Human Papillomaviruses. *Virus Res*, v.143, p.195-208, 2009.
- MENTLEIN, R.; STRUCKHOFF, G. Purification of two dipeptidyl aminopeptidases II from rat brain and their action on proline-containing neuropeptides. *J Neurochem*, v.52, p. 1284-1293, 1989.
- MIZOKAMI, Y.; KAJIYAMA, H.; SHIBATA, K.; INO, K.; KIKKAWA, F.; MIZUTANI, S. Stromal cell-derived factor-1alpha-induced cell proliferation and its possible regulation by CD26/dipeptidyl peptidase IV in endometrial adenocarcinoma. *Int J Cancer*, v.110, p. 652-659, 2004.
- 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. 429-438, 2004.
- MUKHERJEE, D.; ZHAO, J. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res*, v.3, p. 46-57, 2013.
- MUNGER, K.; BALDWIN, A.; EDWARDS, K. M.; HAYAKAWA, H.; NGUYEN, C. L.; OWENS, M.; GRACE, M.; HUH, K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of virology*, v.78, p. 11451-60, 2004.
- MUNOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J.; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, v.348, p. 518-527, 2003.
- NAZARIAN, A.; LAWLOR, K.; YI, S. S.; PHILIP, J.; GHOSH, M.; YANEVA, M.; VILLANUEVA, J.; SAGHATELIAN, A.; ASSEL, M.; VICKERS, A. J. Inhibition of circulating dipeptidyl peptidase 4 activity in patients with metastatic prostate cancer. *Mol Cell Proteomics*, v.13, p. 3082-3096, 2014.
- ODYA, C. E.; MARINKOVIC, D. V.; HAMMON, K. J.; STEWART T. A.; ERDOS, E. G. Purification and properties of prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) from human kidney. *J Biol Chem*, v.253, p. 5927-5931, 1978.
- OHNUMA, K.; ISHII, T.; IWATA, S.; HOSONO, O.; KAWASAKI, H.; UCHIYAMA, M.; TANAKA, H.; YAMOCHI, T.; DANG, N. H.; MORIMOTO, C. G1/S cell cycle arrest provoked in human T cells by antibody to CD26. *Immunology*, v.107, p. 325-333, 2002.
- OKAMOTO, T.; IWATA, S.; YAMAZAKI, H.; HATANO, R.; KOMIYA, E.; DANG, N. H.; OHNUMA, K.; MORIMOTO, C. CD9 negatively regulates CD26 expression and inhibits CD26-mediated enhancement of invasive potential of malignant mesothelioma cells. *PLoS One*, v.9, e86671, 2014.

- 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. 603-615, 2010.
- PONTILLO, A.; BRICHER, P.; LEAL, V.; LIMA, S.; SOUZA, P.; CROVELLA, S. Contribution of inflammasome genetics in susceptibility to HPV infection and cervical cancer development. *J Med Virol*, 2016.
- 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.
- 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.
- ROESCH, A.; WITTSCHIER, S.; BECKER, B.; LANDTHALER, M.; VOGT, T. Loss of dipeptidyl peptidase IV immunostaining discriminates malignant melanomas from deep penetrating nevi. *Mod Pathol*, v.19, p. 1378-1385, 2006.
- ROHRBORN, D.; ECKEL, J.; SELL, H. Shedding of dipeptidyl peptidase 4 is mediated by metalloproteases and up-regulated by hypoxia in human adipocytes and smooth muscle cells. *FEBS Lett*, v.588, p. 3870-3877, 2014.
- RUTTKAY-NEDECKY, B.; JIMENEZ JIMENEZ A. M.; NEJDL, L.; CHUDOBOVA, D.; GUMULEC, J.; MASARIK, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. Relevance of infection with human papillomavirus: the role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins (Review). *International journal of oncology*, v.43, p. 1754-62, 2013.
- 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. 6950-6956, 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. 368-383, 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. 311-315, 1995.
- 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. 319-330, 2004.
- TANG, Z.; LI, J.; SHEN, Q.; FENG, J.; LIU, H.; WANG, W.; XU, L.; SHI, G.; YE, X.; GE, M.; ZHOU, X.; NI, S. Contribution of upregulated dipeptidyl peptidase 9 (DPP9) in promoting tumorigenicity, metastasis and the prediction of poor prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). *International journal of cancer*, v.140, p. 1620-32, 2017.
- 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. 253-273, 2007.

- VARGAS, J. E.; SALTON, G.; SODRE DE CASTRO LAINO, A.; PIRES, T. D.; BONAMINO, M.; LENZ, G.; DELGADO-CANEDO, A. pLR: a lentiviral backbone series to stable transduction of bicistronic genes and exchange of promoters. *Plasmid*, v.68, p. 179-185, 2012.
- WAUMANS, Y.; BAERTS, L.; KEHOE, K.; LAMBEIR, A. M.; DE MEESTER, I. The Dipeptidyl Peptidase Family, Prolyl Oligopeptidase, and Prolyl Carboxypeptidase in the Immune System and Inflammatory Disease, Including Atherosclerosis. *Front Immunol*, v.6, p. 387, 2015.
- WERNES, B. A.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, v.248, p. 76–79, 1990.
- 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. 311-322, 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. 855-866, 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. 1325-1334, 2005.
- WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, v.7, p. 11-22, 2007.
- YU, D. M.; AJAMI, K.; GALL, M. G.; PARK, J.; LEE, C. S.; EVANS, K. A.; MCLAUGHLIN, E. A.; PITMAN, M. R.; ABBOTT, C. A.; MCCAUGHAN, G. W.; GORRELL, M. D. The in vivo expression of dipeptidyl peptidases 8 and 9. *J Histochem Cytochem*, v.57, p. 1025-1040, 2009.
- YU, D. M.; YAO, T. W.; CHOWDHURY, S.; NADVI, N. A.; OSBORNE, B.; CHURCH, W. B.; MCCAUGHAN, G. W.; GORRELL, M. D. The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology. *FEBS J*, v.277, p. 1126-1144, 2010.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, v.2, p. 342-350, 2002.
- ZUR HAUSEN H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology*, v.392, p. 1-10, 2009.

VII. Biografia

Aline Beckenkamp possui graduação em Farmácia (2011) com ênfase em Análises Clínicas (2013) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela mesma universidade (2013). Durante o doutorado estudou o envolvimento da enzima DPPIV/CD26 no desenvolvimento do câncer cervical humano. Possui experiência na área de bioquímica, biologia celular e molecular do câncer. Ao longo do doutorado também contribuiu para o desenvolvimento de trabalhos de conclusão de curso, dissertações e teses de colegas de laboratório e de outras áreas. Desta forma, atuou em áreas de pesquisa envolvendo o estudo de novos alvos terapêuticos e biomarcadores tumorais, atividade biológica de produtos nanoestruturados em células tumorais, e atividade cicatrizante de extratos vegetais em queratinócitos.

Produção intelectual:

1. KRAI, J.; **BECKENKAMP, A.**; GAELZER, M.M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; FILIPPI-CHIELA, E.C.; SALBEGO, C.; BUFFON, A.; BECK, R.C.R. Doxazosin nanoencapsulation improves its in vitro antiproliferative and anticlonogenic effects on breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 94, p. 10-20, 2017.

2. ANTONOW, M. B.; ASBAHR, A. C. C.; RADDATZ, P.; **BECKENKAMP, A.**; BUFFON, A.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Liquid formulation containing doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules: Cytotoxicity in human breast cancer cell line and in vitro uptake mechanism. *Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems (Print)*, v. 76, p. 374-382, 2017.

3. NEMITZ, M. C.; FACHEL, F. N. S.; **BECKENKAMP, A.**; BUFFON, A.; TEIXEIRA, H. F.; POSER, G. L. V. Soybeans isoflavone aglycone-rich extracts: Optimization by different bioprocesses and production of a purified fraction with promising wound healing property. *INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS*, v. 105, p. 193-202, 2017.

4. OLIVEIRA, C. P.; PRADO, W. A.; LAVAYEN, V.; BÜTTENBENDER, S. L.; **BECKENKAMP, A.**; MARTINS, B. S.; LÜDTKE, D. S.; CAMPO, L. F.; RODEMBUSCH, F. S.; BUFFON, A.; PESSOA, A.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Bromelain-Functionalized Multiple-Wall Lipid-Core Nanocapsules: Formulation, Chemical Structure and Antiproliferative Effect Against Human Breast Cancer Cells (MCF-7). *Pharmaceutical Research*, v. 34, p. 438-452, 2017.

5. **BECKENKAMP, A.**; DAVIES, S.; WILLIG, J. B.; BUFFON, A. DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? *Tumor Biology*, v.37, p.7059 - 7073, 2016.

6. BRIDI, H.; **BECKENKAMP, A.**; CCANA-CCAPATINTA, G. V.; DE LORETO BORDIGNON, S. A.; BUFFON, A.; VON POSER, G. L. Characterization of Phloroglucinol-enriched Fractions of Brazilian Hypericum Species and Evaluation of Their Effect on Human Keratinocytes Proliferation. PTR. Phytotherapy Research, v. 31, p. 62-68, 2016.

7. DAVIES, S.; **BECKENKAMP, A.**; BUFFON, A. CD26 a cancer stem cell marker and therapeutic target. Biomedicine & Pharmacotherapy. v.71, p.135 - 138, 2015.

8. **BECKENKAMP, A.**; WILLIG, J. B.; SANTANA, D. B.; NASCIMENTO, J.; PACCEZ, J. D.; ZERBINI, L. F.; BRUNO, A. N.; PILGER, D. A.; WINK, M. R.; BUFFON, A. Differential Expression and Enzymatic Activity of DPPIV/CD26 Affects Migration Ability of Cervical Carcinoma Cells. Plos One, v.10, p.e0134305, 2015.

9. ALERICO, G. C.; **BECKENKAMP, A.**; VIGNOLI-SILVA, M.; BUFFON, A.; VON POSER, G. L. Proliferative effect of plants used for wound healing in Rio Grande do Sul state, Brazil. Journal of Ethnopharmacology, v.176, p.305 - 310, 2015.

10. BUFFON, A.; **BECKENKAMP, A.**; SANTANA, D. B.; NASCIMENTO, J.; PACCEZ, J.; ZERBINI, L. F.; WINK, M. R.; BRUNO, A. N. Abstract A43: Investigation of dipeptidyl peptidase IV/CD26 role in cervical cancer cell lines. Molecular Cancer Therapeutics. v.12, p.A43 - A43, 2014.

11. MELLO, P. D. A.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; NASCIMENTO, J.; KIPPER, F. C.; **BECKENKAMP, A.**; SANTANA, D. B.; BRUNO, A. N.; LENZ, G.; BUFFON, A. Abstract B208: Reduction in P2X7 receptor expression is a marker of resistance to ATP treatment in human cervical carcinoma cell line. Molecular Cancer Therapeutics, v.12, p.B208 - B208, 2014.

12. MELLO, P. D. A.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; NASCIMENTO, J.; **BECKENKAMP, A.**; SANTANA, D. B.; KIPPER, F.; CASALI, E. A.; NEJAR BRUNO, A.; PACCEZ, J. D.; ZERBINI, L. F.; WINK, M. R.; LENZ, G.; BUFFON, A. Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. Molecular Biology of the Cell, v.25, p.2905 - 2918, 2014.

13. FONTANA, M. C.; **BECKENKAMP, A.**; BUFFON, A.; BECK, R. C. R. Controlled release of raloxifene by nanoencapsulation: effect on in vitro antiproliferative activity of human breast cancer cells. International Journal of Nanomedicine, p.2979 - 2991, 2014.

14. **BECKENKAMP, A.**; SANTANA, D. B.; BRUNO, A. N.; CALIL, L. N.; CASALI, E. A.; PACCEZ, J. D.; ZERBINI, L. F.; LENZ, G.; WINK, M. R.; BUFFON, A. Ectonucleotidase expression profile and activity in human cervical cancer cell lines. Biochemistry and Cell Biology, v.92, p.95 - 104, 2014.