



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Thaís Bravo Picão

**Estudo da ação do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} e da interação entre células
endoteliais e carcinogênicas de cabeça e pescoço**

São José do Rio Preto

2019

Thaís Bravo Picão

**Estudo da ação do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} e da interação entre células
endoteliais e carcinogênicas de cabeça e pescoço**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências junto ao Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

FAPESP – Processo 2017/02100-3

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

Co-orientadora: Profa. Dra. Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto

2019

P585e	Picão, Thaís Bravo Estudo da ação do peptídeo ANXA1Ac2-26 e da interação entre células endoteliais e carcinogênicas de cabeça e pescoço / Thaís Bravo Picão. -- São José do Rio Preto, 2019 61 p. : il., tabs., fotos + 1 CD-ROM Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Flávia Cristina Rodrigues Lisoni Coorientadora: Sonia Maria Olinari 1. Anexina A1. 2. Câncer de cabeça e pescoço. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Thaís Bravo Picão

Estudo da ação do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} e da interação entre células endoteliais e carcinogênicas de cabeça e pescoço

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências junto ao Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

FAPESP – Processo 2017/02100-3

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

Co-orientadora: Profa. Dra. Sonia Maria Oliani

Comissão Examinadora

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS)/UNESP – Ilha Solteira

2ª Examinadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) – São José do Rio Preto

3ª Examinadora: Profa. Dra. Cristiane Damas Gil
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – São Paulo

São José do Rio Preto

01 de março de 2019

DEDICATÓRIAS

Primeiramente, dedico este trabalho e toda minha vida a Deus, que sempre guia meus passos, me dá discernimento, força e coragem para que eu possa dar o melhor de mim em tudo que faço. Dedico também a minha mãe, Vânia Bravo, meu falecido pai, Mauro Picão, e meu irmão, Mauro Picão Junior, por terem me dado e continuarem dando uma base sólida e resistente para eu poder construir meus sonhos.

Muito obrigada!

Ao meu padrasto, Roberto Delazari, por ser um exemplo de honestidade, alegria, bondade, por trabalhar incansavelmente para que nada falte a minha família e a mim e por ser meu melhor amigo.

Muito obrigada!

À Profa. Dra. Flávia Lisoni, por ter me orientado desde 2012, durante toda minha graduação e no mestrado, não somente me ensinando trabalhar, mas também me ensinando o valor da honestidade e do companheirismo dentro do ambiente de trabalho. Obrigada por ter me aceitado e acreditado todos esses anos no meu potencial, na minha capacidade e no meu trabalho.

Muito obrigada!

À Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, pelos ensinamentos, por todas as oportunidades oferecidas, por me ensinar a sair da zona de conforto e buscar sempre mais conhecimento e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo nº 2017/02100-3) e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo investimento em nossa pesquisa.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, que permitiu o desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), por possibilitar a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Eloiza Helena Tajara da Silva, coordenadora do Laboratório de Biomarcadores e Bioinformática Médica da faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pela doação da linhagem celular Hep-2 e colaboração no desenvolvimento do projeto e ao Prof. Dr. Tiago Henrique por auxiliar com a técnica e análise dos resultados da PCR quantitativa em tempo real.

Às valiosas companheiras de laboratório: Julliene Guaraldi, Juliana Gusson, Mab Corrêa, Rafaela Molas, Jusciele Moreli e Janesly Prates por terem me ajudado sempre que precisei e por termos criado um ambiente tão agradável de trabalho, com muitas risadas, cafés da tarde e companheirismo.

À Dra. Laila Toniol Cardin, por ter ensinado trabalhar com o *software* GraphPad Prism, com o qual realizei todas as análises estatísticas deste trabalho.

À aluna de doutorado Mab Corrêa, pelo auxílio prestado nos ensaios colorimétricos ELISA e em tantos outros.

À minha grande amiga Julliene Guaraldi, com quem compartilhei momentos incríveis e por quem eu guardo um amor muito grande em meu coração. Amo você minha amiga.

A todos os meus amigos e amigas, que de alguma forma me auxiliaram durante o desenvolvimento do projeto, seja de forma direta, dentro do laboratório, ou de forma indireta, dando uma palavra amiga, um ombro para chorar nos momentos ruins e rindo junto nos momentos bons.

A todos vocês, meu mais sincero, muito obrigada!!!

RESUMO

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) representa o sexto câncer mais comum em todo o mundo, sendo o câncer na cavidade oral o mais comum entre as regiões anatômicas de abrangência do CECP. Há evidências de que o desenvolvimento e a progressão do câncer dependem não somente de suas características genéticas, mas também de interações de suas células com as células do microambiente tumoral. A carcinogênese também está relacionada com angiogênese e processos inflamatórios, que podem ser controlados pela ação de mediadores anti-inflamatórios, e entre esses, destacamos a proteína anti-inflamatória anexina A1 (ANXA1). Mas os mecanismos pelos quais a ANXA1 atua na tumorigênese e a sua relação com a interação entre células endoteliais e tumorigênicas não são bem conhecidos e, considerando seu papel na inflamação, compreendem um alvo importante para estudo. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo, analisar a interação de células endoteliais e tumorigênicas juntamente com a ação do peptídeo sintético Ac₂₋₂₆ da proteína ANXA1(ANXA1_{Ac2-26}) em linhagem de carcinoma de cabeça e pescoço, verificando como o peptídeo atua junto ao meio condicionado de células endoteliais e/ou de células tumorais, elucidando como os fatores excretados por ambas as células e o peptídeo atuam no processo tumorigênico. Para isso, a observação da morfologia foi realizada em microscópio invertido, o índice de proliferação pela curva de crescimento, a viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico MTS (IC₅₀), a migração celular pelo método bicamada *transwell*, genotoxicidade pelo ensaio Cometa, avaliação de apoptose e necrose por citômetro de fluxo, padrão de liberação de citocinas/quimiocinas por ELISA e expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa. A estatística foi realizada por Análise de Variância para comparações múltiplas (ANOVA), seguido do ajuste de Bonferroni, pelo *software* GraphPad Prism 5.0. Os resultados mostraram que o efeito do meio condicionado por células tumorais (Hep-2) em células endoteliais (HUVEC) e vice-versa, tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, não modifica a morfologia e a migração celular, mas altera a proliferação; não é citotóxico, porém é genotóxico; induz ao processo de apoptose tardia, modifica a expressão das citocinas/quimiocinas IL-8, RANTES e TNF- α e modula a expressão de genes envolvidos com o processo inflamatório. Assim, mostramos que a interação entre células endoteliais e tumorigênicas, juntamente com a ação do ANXA1_{Ac2-26} nas células endoteliais e/ou tumorais provavelmente participam do processo tumorigênico por mecanismos relacionados às vias anti-proliferativas, apoptóticas e/ou inflamatórias e abrem novas possibilidades de estudos para alternativas terapêuticas no câncer de cabeça e pescoço.

Palavras chave: cultura de células. Estroma. Anexina A1. ELISA. Expressão gênica.

ABSTRACT

Head and Neck Squamous Cells Carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer in the world, being cancer in the oral cavity the most common among the anatomical regions of HNSCC. There is evidence that the development and progression of cancer depends not only on its genetic characteristics, but also because of the interactions of cells, cancer and tumor microenvironment cells. Carcinogenesis is also related to angiogenesis and inflammatory processes which can be controlled by the action of anti-inflammatory mediators, among which we highlight the anti-inflammatory protein annexin A1 (ANXA1). But the mechanisms that ANXA1 acts in tumorigenesis and its relation to the interaction between endothelial and tumorigenic cells are not well known and considering their role in inflammation, comprise an important target for study. Therefore, the present study aimed to analyze the interaction of endothelial and tumorigenic cells with the action of the synthetic peptide A_{c2-26} of the ANXA1 protein (ANXA1_{A_{c2-26}}) in head and neck carcinoma cell line, verifying how the peptide acts with the conditioned medium of endothelial cells and/or tumor cells, elucidating how the factors excreted by both cells and the peptide acts in the tumorigenic process. For this, the morphology observation was performed under inverted microscope, proliferation index by growth curve, cell viability was determined by the colorimetric method MTS (IC₅₀), cell migration by transwell bilayer method, genotoxicity by the Comet assay, apoptosis and necrosis by flow cytometry, cytokine/chemokine release pattern by ELISA and gene expression by the quantitative PCR technique. The statistic was performed by Analysis of Variance for multiple comparisons, followed by Bonferroni adjustment, made it with GraphPad Prism 5.0 software. The results showed that the effect of tumor cell conditioned medium (Hep-2) on endothelial cells (HUVEC) and the other way, treated with the peptide ANXA1_{A_{c2-26}}, does not modify cell morphology and migration, but alters proliferation; is not cytotoxic, but is genotoxic; induces the late apoptosis process, modifies the expression of cytokines/chemokines IL-8, RANTES and TNF- α and modulates the expression of genes involved in the inflammatory process. Thus, we show that the interaction of the tumor microenvironment with the action of ANXA1_{A_{c2-26}} on endothelial and/or tumor cells probably participates in the tumorigenic process by mechanisms related to antiproliferative, apoptotic and/or inflammatory pathways and open new possibilities for studies to therapeutic alternatives in head and neck cancer.

Keywords: cell culture. Estroma. Annexin A1. ELISA. Genic expression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema da proteína Anexina, mostrando os aminoácidos da região N terminal e as 4 repetições de 70-80 aminoácidos na região C terminal. 20
- Figura 2** – Imagem do co-cultivo das linhagens HUVEC e Hep-2. Uma linhagem é colocada sobre a superfície do poço (A), enquanto a outra linhagem é colocada sobre a superfície do inserto com poros de tamanho 0,4µm (B). As linhagens compartilham o mesmo meio de cultura, porém não atravessam o inserto, somente os fatores parácrinos liberados por ambas atravessam o inserto e interagem diretamente com as células. 27
- Figura 3** - Representação dos poços nas placas *transwell* para realização do ensaio de migração celular. As células foram colocadas sobre a membrana de polycarbonato com poros de 8µm de diâmetro e as células que migraram através da membrana para baixo foram fixadas, coradas, fotografadas e contadas. 30
- Figura 4** – Fotomicrografias do ensaio de migração celular das linhagens Hep-2 e HUVEC. A) e B) células Hep-2, C) e D) células HUVEC. A) e C) células controle, B) e D) células tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL] após 48 horas. Células fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS e coradas com solução de Cristal Violeta. Escala: 50µm. 30
- Figura 5** - Fotomicrografias de fluorescência de núcleos com diferentes tipos de danos avaliados pelo ensaio Cometa nas células Hep-2 após tratamento com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], com classificação em: dano 0 - sem dano aparente, dano 1 – dano uma vez o tamanho do núcleo, dano 2 – dano duas vezes o tamanho do núcleo e dano 3 – dano de duas a três vezes o tamanho do núcleo (com formação de um grande rastro, semelhante a cauda de um cometa). Escala: 50µm. 32
- Figura 6** - Imagens mostrando a morfologia da linhagem celular Hep-2 após 48 horas: (A) sem tratamento e (B) tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. Escala: 50µm. 56
- Figura 7** - Imagens mostrando a morfologia da linhagem celular HUVEC após 48 horas: (A) sem tratamento e (B) tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. Escala: 100µm. 56
- Figura 8** - Gráfico da proliferação celular da linhagem Hep-2. Células co-cultivadas com linhagem HUVEC e tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. *Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. #Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células co-cultivadas ou não. 57
- Figura 9** - Gráfico da proliferação celular da linhagem HUVEC. Células co-cultivadas com linhagem Hep-2 e tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. *Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. #Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células co-cultivadas ou não. 57
- Figura 10** - Densitometria do ensaio de Viabilidade celular da linhagem Hep-2. Células tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], nas condições com e sem co-cultivo com a linhagem HUVEC. Viabilidade celular (%) obtida pela fórmula $A/B \times 100$. Traço em vermelho indica IC₅₀. Experimento realizado em triplicata. *Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} 58

Figura 11 - Densitometria do ensaio de Viabilidade celular da linhagem Hep-2. Células tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], nas condições com e sem co-cultivo com a linhagem HUVEC. Viabilidade celular (%) obtida pela fórmula A/Bx100. Traço em vermelho indica IC₅₀. Experimento realizado em triplicata. *Diferença significativa com p≤0,05 entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. 58

Figura 12 - Resultado do ensaio de migração celular das linhagens Hep-2 e HUVEC. Gráficos da análise estatística do ensaio de migração das células A) Hep-2 e B) HUVEC. Experimento realizado em triplicata. 59

Figura 13 - Gráficos dos resultados do ensaio Cometa para as linhagens A) Hep-2 e B) HUVEC em co-cultivo e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL] por 48 horas. Experimento realizado em triplicata. *Diferença significativa com p≤0,05 entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. #Diferença significativa com p≤0,05 entre células co-cultivadas ou não. 59

Figura 14 - Dados da citometria de fluxo com a linhagem Hep-2. Gráficos A-D: dotplots com x= FITC Anexina V e y= Iodeto de propídeo, A) Controle, B) ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], C) Co-cultivo controle, D) Co-cultivo com ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. E) Densitometria do ensaio de citômetro de fluxo com x= estágios celulares e y= porcentagem de células em 10.000 eventos. 60

Figura 15 - Dados da citometria de fluxo com a linhagem HUVEC. Gráficos A-D: dotplots com x= FITC Anexina V e y= Iodeto de propídeo, A) Controle, B) ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], C) Co-cultivo controle, D) Co-cultivo com ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. E) Densitometria do ensaio de citômetro de fluxo com x= estágios celulares e y= porcentagem de células em 10.000 eventos. 60

Figura 16 - Gráficos do ensaio colorimétrico ELISA para análise de citocinas/quimiocinas. A) IL-6, B) IL-8, C) IL-10, D) MCP-1, E) RANTES e F) TNF- α . C: células controle, T: células tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], CC: células em co-cultivo e controle, CT: células em co-cultivo e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. Experimento realizado em triplicata. *Diferença significativa com p≤0,05 entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. #Diferença significativa com p≤0,05 entre células co-cultivadas ou não. 61

Figura 17 – Padrão de expressão gênica das células Hep-2 tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], co-cultivadas e co-cultivadas e tratadas. O grupo controle não é a base de comparação, sendo sua expressão, em logaritmo de base 2, considerada zero; e com base nisso, foram considerados diferencialmente expressos os transcritos que exibiram expressão relativa ≥ 1.0 ou ≤ -1.0 em relação ao controle (linha vermelha). Experimento realizado em triplicata. 62

Figura 18 - Padrão de expressão gênica das células HUVEC tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], co-cultivadas e co-cultivadas e tratadas. O grupo controle não é a base de comparação, sendo sua expressão, em logaritmo de base 2, considerada zero; e com base nisso, foram considerados diferencialmente expressos os transcritos que exibiram expressão relativa ≥ 1.0 ou ≤ -1.0 em relação ao controle (linha vermelha). Experimento realizado em triplicata. 62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Papel da proteína Anexina A1 em diversos tipos de cânceres. A proteína ANXA1 pode atuar como supressora ou promotora dependendo do tipo de câncer e de sua interação com outros fatores. Fonte: GUO ET AL., 2013. 22
- Tabela 2** – Delineamento dos experimentos realizados para oito condições diferentes: HUVEC e Hep-2 com meio completo, HUVEC e Hep-2 com meio completo e tratadas com ANXA1_{Ac2-26}, co-cultivo de ambas as células tratadas e não tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. Fonte: elaborado pela autora, 2018. 26
- Tabela 3** – Iniciadores para os genes de interesse..... 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µL: microlitros

%: porcentagem

<: menor que

≤: menor ou igual

≥: maior ou igual

°C: graus célsius

µg: microgramas

ANXA1: proteína Anexina A1

ANXA1 Ac2-26: peptídio da porção N-terminal da proteína ANXA1

ANOVA: Análise de variância

AKT: proteína quinase B

B16B16: linhagem celular metastática de melanoma

B16F10: linhagem celular de melanoma

CAFs: *Cancer Associated Fibroblasts* – fibroblastos associados ao câncer

CAL-27: linhagem celular derivada de carcinoma oral

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina

cDNA: DNA complementar

cm²: centímetros quadrados

CO₂: gás carbônico

cPLA₂: PLA₂ citosólica. cPLA₂ é uma fosfolipase A₂ cálcio-dependente citosólica

COX: ciclo oxigenase -2

Ct: Cycle threshold

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

EBV: vírus Epstein-Barr

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFR: receptor do fator de crescimento epitelial

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): ensaio colorimétrico de imunoabsorção enzimática que permite a detecção de anticorpos específicos

EP1: receptor de prostaglandina E 1 (subtipo EP1)

EP2: receptor de prostaglandina E 2 (subtipo EP2)

EP3: receptor de prostaglandina E 3 (subtipo EP3)

EP4: receptor de prostaglandina E 4 (subtipo EP4)

ERK: proteína quinase

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FPR: *formyl peptide receptor*. Receptor ao qual a Anexina A1 se liga

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GSK3: glicogênio sintetase quinase 3

HB96: linhagem celular derivada de carcinoma oral

HB56: linhagem celular derivada de carcinoma oral

HIF: Fator de transcrição de proteínas

Hep-2: linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de laringe

HNSCC: células escamosas de carcinoma de cabeça e pescoço

HPV: Papilomavirus Humano

HSC-2: linhagem celular derivada de carcinoma oral

HSC-3: linhagem celular derivada de carcinoma oral

HUVEC: linhagem celular derivada do endotélio de veia umbilical humana

IBILCE: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

IFN- γ : interferon (gama)

IL-1: Interleucina 1

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-17: Interleucina 17

INCA: Instituto Nacional do Câncer

kDa: kilodalton

Log2: escala logarítmica de base 2

LMP: agarose de baixo ponto de fusão

LXA4: Lipoxina A4

mA: miliampère

MCP-1: proteína quimioatrativa de monócitos

Meio MEM (Earle): mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e compostos essenciais para crescimento celular

mg: miligrama

MHCC97-H: linhagem celular derivada de carcinoma hepatocelular

MMP2: Matriz metaloroteinase 2

MMP8: Matriz metaloroteinase 8

MMP9: Matriz metaloroteinase 9

MMP13: Matriz metaloroteinase 13

MTS: composto tetrazólico [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt

mL: mililitro

mM: milimolar

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NF- κ B: fator de crescimento nuclear kappa B

NMP: agarose de alto ponto de fusão

NT: linhagem celular derivada de carcinoma oral

OSC: linhagem celular derivada de carcinoma oral

P13K: fosfoinositídeo 3-quinase ou fosfatidilinositol 3-quinase

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGE2: Prostaglandina E receptor 2

PI: Iodeto de Propídio

RANTES: proteína quimioatrativa de células do sistema imune, especialmente macrófagos

RNA: Ácido Ribonucleico

rpm: rotação por minuto

RT: transcriptase reversa

SiHa: linhagem celular derivada de células de carcinoma epidermóide de cérvix

TAMs: macrófagos associados a tumores

Tca8113: linhagem celular derivada de carcinoma oral

TGF- β 1: fator de transformação do crescimento (beta) 1

TIMP1: Inibidor de tecido de metaloproteinase 1

TIMP2: Inibidor de tecido de metaloproteinase 2

TIMP3: Inibidor de tecido de metaloproteinase 3

TNF- α : Fator de necrose tumoral (alfa)

TRIZol: solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina

TSCC: linhagem celular derivada de carcinoma oral

UNESP: Universidade Estadual Paulista

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VEGF-A: fator de crescimento endotelial vascular A

V: volts

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

Δ : delta

SUMÁRIO

<u>1. INTRODUÇÃO.....</u>	<u>17</u>
<u>2. OBJETIVOS.....</u>	<u>24</u>
<u>3. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>25</u>
3.1. LINHAGENS CELULARES	25
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
3.3. CULTIVO E ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR	26
3.4. CO-CULTIVO CELULAR	27
3.5. ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	27
3.6. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR.....	28
3.7. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	29
3.8. ENSAIO COMETA.....	31
3.9. CITOMETRIA DE FLUXO.....	32
3.10. ENSAIOS DE IMUNOABSORÇÃO ELISA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS/QUIMIOCINAS.....	33
3.11. EXTRAÇÃO DE RNA E CONFEÇÃO DO CDNA	33
3.12. SELEÇÃO DE GENES DE INTERESSE	34
3.13. PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	34
3.14. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
<u>4. RESULTADOS</u>	<u>36</u>
4.1. MORFOLOGIA	36
4.2. PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	36
4.3. CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR.....	36
4.4. MIGRAÇÃO CELULAR.....	37
4.5. ENSAIO COMETA.....	37
4.6. CITOMETRIA DE FLUXO.....	37
4.7. ANÁLISE DE CITOCINAS/QUIMIOCINAS POR ELISA.....	38
4.8. PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL	39
<u>5. DISCUSSÃO.....</u>	<u>39</u>
<u>6. CONCLUSÃO.....</u>	<u>46</u>
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>47</u>
<u>8. FIGURAS</u>	<u>56</u>

1. Introdução

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) inclui neoplasias que surgem na cavidade oral, faringe (orofaringe, nasofaringe e hipofaringe), laringe, seios maxilares, cavidade nasal e seios etmoidais, glândulas salivares e glândula tireoide (Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2019). O câncer de cabeça e pescoço é o sexto câncer mais comum em todo o mundo, sendo o câncer na cavidade oral o mais comum entre as regiões anatômicas de abrangência do CECP. A estatística mundial de câncer de cabeça e pescoço indica que há cerca de 500.000 novos casos por ano, resultando em aproximadamente 350.000 mortes por ano (BASHEER et al, 2018), sendo que o câncer da cavidade oral acomete aproximadamente 480.000 pessoas por ano. O câncer de cabeça e pescoço tem como principais fatores de risco o tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas (INCA, 2019) e aproximadamente 68% dos casos de desenvolvimento desse tipo de câncer tem como causa o tabagismo. O cigarro faz com que ocorra liberação de espécies reativas de oxigênio, causando danos celular e tecidual e além de inibir a perfusão e oxigenação normal dos tecidos, prejudica a função do sistema imune e interrompe a síntese de colágeno e reparo celular (CRIPPEN et al., 2018). Outros fatores de risco associados ao câncer de cabeça e pescoço são: má higiene bucal, refluxo gastro-esofageano, infecções pelo papilomavírus humano (HPV) e vírus Epstein-Barr (EBV) e má alimentação.

Segundo as estimativas do INCA, 2018, o câncer de cabeça e pescoço é hoje o terceiro mais frequente entre os homens no Brasil, atrás somente do câncer de pele não-melanoma e do câncer de próstata. A estimativa de novos casos para 2018 foi de 14.700, sendo 11.200 homens e 3.500 mulheres.

O CECP também está relacionado com angiogênese e processos inflamatórios. A abundância de células inflamatórias, que é uma característica do microambiente tumoral, vem sendo foco de muita discussão (ZIJLMANS et al., 2009). A ideia de que a inflamação está envolvida na tumorigênese é apoiada pela observação de que o câncer surge frequentemente em áreas de inflamação crônica. Os exemplos incluem a associação da pancreatite crônica com câncer de pâncreas, da colite ulcerativa com câncer de cólon e da infecção pelo HPV com câncer de colo de útero (FARROW et al., 1990; CLEVERS, 2004, PRATES et al., 2015).

No início do processo neoplásico, as células inflamatórias e os fatores sintetizados por elas regulam o crescimento, a migração e a diferenciação de todos os tipos celulares no microambiente tumoral, no qual as células fazem uma complexa rede de comunicação. Citocinas, quimiocinas e outras proteínas inflamatórias derivadas de células hospedeiras (células do estroma, células endoteliais e/ou células do sistema imune) coordenam a comunicação intracelular no

microambiente tumoral. Essa constante “comunicação” entre as células é essencial para o crescimento do tumor, invasão, angiogênese, e disseminação metastática (DIAKOS et al., 2014). Dentre as citocinas encontradas no microambiente tumoral, as que parecem desempenhar papéis importantes no comportamento de vários tipos celulares dentro de um tumor são TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8. Além desses mediadores, proteínas relacionadas com o processo tumorigênico, como MCP-1, TGF- β e ciclo-oxigenase 2 (COX-2), também podem atuar nesse contexto (AGGARWAL; GEHLOT, 2009; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; SANSONE; BROMBERG, 2011). A maioria desses fatores é produzida pelas células tumorais e inflamatórias, promovendo a comunicação parácrina e autócrina no microambiente tumoral e podendo influenciar a iniciação, promoção, progressão e metástase do câncer (AGGARWAL et al., 2009; GRIVENNIKOV; KARIN, 2011; NEURATH; FINOTTO, 2011). Ainda, foi observado que nas diferentes fases da tumorigênese, as inflamações crônicas estão envolvidas, sendo consideradas ameaça iminente diretamente ligada ao processo (YASMIN et al., 2015).

O microambiente tumoral também influencia no processo tumorigênico, pois é muito diferente daquele observado em tecidos normais correspondentes, sendo caracterizado por composição alterada da matriz extracelular, densidade elevada de microvasos, abundância de células inflamatórias e fibroblastos com fenótipo ativado (PETERSEN, 1996; RONNOV-JESSEN; TLSTY; HEIN, 2001; DE WEVER; MAREEL, 2003). O microambiente do tecido local onde ocorre processo tumorigênico tem sido reconhecido como participante essencial do desenvolvimento da doença. Os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) possuem papel crucial no desenvolvimento tumoral por meio de vários mecanismos: eles sintetizam, degradam e remoldam a matriz extracelular; secretam uma variedade de fatores de crescimento parácrinos e autócrinos que mantêm o crescimento das células tumorais, além de mediar a inflamação local (WANG et al., 2015).

Além do microambiente tumoral, há cascatas gênicas sendo estudadas e relacionadas a processos inflamatórios e tumorigênicos. Esses genes codificam proteínas, enzimas e receptores que estão diretamente envolvidos na tumorigênese. A ciclo-oxigenase 2 é uma enzima codificada pelo gene COX-2 e é responsável pela síntese de mediadores inflamatórios a partir do ácido araquidônico, entre eles a prostaglandina E2 (PGE2), que está superexpressa em muitos tipos de carcinoma, como por exemplo o carcinoma de mama, de pulmão, de pâncreas, de cabeça e de pescoço (FEDERICO et al., 2007). A PGE2 pode ativar receptores acoplados à proteína G, tais como EP1, EP2, EP3 e EP4 e regula a expressão, secreção e ativação de várias metaloproteinases em diferentes tipos celulares. Alguns dados da literatura sugerem que a expressão de EP3 possui papel prognóstico no câncer (ABRAHAO et al., 2010).

As metaloproteínas (MMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que degradam a maioria dos componentes da matriz extracelular incluindo colágeno, elastina e fibronectina. A degradação da matriz de colágeno é importante para a invasão de tecidos subjacentes e metástases (WERNER; RATHCKE; MANDIC, 2002). Várias MMPs possuem expressão elevada em câncer de cabeça e pescoço, incluindo MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 (YOSHIZAKI et al., 2001; FRANCHI et al., 2002; MOILANEN et al., 2002; CANEVARI; ROGATTO, 2004). MMP-2 e MMP-9 desempenham um papel importante na carcinogênese de cabeça e pescoço por degradar o colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal.

As proteínas que naturalmente inibem a atividade das MMPs são as codificadas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). A proteólise descontrolada das MMPs promove degradação da matriz extracelular, invasão de células tumorais e aumento do risco de metástase de células cancerígenas (BOURBOULIA et al., 2013). Estudos realizados por Guedez e colaboradores (2012) mostram que células de tumores de pulmão deficientes em TIMP-2 desencadearam a ativação de MMPs que pode mediar liberação de fatores inflamatórios, aumento adicional da angiogênese e imunossupressão. O modelo proposto por Lee e colaboradores (2012) relata que os mecanismos celulares e moleculares pelos quais a PGE2 promove a invasão de células epiteliais e estromais do endométrio na matriz extracelular, são a ligação da prostaglandina aos receptores EPs e fosforilação e ativação de β -arrestina, e de MMPs.

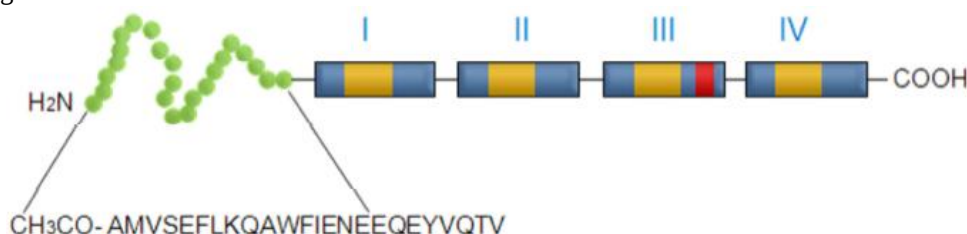
A correlação significativa entre a expressão de TIMP-3 e MMP-2 sugere a importância de TIMP-3 como fator prognóstico durante a progressão tumoral de carcinoma de laringe. A avaliação de marcadores moleculares que participam da via de ativação de MMP-2 tem um grande impacto durante a metástase de carcinomas de laringe (BODNAR et al., 2015). Além disso, em pacientes com células escamosas de carcinoma de cabeça e pescoço (HNSCC), a hipermetilação de TIMP-3 está associada ao risco de um segundo carcinoma (RETTORI et al., 2013).

Por outro lado, toda resposta inflamatória é controlada pela ação de mediadores anti-inflamatórios, que atuam para manter a homeostasia da resposta imunológica e prevenir a lesão tecidual. Entre esses mediadores destacamos a Anexina A1 (ANXA1), proteína de 37 kDa, que é expressa por diversos tipos de células, inclusive células tumorais e atua como moduladora do processo inflamatório (FLOWER, 1988; SILISTINO-SOUZA et al., 2007; ALVES et al., 2008, ZHANG et al., 2018). As anexinas compreendem uma superfamília bem conservada de proteínas classificadas em cinco grupos (A-E). Os mamíferos possuem as proteínas do grupo A; os não-vertebrados, fungos, plantas e protistas possuem as proteínas dos grupos B, C, D e E, respectivamente (GUO; LIU; SUN, 2013). O gene ANXA1 está localizado no cromossomo 9, em

9q12-21.2, apresenta 13 exons (WALLNER et al., 1986; RODRIGUES-LISONI; HENRIQUE; TAJARA, 2011; GUO; LIU; SUN, 2013).

Estruturalmente, essa superfamília possui a região C-terminal da proteína representando 80% de sua constituição, que é comum para todos os membros e possui o domínio tipo 2^o de ligação ao cálcio, composto de quatro sequências homólogas repetidas (BIAOXUE; XIGUANG; SHUANYING 2014) e a região variável N-terminal (Figura 1), que é única em comprimento e sequência para cada membro da família, inclui sítios potenciais de fosforilação, glicosilação e ação de peptidase (GERKE; MOSS, 2002; PERRETTI; DALLI, 2009; POSSEBON et al., 2018).

Figura 1 - Esquema da proteína Anexina, mostrando os aminoácidos da região N terminal e as 4 repetições de 70-80 aminoácidos na região C terminal.



Fonte: RODRIGUES-LISONI; HENRIQUE; TAJARA, 2011.

A proteína ANXA1, em células inativas, tem localização intracelular, porém, após ativação celular, a proteína é translocada para a superfície, onde interage com receptores transmembrana acoplados à proteína G, os FPRs (*Formylated Peptides Receptors*) (POSSEBON et al., 2018).

A ANXA1 participa de uma variedade de processos biológicos importantes como tradução celular, inflamação, fagocitose, proliferação, diferenciação e apoptose (GUO et al., 2013) e essa proteína pode ser encontrada em diversos tipos celulares relacionados aos processos de defesa como neutrófilos (OLIANI et al., 2001), mastócitos (OLIANI et al., 2008), eosinófilos (OLIANI; DAMAZO; PERRETI, 2002) e monócitos (GOULDING et al., 1990). Em locais de inflamação, ANXA1 pode ativar liberação de LXA4, que age regulando os níveis de algumas citocinas, tais como NF- κ B e TNF- α por meio da via PI3K/AKT (ZHANG et al., 2018).

Ainda, após a descoberta por CIRINO e colaboradores (1993) de que a atividade biológica da ANXA1 poderia ser reproduzida pelos primeiros vinte e seis aminoácidos da porção N-terminal da proteína (peptídeo Ac2-26), ou por alguns peptídeos menores (PERRETTI et al., 2001), tornou-se uma prática comum o uso dessas moléculas em modelos experimentais de inflamação aguda (DAMAZO et al., 2006; GAVINS et al., 2007; GIROL et al., 2013), crônica (GIBBS et al., 2002) e sistêmica (DAMAZO et al., 2005) em estudo *in vitro*, utilizando linhagens celulares de tipos diferentes de câncer (RODRIGUES-LISONI et al., 2006; SILISTINO-SOUZA et al., 2007; GASTARDELO et al., 2014; PRATES et al., 2015), e recentemente foi analisada em modelo de

enxerto de pele (TEIXEIRA et al., 2016), em doenças oculares inflamatórias (GIMENES et al., 2015; CARDIN et al., 2017) e em modelo animal de dermatite atópica (PARISI; CORRÊA; GIL, 2019).

Os estudos envolvendo ANXA1 e câncer são controversos, porém, indicam que essa proteína pode ser alvo de novas intervenções terapêuticas e usada como potencial biomarcador (BIAOXUE; XIGUANG; SHUANYING 2014). Sua atuação é específica para cada tipo de câncer, e há evidências que indicam que sua regulação e localização subcelular estão relacionadas com desenvolvimento, invasão, metástase, progressão e resistência a tratamentos (GUO; LIU; SUN, 2013; JORGE et al., 2013; POETER et al., 2013; POLLI-LOPES et al., 2013, GASTARDELO et al., 2014, PRATES et al., 2015, CARDIN et al., 2017, MORAES et al., 2018). Há evidências de que a expressão de ANXA1 está relacionada com a tumorigênese, como é possível observar na Tabela 1. Em alguns tipos de câncer, a ANXA1 atua como supressora tumoral, enquanto que em outros, a proteína atua como promotora tumoral (GUO; LIU; SUN, 2013).

Tabela 1 – Papel da proteína Anexina A1 em diversos tipos de cânceres. A proteína ANXA1 pode atuar como supressora ou promotora dependendo do tipo de câncer e de sua interação com outros fatores.

Tipo de tumor	Padrão de expressão	Implicação	Mecanismo
Carcinoma hepatocelular (CH)	A regulação positiva de ANXA1 promove CH; alta concentração de ANXA1 presente na membrana plasmática de células malignas de hepatoma Morris 7777; regulação positiva em células altamente metastáticas MHCC97-H. Baixa regulação de ANXA1 está associada com resistência à drogas de células cancerígenas hepáticas.	ANXA1 está intimamente relacionada com desenvolvimento, metástase e resistência à drogas no câncer de fígado.	ANXA1 está envolvida na tumorigênese do fígado por meio de conexões com EGFR e cPLA ₂ .
Câncer de pulmão	ANXA1 é superexpressa em diversas linhagens celulares de câncer de pulmão e está associada com resistência a drogas neste tipo de câncer.	ANXA1 está associada com progressão, metástase, resistência a drogas e diferenciação celular no câncer de pulmão.	-
Melanoma	ANXA1 é superexpressa em células metastáticas B16B16 de melanoma em camundongos em comparação com células não-metastáticas B16F10.	ANXA1 promove invasão e metástase do melanoma.	ANXA1 regula invasão e metástase do melanoma por meio dos receptores FPRs.
Câncer de pele	ANXA1 está superexpressa conferindo resistências das células tumorigênicas de câncer de pele a drogas.	ANXA1 influencia na iniciação e progressão do câncer de pele.	ANXA1 age inibindo a atividade de cPLA ₂ .
Câncer oral (CO)	ANXA1 é pouco expressa nas linhagens celulares de carcinoma oral HSC-2, HSC-3, HB96, HB56, Tca8113, TSCC, CAL-27, OSC e NT e também nos tecidos/sangue de pacientes com câncer oral. A baixa expressão de ANXA1 está relacionada com invasão celular no CO.	ANXA1 é um indicador negativo para invasão e progressão do CO.	A alteração da expressão e localização nuclear de ANXA1 pode ser usada como um fator prognóstico no CO.

Câncer nasofaríngeo (CN)	ANXA1 é pouco expressa em CN primário em relação à tecidos epiteliais normais da nasofaringe.	A baixa expressão de ANXA1 pode ser potencial indicador de diferenciação, metástase e prognóstico para CN.	-
Câncer cervical	ANXA1 é pouco expressa em neoplasias intraepiteliais cervicais e em células escamosas de carcinoma cervical invasivo (CECC); ANXA1 está significativamente diminuída durante diferenciação de CECC e progressão durante progressão da neoplasia cervical;	ANXA1 está associada com desenvolvimento, progressão, diferenciação e tratamento do Câncer cervical.	Mudança na expressão de ANXA1 é um evento que ocorre cedo no câncer cervical; ANXA1 é indicada para terapia do câncer cervical; a fosforilação de ANXA1 tem papel importante no câncer cervical.

Fonte: GUO; LIU; SUN, 2013.

No câncer de cabeça e pescoço, o papel da ANXA1 é controverso e alvo de muitos estudos. Suh e colaboradores (2015) mostraram que ANXA1 atua como supressora tumoral nas células escamosas de câncer de cabeça e pescoço, pois essa proteína é alvo do miRNA-196a, um microRNA oncogênico que está relacionado com desenvolvimento da tumorigênese e radioresistência. A supressão de ANXA1 regula o efeito oncogênico do miRNA-196a e dessa forma, miRNA-196a e ANXA1 podem ser futuros alvos para a terapia no câncer de cabeça e pescoço. Em células escamosas de carcinoma esofágico, o aumento do nível de ANXA1 é acompanhado por redução da expressão de miRNA-196a em pacientes após quimio e radioterapia. O aumento de ANXA1 é fator de risco para progressão do câncer esofágico (HAN et al., 2018). Gastardelo e colaboradores, em 2014, demonstraram *in vivo* e *in vitro* que ANXA1 pode ter papel efetivo no crescimento e invasão no carcinoma epidermoide de laringe por meio de mecanismos parácrinos mediados por FPR2/ALX e apontaram que estudos envolvendo o microambiente tumoral poderiam abrir novas portas para terapia no câncer de laringe.

Desse modo, os estudos relacionados com a ANXA1 têm contribuído para um maior entendimento do papel dessa proteína em processos inflamatórios e tumorigênicos. No entanto, os mecanismos pelos quais a ANXA1 atua na tumorigênese não são bem conhecidos e, considerando seu papel na inflamação, compreendem um alvo importante para estudo. Diante dessas

considerações, investigamos, *in vitro*, a interação entre células endoteliais e tumorigênicas juntamente com a ação do peptídeo sintético da proteína ANXA1 em linhagem de carcinoma de cabeça e pescoço, verificando como o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} atua junto ao meio condicionado de células endoteliais e/ou de células tumorais na morfologia, proliferação, citotoxicidade, migração e genotoxicidade celular, analisando apoptose e necrose celular, o padrão de liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α e RANTES) e padrão de expressão dos genes *COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*.

2. Objetivos

O objetivo geral do nosso trabalho foi analisar a interação entre células endoteliais e tumorigênicas juntamente com a ação do peptídeo sintético da proteína ANXA1 em linhagem de carcinoma de cabeça e pescoço, verificando como o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} atua junto ao meio condicionado de células endoteliais e/ou de células tumorais, elucidando como os fatores excretados por essas células e o peptídeo atuam no processo tumorigênico.

Os objetivos específicos compreenderam investigar *in vitro* o efeito do meio condicionado por células tumorais (Hep-2) em células endoteliais (HUVEC) e vice-versa, tratadas com o peptídeo sintético da proteína ANXA1 em:

- morfologia, pela análise em microscopia óptica;
- índice de proliferação celular, pelo ensaio de curva de crescimento;
- citotoxicidade e viabilidade celular, pelo ensaio colorimétrico a base de composto tetrazólico (MTS);
- migração celular, pelo ensaio de migração bicamada em placas *transwell*;
- genotoxicidade, pelo ensaio Cometa;
- apoptose e necrose celular, por citometria de fluxo;
- análise do padrão de liberação das citocinas/quimiocinas IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α e RANTES nos sobrenadantes da cultura e co-cultura celular por ensaio colorimétrico de imunoabsorção ELISA;
- expressão dos genes *COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, pela técnica de PCR quantitativa em tempo real.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens celulares

Foram utilizadas duas linhagens celulares, uma de carcinoma epidermóide de laringe (Hep-2) e a linhagem de células endoteliais normais de veia umbilical humana (HUVEC), ambas do Banco Americano de Linhagens Celulares (ATCC).

3.2. Delineamento experimental

Para cada ensaio realizado, as linhagens celulares foram cultivadas com meio completo (descrito no item 3.3), e posteriormente, submetidas ao co-cultivo celular (descrito no item 3.4) e ao tratamento com o peptídeo N-terminal Ac₂₋₂₆ da proteína anexina A1 (Ac-MVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVK) (RAYNAL; POLLARD, 1994), na concentração 10µg/mL em quatro diferentes tempos (4, 24, 48 e 72 horas). Inicialmente, foram realizados os ensaios de análise da morfologia, proliferação celular e citotoxicidade/viabilidade celular por MTS. Após análise dos dados obtidos com esses experimentos, foi escolhido o tempo de 48 horas, com diferença estatística significativa de tratamento, para realização dos demais ensaios. A concentração de tratamento foi estabelecida de acordo com testes prévios realizados por PRATES e colaboradores (2015). Dessa maneira, as células foram subdivididas nos seguintes grupos, conforme mostra a Tabela 2:

Tabela 2 – Delineamento dos experimentos realizados para oito condições diferentes: HUVEC e Hep-2 com meio completo, HUVEC e Hep-2 com meio completo e tratadas com ANXA1_{Ac2-26}, co-cultivo de ambas as células tratadas e não tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}.

HUVEC	Hep-2
Células controle com meio completo.	Células controle com meio completo.
Células tratadas com peptídeo ANXA1 _{Ac2-26} [10µg/mL] em meio completo.	Células tratadas com peptídeo ANXA1 _{Ac2-26} [10µg/mL] em meio completo.
Células em co-cultivo com células da linhagem Hep-2 com meio completo.	Células em co-cultivo com células da linhagem HUVEC com meio completo.
Células em co-cultivo com células da linhagem Hep-2 e adição do peptídeo ANXA1 _{Ac2-26} [10µg/mL] em meio completo.	Células em co-cultivo com células da linhagem HUVEC e adição do peptídeo ANXA1 _{Ac2-26} [10µg/mL] em meio completo.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

3.3. Cultivo e análise da morfologia celular

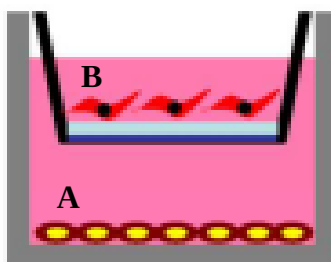
As linhagens de células Hep-2 e HUVEC foram semeadas em meio MEM-Earle (Cultilab, Br), pH 7,5, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Br), 1% de antibiótico/antimicótico (Invitrogen, Carlsbad, USA, UK), 1% de L-glutamina 200mM (Sigma Aldrich, USA) e 1% de piruvato de sódio 100mM (Sigma Aldrich, USA). As linhagens foram semeadas em garrafas de cultura de 75cm², na concentração de 5x10⁴ células e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, até se fixarem no substrato. Após esse período, o meio foi trocado a cada dois ou três dias, ou até se tornar confluyente. O crescimento e a morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41* e, quando a densidade celular se mostrou alta, o material foi submetido à tripsinização e subdividido em duas réplicas para posterior realização dos procedimentos abaixo descritos (análise de morfologia,

proliferação celular, migração celular, citotoxicidade, genotoxicidade, análise de apoptose, análise de citocinas/quimiocinas e de expressão gênica).

3.4. Co-cultivo celular

O ensaio de co-cultura foi realizado em placas de 24 poços *transwell* (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) que possuem insertos com membrana de $0,33\text{cm}^2$ e $0,4\mu\text{m}$ de tamanho de poro (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA). Para todos os ensaios, as células colocadas sobre a superfície dos poços receberam 1mL de meio MEM a 10% de SFB, enquanto que as células colocadas sobre os insertos receberam 0,1mL do mesmo meio. Ambas as células foram colocadas nos poços e nos insertos no mesmo momento (Figura 2). Para cada ensaio realizado, após o tempo de tratamento, os insertos foram descartados e a metodologia específica de cada ensaio foi realizada somente com as células sobre a superfície dos poços (Figura 2, A).

Figura 2 – Imagem do co-cultivo das linhagens HUVEC e Hep-2. Uma linhagem é colocada sobre a superfície do poço (A), enquanto a outra linhagem é colocada sobre a superfície do inserto com poros de tamanho $0,4\mu\text{m}$ (B). As linhagens compartilham o mesmo meio de cultura, porém não atravessam o inserto, somente os fatores parácrinos liberados por ambas atravessam o inserto e interagem diretamente com as células.



Fonte: GAO et al, 2015.

3.5. Índice de proliferação celular

Para analisar o índice de proliferação foi realizada uma curva de crescimento, com contagem de células cultivadas em placas de cultura de 24 poços, semeadas nas concentrações de $1,5 \times 10^4$ para células sobre a superfície dos poços e 1×10^4 para células sobre os insertos, em meio MEM a 10% de SFB, a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO_2 , por 24 horas, até se fixarem no substrato. Após esse período, o meio de cultura de todos os poços e todos os insertos foi substituído por meio de cultura sem SFB (MEM a 0%), a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular. Após 24 horas foi trocado o meio de cultura, substituído de acordo com os experimentos referidos acima. Nesse dia zero do experimento, o meio sem soro foi substituído pelo meio MEM a 10% e adicionado $10\mu\text{g/mL}$ do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} nos poços e nos insertos.

Após 4h de experimento, as células dos primeiros poços foram tripsinizadas e na situação de co-cultivo, os insertos foram desprezados e somente as células sobre a superfície dos poços

foram tripsinizadas. Após tripsinização, as células foram coradas com corante azul de tripan, que cora células com membrana rompida, e contadas em *Countess® Automated Cell Counter* (Thermo). As células dos outros poços foram tripsinizadas e contadas após 24, 48 e 72 horas do experimento, o qual foi realizado em triplicatas.

3.6. Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular

A avaliação da viabilidade foi feita por meio de teste colorimétrico de acordo com protocolo do fabricante do *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega), utilizando composto tetrazólico [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS].

A metodologia do MTS, cuja avaliação foi feita por meio da quantificação da redução do MTS em formazan, mede a atividade metabólica celular via enzimas oxirredutases dependentes de NADPH. Dessa forma, a redução do MTS a formazan foi diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade funcional das células.

O ensaio foi realizado em placas de 24 poços com concentração celular já descrita em um volume total de 0,5mL de meio MEM a 10% para as células Hep-2 e HUVEC somente e em 1mL do mesmo meio para poços em co-cultivo (0,1mL do mesmo meio nos insertos). As células foram mantidas a 37°C em câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂, por 24 horas, até se fixarem no substrato. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura MEM a 0%, a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular. Após 24 horas foi trocado o meio de cultura, substituído de acordo com os experimentos já referidos. Nesse dia zero do experimento, o meio sem soro foi substituído pelo meio completo e adicionado 10µg/mL do peptídeo ANXA1_{Ac2-}

26•

Após quatro horas da adição do peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, os poços receberam o composto MTS nos seguintes volumes: poços contendo células Hep-2 e HUVEC receberam 100µl da solução de MTS e nos poços com co-cultivo, os insertos foram desprezados e foi adicionado 200µl de solução MTS em cada poço. Após adição do MTS, as células foram encubadas por quatro horas em câmara úmida para que o composto pudesse ser metabolizado pelas células. Após quatro horas, 100µl de sobrenadante de cada poço foi transferido para placa de cultura com 96 poços e foi feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492nm. As células dos outros poços foram mantidas para a continuação dos experimentos nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O experimento foi realizado em triplicatas.

Após esse ensaio colorimétrico de citotoxicidade foi aplicado cálculo para a análise da viabilidade celular *versus* concentração, bem como o cálculo do IC₅₀ (Concentração Inibitória para

50% das células), onde os valores de absorbância obtidos no tratamento com os compostos (A), foram normalizados para os valores obtidos com o solvente (B) para obtenção da porcentagem de viabilidade celular (C) por meio da equação: $C=A/B \times 100$.

Com a finalização dos ensaios descritos até aqui, realizamos a análise estatística e selecionamos o tempo de 48 horas com diferença estatística significativa para realização dos demais ensaios.

3.7. Ensaio de Migração Celular

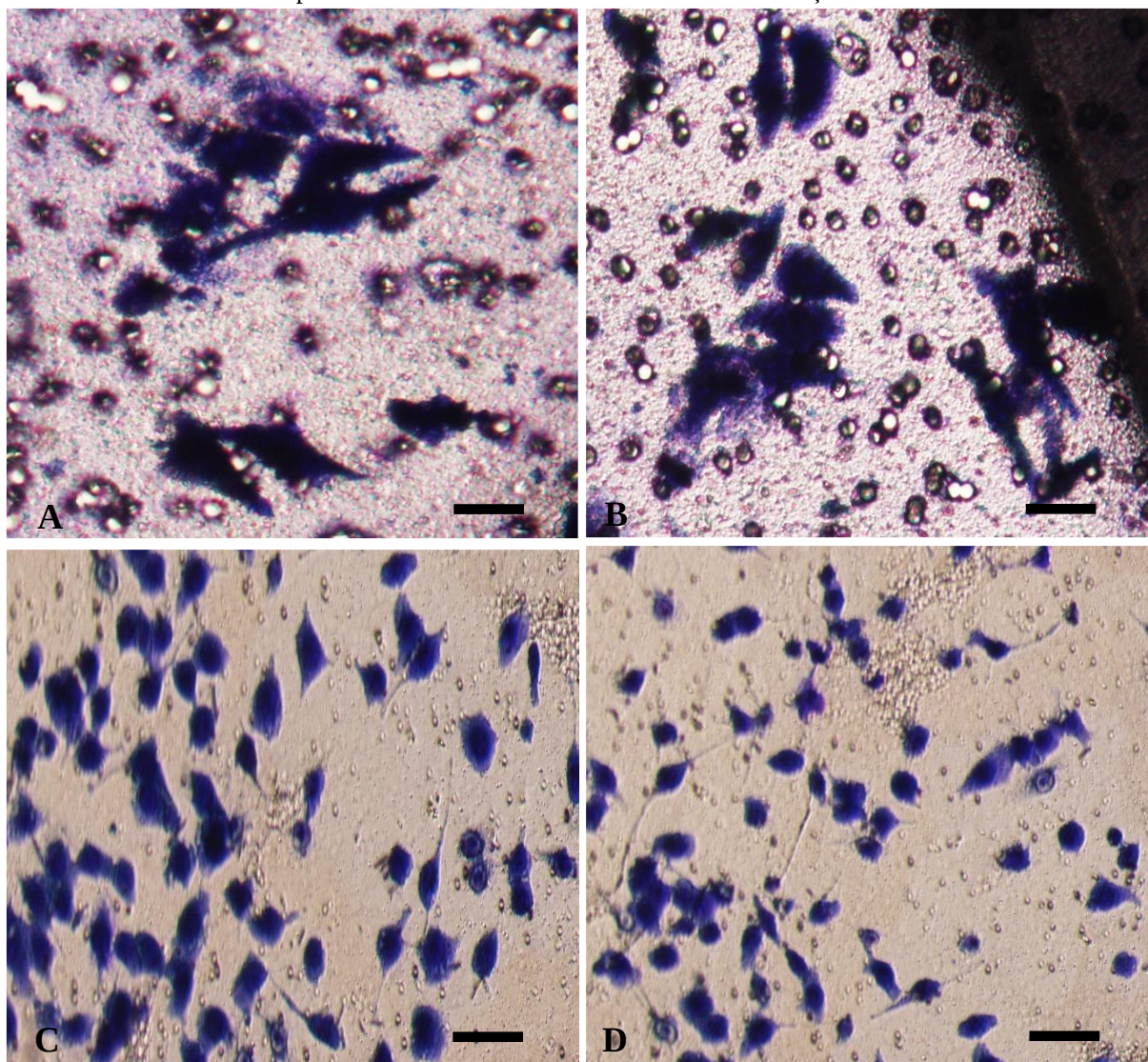
O ensaio de migração celular foi realizado em placas com 24 poços bipartes *transwell*. Os poços dessas placas são compostos por dois compartimentos distintos, separados entre si por uma membrana de polycarbontato com poros de 8µm de diâmetro (BD - Biosciences San Jose, CA, USA) (Figura 3). As células HUVEC e Hep-2 foram inicialmente cultivadas nas placas *transwell* como descrito acima. Após 24 horas o meio de cultura MEM a 10% foi substituído por meio MEM a 0%, a fim de deixar todas as células na mesma etapa celular e após 24 horas o meio MEM a 0% foi substituído novamente por meio MEM a 10% e foi adicionado o tratamento. Após o período de incubação de 48 horas, as células foram tripsinizadas e transferidas para o inserto com membrana das câmaras bipartes *transwell*, na concentração de 3×10^4 . Na situação de co-cultivo, os insertos foram descartados e somente as células sobre a superfície dos poços foram tripsinizadas e transferidas para os insertos das câmaras bipartes. Na parte inferior da câmara foi adicionado meio MEM a 10% enquanto que na parte superior da câmara, ou seja, sobre os insertos e juntamente com as células, foi adicionado meio MEM a 0% de SFB. Após 24 horas, as células remanescentes na superfície da membrana (parte superior do inserto) foram removidas com uma haste de algodão, enquanto que as células na superfície inferior das membranas, as células que migraram através dos poros, foram lavadas com PBS 1x gelado, fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 30 minutos e coradas com solução de Cristal Violeta por 30 minutos. Em seguida, os insertos foram colocados delicadamente sobre lâminas de vidro e as células foram fotografadas e contadas em quatro campos diferentes em microscópio de luz invertido (Figura 4). Esse ensaio foi realizado em triplicatas.

Figura 3 - Representação dos poços nas placas *transwell* para realização do ensaio de migração celular. As células foram colocadas sobre a membrana de polycarbonato com poros de $8\mu\text{M}$ de diâmetro e as células que migraram através da membrana para baixo foram fixadas, coradas, fotografadas e contadas.



Fonte: GAO et al., 2015.

Figura 4 – Fotomicrografias do ensaio de migração celular das linhagens Hep-2 e HUVEC. A) e B) células Hep-2, C) e D) células HUVEC. A) e C) células controle, B) e D) células tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [$10\mu\text{g/mL}$] após 48 horas. Células fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS e coradas com solução de Cristal Violeta. Escala: $50\mu\text{m}$.



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

3.8. Ensaio Cometa

O ensaio Cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido suas particularidades e vantagens quando comparado a outros testes para a detecção de substâncias genotóxicas (GONTIJO; TICE, 2003).

As células foram submetidas às condições experimentais: controle, tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} e co-cultivo de ambas controle e tratadas, por 48 horas, em placas de 24 poços, conforme já descrito. Após 48 horas, as células foram tripsinizadas e o conteúdo das placas foi retirado e colocado em tubo falcon de 15ml. As células foram centrifugadas, o meio desprezado e o “pellet” de células foi misturado a agarose de baixo ponto de fusão/*Low Melting Temperature Agarose* (LMP).

Para análise das células, foram utilizadas lâminas de extremidades foscas mergulhadas em uma mistura de PBS e agarose de ponto de fusão normal/*Normal Melting Agarose* (NMP) para que ficasse uma fina película do composto sobre as lâminas. Sobre as lâminas foi adicionado o extrato celular misturado a agarose de baixo ponto de fusão.

Após esse procedimento, foi realizada etapa de lise para que tivesse a quebra das membranas plasmática das células. Para isso, as lâminas foram mergulhadas em uma cuba de vidro com a solução de lise pH 10 (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, Lauril 35mM, TritonX 100 1% e DMSO 10%), a 4°C durante 60 minutos. Na sequência, foi realizada a eletroforese com duração de 20 minutos, em cuba horizontal com solução para eletroforese pH 13 (EDTA 200mM, NaOH 10N) a 25V e 300mA, para que o material genético pudesse se deslocar. Logo após, foi feito o processo de neutralização das lâminas, onde estas foram colocadas em uma bandeja e então foi adicionado 5mL de solução de neutralização pH 7,5 (Tris 0,4M), deixando agir por cinco minutos e repetindo este processo três vezes. Em seguida, as lâminas já secas foram colocadas novamente em cuba de vidro e então foi adicionado álcool etílico 100% por dez minutos para fixação do material genético. As lâminas foram retiradas da cuba e posicionadas em uma superfície à temperatura ambiente para que pudessem ser secas. Depois de secas, as lâminas foram acondicionadas em caixas plásticas e guardadas em geladeira. Desde o início até o final de todas as etapas, as amostras foram mantidas com a ausência de luz e calor, para evitar possíveis danos ao DNA, assim, as etapas foram realizadas em sala devidamente escura e temperatura a 17°C.

Após realização do ensaio Cometa, as lâminas foram analisadas para contagem das células e classificação dos danos. Para isso, as lâminas foram coradas com uma solução de Gel Red 10000x, NaCl 1M e água destilada, e analisadas em microscópio de fluorescência em aumento de 200x. Foram analisadas 100 células por grupo experimental. Os núcleos celulares foram

classificados em uma classe de dano que é determinada de acordo com a intensidade e tamanho da cauda do cometa (KOBAYASHI et al., 1995) (Figura 5).

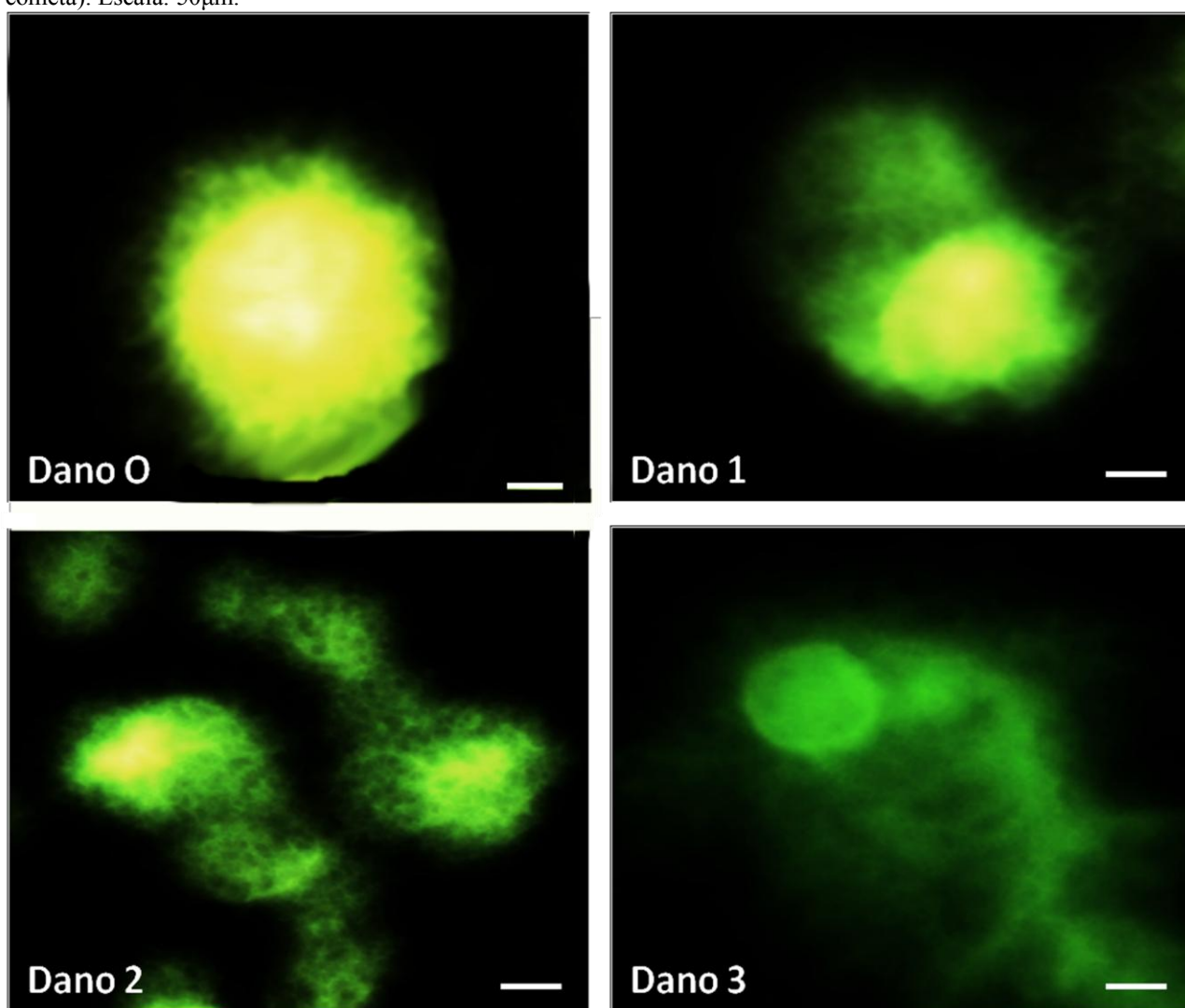
Classe 0 – sem dano aparente;

Classe 1 – cauda curta, menor que o diâmetro do núcleo;

Classe 2 – comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo;

Classe 3 – comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo.

Figura 5 - Fotomicrografias de fluorescência de núcleos com diferentes tipos de danos avaliados pelo ensaio Cometa nas células Hep-2 após tratamento com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], com classificação em: dano 0 - sem dano aparente, dano 1 – dano uma vez o tamanho do núcleo, dano 2 – dano duas vezes o tamanho do núcleo e dano 3 – dano de duas a três vezes o tamanho do núcleo (com formação de um grande rastro, semelhante a cauda de um cometa). Escala: 50µm.



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

3.9. Citometria de Fluxo

Alíquotas das células Hep-2 e HUVEC, nos diferentes grupos estabelecidos, foram analisadas pela citometria de fluxo (*Guava Easy Cyte*, *MILLIPORE*) para investigar a viabilidade, apoptose, apoptose tardia e necrose celular. As células foram cultivadas em triplicata nas placas

cultura de 24 poços por 48 horas, conforme já descrito. Posteriormente, foram submetidas a lavagem com PBS, tripsinizadas e centrifugadas para obtenção do “pellet” de células; o “pellet” foi ressuspensionado com tampão de ligação 1X a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Desta solução, foram transferidos 100 μ L de cada amostra para um tubo de 1,5mL juntamente com 5 μ L de FITC Annexin V e 5 μ L de PI (BD Pharmingen, San Diego, USA). Após homogeneizada, a solução foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, no escuro. Para a leitura, foram adicionados 400 μ L de tampão de ligação 1X e posteriormente adquiridos 10.000 eventos de cada amostra no citômetro *Guava Easy Cyte*, MILLIPORE.

3.10. Ensaios de imunoabsorção ELISA para detecção de citocinas/quimiocinas

Por meio do ensaio colorimétrico ELISA, com leitura em espectrofotômetro, foram analisadas as citocinas/quimiocinas IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α e RANTES.

O sobrenadante das células dos diferentes grupos experimentais foi recolhido ao longo dos outros ensaios realizados e para cada citocina/quimiocina analisada, foi seguido protocolo do fabricante:

- MCP-1, IL-8 e TNF- α → fabricante BD Bioscience;
- IL-6, IL-10 e RANTES → fabricante R&D SYSTEMS.

O princípio básico do ensaio colorimétrico de imunoabsorção ELISA é a marcação do antígeno (citocinas/quimiocinas) a anticorpos conjugados a enzimas. Em cada ensaio realizado, o antígeno foi marcado por um anticorpo específico conjugado a uma enzima. Após a lavagem para a retirada dos anticorpos que não se ligaram a nenhum antígeno, foi adicionado ao meio de análise um substrato com a capacidade de reagir com a enzima que foi acoplada ao anticorpo. Esse substrato, por sua vez, é cromogênico, e após a reação, mudou sua cor. Assim, quando houve a presença do antígeno em análise, o material mudou de cor o que possibilitou a análise em espectrofotômetro, cuja intensidade da cor se refere a concentração de substrato que reagiu com a enzima, atestando maior ou menor concentração do antígeno. Este ensaio foi realizado em triplicatas.

3.11. Extração de RNA e confecção do cDNA

O RNA das células HUVEC, Hep-2 e co-cultivo de ambas, controles e tratadas, foi extraído com o método do Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) (Sambrook & Russel, 2001), quantificado em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), e avaliado quanto à integridade pela presença das duas bandas ribossômicas 18S e 28S, em gel de agarose 1%. O cDNA (DNA complementar) foi obtido pela

reação de transcrição reversa com o sistema *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA).

3.12. Seleção de genes de interesse

Os genes a serem estudados neste projeto (*COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*) já haviam sido previamente selecionados a partir dos marcadores potenciais identificados por estudos anteriores (CUNHA et al., 2012), utilizando bibliotecas SAGE. As vias metabólicas desses marcadores potenciais foram avaliadas e alguns genes relacionados a elas também foram escolhidos. No projeto de mestrado de Cunha e colaboradores (2012) esses genes foram apontados como bons marcadores moleculares nessa via de inflamação e como os *primers* já estavam disponíveis no Laboratório da Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva, eles foram disponibilizados para nosso uso. Os iniciadores específicos para cada transcrito foram desenhados com a ferramenta *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>), conforme apresentado abaixo na Tabela 3.

Tabela 3 – Iniciadores para os genes de interesse.

Oligonucleotideo	Sequência
<i>COX2 anti-sense</i>	5' AGAAGGCTTCCCAGCTTTTG 3'
<i>COX2 sense</i>	5' ATTCCCTTCCTTCGAAATGC 3'
<i>EP3 anti-sense</i>	5' TCTCCGTGTGTGTCTTGCAG 3'
<i>EP3 sense</i>	5' AGCTTATGGGGATCATGTGC 3'
<i>EP4 anti-sense</i>	5' CCAAACCTTGGCTGATATAACTGG 3'
<i>EP4 sense</i>	5' CGAGATCCAGATGGTCATCTTAC 3'
<i>MMP2 anti-sense</i>	5' CCGTCAAAGGGGTATCCATC 3'
<i>MMP2 sense</i>	5' AAGTCTGGAGCGATGTGACC 3'
<i>MMP9 anti-sense</i>	5' ATTCGACTCTCCACGCATC 3'
<i>MMP9 sense</i>	5' TTGTGCTCTTCCCTGGAGAC 3'
<i>TIMP1 anti-sense</i>	5' TTTTCAGAGCCTTGGAGGAG 3'
<i>TIMP1 sense</i>	5' ACTGTTGGCTGTGAGGAATG 3'
<i>TIMP2 anti-sense</i>	5' CTATATCCTTCTCAGGCCCTTTG 3'
<i>TIMP2 sense</i>	5' AGAAGGAAGTGGACTCTGGAAC 3'

3.13. PCR quantitativa em tempo real

As reações foram realizadas em termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), no Laboratório de Biomarcadores e Bioinformática Médica, na Faculdade de

Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Todas as reações foram preparadas em triplicatas, incluindo o controle endógeno, o *GAPDH*, e processadas em volume final de 20µL contendo 100 a 500ng de cDNA, SYBR® Green PCR Master Mix e 100nM de cada *primer*, segundo protocolo da Applied Biosystems.

As condições de termociclagem compreenderam uma incubação de 2 min a 50°C, seguida por desnaturação inicial de 10 min a 95°C. Em seguida, o programa continuou com 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, para anelamento de *primers* e extensão das cadeias, e 35 segundos a 65°C, para coleta do sinal. A curva de dissociação foi gerada após amplificação e compreendeu um passo de 15 segundos a 95°C seguido de 1 minuto a 60°C. A quantificação foi realizada comparando-se os valores de expressão obtidos das curvas padrões, as quais foram desenhadas pela diluição seriada a partir de um *pool* de amostras de cDNA. O fator de normalização utilizado foi a média geométrica do gene *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, utilizado como controle interno (controle endógeno). Finalmente, os valores de expressão gênica obtidos nas análises foram quantificados tendo como base a amostra controle, escolhida como calibrador de todas as amostras.

3.14. Análises estatísticas

Para os ensaios de proliferação, citotoxicidade/viabilidade e migração celular foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni. Para o ensaio Cometa, primeiro foi calculado o Índice Total de Danos (ID), por meio da fórmula: $ID\ total = 0.(n\ Classe\ 0) + 1.(n\ Classe\ 1) + 2.(n\ Classe\ 2) + 3.(n\ Classe\ 3)$ e posteriormente foi realizada ANOVA seguida por teste de Bonferroni. Para os ensaios colorimétricos ELISA foi utilizada Análise de Variância (ANOVA), seguida por teste de Dunn. O nível de significância estabelecido foi de 5 % em todos os ensaios, utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0.

A análise dos resultados da PCR quantitativa em tempo real foi a partir dos valores do Ct (*Cycle threshold*) de cada amostra, sendo que foram calculadas as médias das triplicatas. Posteriormente, foi calculado o ΔCt a partir da subtração da média obtida para a sequência de interesse por aquela do controle interno. Para o cálculo do $\Delta-\Delta Ct$, foi escolhida a amostra controle como calibrador, sendo atribuído ao mesmo o valor de zero como resultado da subtração com seu próprio ΔCt . Nas demais amostras (co-cultivadas e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}), o resultado do $\Delta-\Delta Ct$ foi calculado a partir das diferenças dos valores de ΔCt de cada um deles em relação ao controle. Em seguida, foi calculado o $2^{-\Delta-\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001). Finalmente, para uma melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em uma escala logarítmica de base 2 (Log2). Foi considerado aumento ou redução significativa de expressão quando o valor de

expressão foi duas vezes maior ou menor, respectivamente, em relação à amostra controle ou quando esteve acima ou abaixo de 1 quando apresentado na forma de Log2.

4. Resultados

4.1. Morfologia

As células das linhagens Hep-2 e HUVEC, quando aderidas a uma superfície, possuem morfologia irregular, com prolongamentos do citoplasma e núcleo arredondado central (parâmetros que usamos para análise da morfologia celular). Após tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], a morfologia de ambas as células não foi alterada em nenhum dos tempos testados (4, 24, 48 e 72 horas). O co-cultivo das células Hep-2 com as células HUVEC também não alterou a morfologia celular, e nem vice-versa (Figuras 6 e 7).

4.2. Proliferação celular

No ensaio de proliferação celular com a linhagem Hep-2 foi possível observar o crescimento das células tumorigênicas co-cultivadas com a linhagem HUVEC quando comparado com células Hep-2 sem estarem em co-cultivo nos tempos de 48 e 72 horas. Provavelmente, os fatores parácrinos das células endoteliais normais HUVEC induziram essa proliferação, mas quando usamos o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} na concentração de 10µg/mL, o crescimento das células em co-cultivo mostrou-se diminuído após 48 horas de tratamento em relação às células co-cultivadas e não tratadas (Figura 8).

Da mesma forma que ocorreu com a linhagem tumorigênica Hep-2, no co-cultivo das células endoteliais e tumorigênicas, foi observado um aumento da proliferação das células endoteliais normais co-cultivadas (tratadas e não tratadas) em relação às células não co-cultivadas em todos os tempos testados, provavelmente devido aos fatores parácrinos liberados pelas células tumorigênicas. Quando usamos o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} na concentração de 10µg/mL, o crescimento das células HUVEC co-cultivadas foi diminuído após 72 horas de tratamento em relação às células co-cultivadas e não tratadas (Figura 9).

4.3. Citotoxicidade e viabilidade celular

Com base no ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular à base de MTS, foi observado que independente do co-cultivo e do tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} na concentração de 10µg/mL, as células Hep-2 continuaram com viabilidade superior a 50% (linha vermelha, Figura 10) em todos os tempos testados. Ou seja, o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} na concentração de 10µg/mL não se mostrou tóxico para essa linhagem celular. Após 4 horas de tratamento com o peptídeo, foi

possível observar um aumento significativo da viabilidade celular das células Hep-2 co-cultivadas (em relação às células não co-cultivadas e co-cultivadas e não tratadas). O peptídeo juntamente com o co-cultivo das células, possivelmente proporcionou o aumento da viabilidade das células rapidamente e reduziu a viabilidade com tempos mais avançados de tratamento.

Com a linhagem celular HUVEC foi possível observar que o tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} não foi tóxico para essas células, pois aumentou a viabilidade celular em relação às células não co-cultivadas controle e co-cultivadas (tratadas e não tratadas) nos tempos de 24 e 48 horas (Figura 11).

4.4. Migração celular

A figura 12 mostra o ensaio de migração celular das linhagens Hep-2 e HUVEC. Com este ensaio de migração celular foi possível observar que, em ambas as linhagens, o tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL] por 48 horas, bem como o co-cultivo das linhagens, não alteraram significativamente a migração das células. Na linhagem celular Hep-2, observa-se, entretanto, que o co-cultivo reduziu a migração celular e as células co-cultivadas e tratadas com o peptídeo, migraram ainda menos, mesmo não dando diferença significativa, enquanto que na linhagem HUVEC observa-se que o tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} fez com que as células migrassem mais em relação aos controles (com e sem co-cultivo).

4.5. Ensaio Cometa

Com o ensaio Cometa para detecção de genotoxicidade, é observado um aumento de danos no material genético da linhagem Hep-2 quando em co-cultivo com a linhagem HUVEC e tratada com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} (em relação às células co-cultivadas e não tratadas) enquanto que na linhagem HUVEC o co-cultivo aumentou o dano no material genético em relação às células não co-cultivadas, porém o peptídeo não alterou o ID em relação às células não tratadas (efeito de aumento de danos no material genético é do co-cultivo celular) (Figura 13). Os fatores parácrinos liberados pelas células Hep-2 fizeram com que as células HUVEC tivessem mais danos no material genético, indicando que a presença das células tumorigênicas influencia alteração genética nas células do microambiente em que esta se encontra, e que o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} na concentração de 10µg/mL não é capaz de impedir estes danos.

4.6. Citometria de Fluxo

As figuras 14 e 15 mostram, respectivamente, os gráficos das linhagens Hep-2 e HUVEC, referentes à análise de células viáveis, células em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose por meio da citometria de fluxo. Os histogramas representativos (A a D em cada uma das figuras)

mostram os resultados obtidos após incubação com anexina V e PI, em cada grupo de células. A porção Q4 dos histogramas representa o número de células viáveis, ou seja, não apresentam nenhuma marcação, enquanto a porção Q3 mostra o número de células em apoptose. Quando as células epiteliais são incubadas com indutores de apoptose, externalizam o fosfolípido fosfatidilserina na membrana celular, que é marcada pela anexina V. A anexina V é uma proteína que tem alta afinidade com a fosfatidilserina, e pela conjugação dessa com um fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) é possível quantificar o índice de apoptose por citometria de fluxo. A porção Q1 dos histogramas representa o número de células em necrose. Neste caso, os indutores de necrose causam o rompimento na membrana celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático. Assim, a incubação das células com PI, corante que possui alta afinidade para estruturas intracelulares, como o DNA, a marcação pode ser detectada pelo citômetro de fluxo. Como o PI apresenta fluorescência, é possível quantificar a concentração de PI existente no meio intracelular e, consequentemente, verificar o número de células em necrose. A porção Q2 dos histogramas representa o número de células em apoptose tardia, demonstrando a expressão de fosfatidilserina na superfície, quando ocorre ruptura da membrana. Assim, há marcação pela anexina V e coloração com o PI, ou seja, dupla marcação.

Em nosso estudo, observamos que, para ambas as linhagens, Hep-2 e HUVEC, em co-cultivo ou não e tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} ou não, a maior parte das células encontra-se em apoptose tardia após 48 horas.

4.7. Análise de citocinas/quimiocinas por ELISA

As citocinas/quimiocinas analisadas foram: IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, RANTES e TNF- α , sendo que todas são pró-inflamatórias, exceto IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória (Figura 16).

A citocina IL-6 foi liberada por ambas as células, em co-cultivo ou não e tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} ou não, porém não houve diferença significativa da liberação de IL-6 entre os grupos.

A quimiocina IL-8 também foi liberada por ambas as células. Observa-se que a linhagem Hep-2 em co-cultivo com a linhagem HUVEC liberou significativamente mais IL-8 que as células Hep-2 não co-cultivadas, controle ou tratadas com o peptídeo. Possivelmente, os fatores liberados durante o co-cultivo das células, aumentaram a liberação de IL-8 das células Hep-2, tratadas ou não com o peptídeo.

A citocina anti-inflamatória IL-10, assim como a citocina pró-inflamatória IL-6, foi liberada por ambas as células, em co-cultivo ou não e tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} ou controle, porém não houve diferença significativa da liberação de IL-10 entre os grupos.

A quimiocina MCP-1, uma proteína de quimioatração de monócitos, foi altamente liberada por ambas as células em todas as condições, porém não houve diferença significativa de liberação de MCP-1 entre os grupos.

A liberação de RANTES pelas células Hep-2 foi significativamente maior que a liberação da mesma citocina pelas células HUVEC, porém não houve diferença entre as condições da linhagem Hep-2 (co-cultivo e tratamento com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}).

A citocina TNF- α foi, quase que exclusivamente, liberada pelas células HUVEC, sendo que os grupos controle e tratado com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} liberaram significativamente mais TNF- α que as células Hep-2 controles e tratadas com o peptídeo. O co-cultivo das células fez com que as células HUVEC diminuíssem a liberação de TNF- α .

4.8. Padrão de expressão gênica por PCR em tempo real

A figura 17 mostra o padrão de expressão dos genes *COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2* das células Hep-2 tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} e co-cultivadas com as células HUVEC e tratadas e co-cultivadas juntas. As células Hep-2 tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10 μ g/mL] tiveram redução da expressão dos genes *COX-2*, *EP3*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*. Já no co-cultivo, as células Hep-2 não tratadas com o peptídeo tiveram redução da expressão dos genes *COX-2*, *EP4*, *TIMP1* e *TIMP2*, enquanto que as células co-cultivadas e tratadas tiveram redução da expressão dos genes *COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*.

Na linhagem celular HUVEC, as células apenas tratadas com o peptídeo tiveram redução da expressão dos genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, enquanto que o gene *EP3* teve sua expressão aumentada em relação às células controle. As células HUVEC co-cultivadas e não tratadas com o peptídeo mostraram redução de todos os genes em relação às células não co-cultivadas. Já nas células HUVEC co-cultivadas e tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, os genes *COX-2* e *EP4* tiveram redução de expressão e os genes *EP3* e *MMP9* tiveram aumento da expressão (Figura 18).

5. Discussão

O câncer de cabeça e pescoço possui alta taxa de incidência mundial e tem como principal fator de risco o tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas (INCA, 2018), sendo que

aproximadamente 68% dos casos de desenvolvimento desse tipo de câncer tem como causa o tabagismo. Além disso, inflamações persistentes, resultantes de infecções ou autoimunidade, também estão associadas à carcinogênese (LOOMIS et al., 2013) e nesse contexto, a proteína anti-inflamatória ANXA1 tem sido estudada em diversos tipos de tumores e sua expressão, bem como sua função, varia de acordo com o tipo de célula (LIM; PERVAIZ, 2007) e com o microambiente tumoral. O microambiente tumoral também está envolvido na tumorigênese, e esse pode ser alterado por diversos fatores, inclusive influenciar e modificar o comportamento das células tumorigênicas e nossos experimentos exibem essa heterogeneidade.

Em nosso estudo, no ensaio de proliferação celular, observamos que o co-cultivo das linhagens Hep-2 e HUVEC fez com que a proliferação de ambas aumentasse em relação às condições de não co-cultivo. A adição do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} na concentração de 10µg/mL fez com que as células apresentassem redução significativa da proliferação somente quando co-cultivadas. Outros estudos também mostram redução da proliferação de células carcinogênicas pela proteína ANXA1, por exemplo, Wan e colaboradores (2017) mostraram que ANXA1 endógena suprime proliferação e invasão de células escamosas de carcinoma oral humano *in vitro*. Raulf e colaboradores (2018) demonstraram que a proteína ANXA1 possui função supressora de tumor no câncer de cabeça e pescoço e que isso se dá principalmente devido a versão endógena da proteína que parece exercer sua atividade celular autonomamente, afetando a força e a duração dos eventos de sinalização dependentes de EGFR, um receptor tirosina-quinase pertencente à família dos receptores ErbB, altamente expresso nas células de câncer de cabeça e pescoço. Além disso, ANXA1 regula a liberação exossômica de fosfo-EGFR e, assim, modula comunicação célula-célula.

No estudo de GAO e colaboradores (2014), foi observado que a expressão aumentada de ANXA1 reduz a viabilidade de células de tumor gastrointestinal humano, inibindo a produção de COX-2 (enzima responsável pela produção de prostaglandinas), enquanto a superexpressão de COX-2 pode reduzir este efeito produzido por ANXA1, porém em nossa análise de citotoxicidade/viabilidade celular, observamos que o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} não altera a viabilidade celular, em situação de co-cultivo ou não, de ambas as células, ou seja, as células permaneceram com viabilidade celular $\geq 50\%$ (IC₅₀). Nossos resultados contrastam ainda com os resultados de Hsiang e colaboradores (2006), que observaram que em linhagens celulares de câncer de próstata, a superexpressão de ANXA1 resultou na redução da viabilidade celular e formação de colônias, aumentou apoptose celular e suprimiu a resposta das células a fatores de crescimento.

Outro processo biológico importante avaliado no nosso estudo foi a migração celular, que é um evento crucial na invasão de células tumorais e metastáticas. Essa invasão das células tumorais em tecido circundante envolve a migração ativa dessas células através da barreira endotelial (HURD; DEGENNARO; LEHMANN, 2011). Em nosso ensaio de migração celular, constatamos que o tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} não alterou significativamente a migração celular das linhagens Hep-2 e HUVEC, assim como também não o fez o co-cultivo das linhagens. Os fatores parácrinos liberados pelas células não fizeram com que o padrão de migração fosse modificado. No câncer de mama ocorre o contrário, a ANXA1 promove o aumento da migração celular e metástase de diversas maneiras: diminuindo a capacidade das células produzirem mecanismos de adesão, regulando a expressão de microRNAs, como por exemplo o miR196a, um microRNA anti-migratório, criando um feedback negativo que aumenta a migração das células, e também por meio da associação de ANXA1 com proteínas reguladoras de NF- κ B e com receptores proteína-quinase 1, ativando constitutivamente NF- κ B, que por sua vez ativa a proteína quinase ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*) e promove migração das células (MORAES; AMPOMAH; LIM, 2018). Ainda, o estudo de Moreira e colaboradores (2015) mostrou redução da migração celular da linhagem SiHa após aplicação do peptídeo ANXA1_{Ac2-26}.

Além do evento migratório das células, o estudo dos danos no DNA também se faz importante. Para isso, o ensaio Cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única, que é um método sensível utilizado para detecção de danos na fita de DNA, é utilizado em diversos tipos de pesquisas como testes de genotoxicidade, biomonitoramento humano, ecogenotoxicologia e em pesquisas básicas sobre o mecanismo de dano e reparo da molécula de DNA (PASSAMANI, 2017). Detectamos, em nosso ensaio de genotoxicidade, que o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} não alterou o Índice de Danos (ID) das células, porém, nas células Hep-2, o peptídeo junto com o co-cultivo, aumentou o dano no material genético em relação às células co-cultivadas e não tratadas, e as células HUVEC, co-cultivadas, tiveram mais danos no material genético em relação às células não co-cultivadas (tratadas ou não com o peptídeo), indicando que a presença das células tumorigênicas influencia alteração genética nas células do microambiente onde estas se encontram. Mas a presença da ANXA1 exógena, no co-cultivo, também deve ter aumentado o número de danos em relação às células não tratadas, pois no estudo de Liao e colaboradores (2018), foi observado que a baixa expressão de ANXA1 em camundongos *knockdown* inibe danos no DNA de células de carcinoma de nasofaringe após irradiação por meio da diminuição da geração de espécies reativas de oxigênio intracelular e a formação de histonas H2AX fosforiladas (ensaio sensível para demonstrar quebras do DNA) e ainda promove a reparação do DNA por meio do aumento da atividade da proteína quinase dependente de DNA.

Outro importante processo biológico investigado no nosso estudo foi a apoptose, que é o processo de morte celular programada, caracterizado por mudanças na membrana e no citoplasma das células e condensação da cromatina (PLATI; BUCUR; KHOSRAVI-FAR, 2011; HASSAN et al., 2014; PAZ et al., 2018). A apoptose pode ser controlada por diversos genes, entre eles os que controlam o ciclo celular, por exemplo, o gene *p53*, que está associado diretamente com o controle da apoptose regulando a expressão de dois genes relacionados com esse processo, *BCL2* (anti-apoptótico) e *BAX* (pró-apoptótico), de diferentes formas (ELMORE, 2007). A proteína ANXA1 também está relacionada com regulação da apoptose, segundo a revisão de Biaoxue e colaboradores (2014). Há grupos que sugerem que essa proteína atua como fator pró-apoptótico, enquanto outros grupos relacionam o envolvimento da proteína com resistência a apoptose (GUO; LIU; SUN, 2013; CARDIN, 2016). Em nosso estudo, observamos que as células Hep-2 e HUVEC, co-cultivadas e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, estavam em maior número em apoptose tardia. Mais estudos são necessários para avaliar porque as células foram marcadas como estando em apoptose tardia no ensaio de citometria de fluxo.

Além do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} induzir as células a apoptose, também altera o padrão de liberação de citocinas/quimiocinas. Lacerda e colaboradores (2018), em um estudo com transplante de pele em camundongos, mostraram que o tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} aumentou a sobrevivência de enxertos transplantados induzindo a resolução da inflamação no tecido por meio da redução de neutrófilos e aumento da apoptose dessas células nos locais de transplante. O tratamento com ANXA1_{Ac2-26} ainda proporcionou aumento da angiogênese no tecido transplantado, migração de fibroblastos, aumento de fatores de crescimento como TGF- β 1 e proteínas VEGF-A e redução dos níveis de mediadores pró-inflamatórios IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17 e IFN- γ . Outros estudos, *in vivo* e *in vitro*, também demonstraram a redução de citocinas pró-inflamatórias em modelos de uveíte e doença autoimune de retina (GIROL et al., 2013; YAZID et al., 2015; CARDIN et al., 2017). A redução de citocinas pró-inflamatórias em locais de inflamação pode prevenir o desenvolvimento neoplásico. No início do processo neoplásico, as células inflamatórias liberam componentes que propiciam o crescimento tumoral promovendo instabilidade genômica nas células do microambiente e angiogênese. Daí a importância do controle dos componentes pró-inflamatórios no microambiente tumoral, favorecendo ou inibindo progressão tumoral (FLAVELL et al., 2010; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; GASTARDELO et al., 2014). Em nosso estudo, observamos que o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} não reduziu significativamente a liberação de nenhuma das citocinas/quimiocinas pró e anti-inflamatórias testadas, mas a quimiocina IL-8 teve liberação aumentada quando co-cultivada com

a linhagem HUVEC, que possivelmente ocorreu devido aos fatores parácrinos liberados pelas células endoteliais que induziram as células Hep-2 liberarem mais IL-8, na presença ou ausência do peptídeo. Com esse resultado do ensaio ELISA para detecção da liberação das citocinas/quimiocinas, observamos que o peptídeo não causou o efeito de redução das citocinas pró-inflamatórias, isso possivelmente se deve ao fato de que, nas células Hep-2, a influência da interação dos fatores parácrinos liberados pelas células do microambiente, associado ao tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} não esteja exercendo o controle do processo inflamatório. No estudo de Gastardelo e colaboradores (2014), foi observado redução da liberação de IL-6, IL-8 e MCP-1 pelas células Hep-2 após tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, porém, a concentração do peptídeo usada pelos pesquisadores foi diferente da que usamos, e ainda, o grupo não testou a influência da interação entre células e fatores liberados pelas mesmas. Visto que o papel exato da proteína ANXA1 varia de acordo com a célula, e ainda, que o estímulo por fatores parácrinos e diversos outros fatores podem modificar a expressão das citocinas, são necessários mais estudos para a descoberta de que, se no câncer de cabeça e pescoço, essa proteína age como promotora ou supressora tumoral.

Para tentar encontrar o papel da ANXA1 no câncer de cabeça e pescoço, realizamos ainda a análise de expressão de uma cascata gênica, observando o padrão de expressão dos genes *COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, que estão relacionados com respostas inflamatórias e o processo de invasão tumoral.

O gene da proteína ciclo-oxigenase-2 (*COX-2*) é altamente expresso em diversos tumores humanos, incluindo o de colorretal, de mama, de próstata, de pulmão e de fígado (RIZZO, 2011; ZHANG et al., 2017). A proteína ciclo-oxigenase 2 é responsável por converter o ácido araquidônico em prostaglandinas, especialmente prostaglandina E2 (PGE2) (GAN et al., 2016). A superexpressão de *COX-2* pode influenciar nas características tumorigênicas das células, incluindo inibição de apoptose, regulação da adesão da matriz extracelular, aumento da angiogênese, aumento do potencial metastático. No câncer gástrico e no câncer colorretal, o aumento da expressão de *COX-2* está diretamente relacionado com a transformação de lesões pré-cancerosas para tumores malignos (ZHANG et al., 2017). No câncer de mama, a superexpressão de *COX-2* em macrófagos associados a tumores (TAMs) está relacionada com metástase nos linfonodos e ao potencial metastático das células de câncer de mama. *COX-2* nos TAMs induz a expressão de *MMP9*, promove a transição epitelial-mesenquimal e ainda promove a liberação de IL-6 (GAN et al., 2016). Em nosso estudo, encontramos que o gene *COX-2* estava com expressão reduzida nas células Hep-2 tratadas com o peptídeo, co-cultivadas e co-cultivadas e tratadas e nas células HUVEC co-cultivadas tratadas e não tratadas com o peptídeo. Nas células HUVEC é possível

observar que os fatores parácrinos liberados pelas células tumorais fizeram com que a expressão de *COX-2* fosse muito reduzida em relação às células não co-cultivadas. Já nas células Hep-2, ocorreu o contrário: as células Hep-2 somente tratadas com o peptídeo, não co-cultivadas, apresentaram menor expressão de *COX-2* do que as células co-cultivadas (tratadas e não tratadas).

EP3 e EP4 são dois receptores de membrana acoplados à proteína G que desencadeiam cascatas celulares diferentes. Eles fazem parte de uma família de receptores, os EPs 1-4. EP2 e EP4 são receptores acoplados à proteínas G/proteína quinase A/adenilato ciclase e induzem a elevação do nível de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) – ativador da glicogênio sintetase quinase 3 (GSK3), e a GSK3 está envolvida na proliferação celular, por promover a fosforilação da proteína β -catenina e sua degradação pelo proteossoma 26S (REGULSKI et al., 2016). EP1 medeia elevação do cálcio intracelular e ativação de fosfolipase C. EP3 existe em múltiplas isoformas; oito isoformas diferentes são encontradas em humanos. A maior parte das isoformas de EP3 inibe a geração de cAMP e algumas isoformas aumentam os níveis de cálcio, como EP1 o faz (SEMMLINGER et al., 2018).

A ligação de PGE2 aos receptores EPs promove ativação e clivagem de metaloproteinases de membrana (MT-MMP) as quais interagem com pró-MMPs convertendo-as em formas ativas, bloqueando a ligação das MMPs aos seus inibidores TIMPs (Inibidores das metaloproteinases da matriz). As células cancerígenas metastáticas digerem e dissolvem a matriz extracelular e a membrana basal, quando há secreção e ativação de MMPs que não são inibidas pelos TIMPs (LARKINS et al. 2006; LEE et al., 2011). MMPs são metaloproteinases de matriz, uma família de enzimas associadas com destruição tecidual em diversas patologias, entre elas, o câncer. A alta expressão de MMPs em diversos tipos de câncer tem sido relacionada com agressividade tumoral. MMPs são produzidas por células tumorais e possuem forte atividade proteolítica de componentes da matriz extracelular, como colágeno, vitronectina, fibronectina, gelatina e proteoglicanos. Os inibidores de MMPs são chamados de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e possuem papel importante na invasão tumoral (JUCHNIEWICZ et al., 2017). TIMPs bloqueiam a atividade de MMPs e nas células de câncer há desequilíbrio da produção MMP-TIMP, favorecendo a produção de MMPs. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um dos fatores secretados pelas células tumorais ou inflamatórias. Esse fator se liga ao seu receptor na célula endotelial e estimula a produção de MMPs e induz proliferação (SARTAKHTI; MANSHAEI; SADEGHI, 2017).

Em nosso trabalho, encontramos que, nas células Hep-2, os genes *EP3* e *EP4* estão, de forma geral, com expressão diminuída em relação às células controle. Já nas células HUVEC, quando apenas tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, o gene *EP3* está menos expresso e o gene

EP4 não apresentou diferença de expressão em relação às células controles, nas células apenas co-cultivadas, *EP3* e *EP4* estão com expressão reduzida, e nas células co-cultivadas e tratadas com o peptídeo, *EP3* está com expressão aumentada, enquanto que *EP4* está com expressão diminuída em relação às células não co-cultivadas e não tratadas. As células expressarem menos *EP3* e *EP4* condiz com nossos resultados da baixa expressão de *COX-2*, já que *PGE2* se liga aos receptores EPs. As células HUVEC co-cultivadas e tratadas com o peptídeo apresentaram expressão de *EP3* aumentada, ou seja, os fatores parácrinos do microambiente sob ação do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} elevaram a expressão de *EP3* nestas células, efeito que possivelmente está sendo causado pelo peptídeo. Mais estudos são necessários para verificar o papel exato da interação entre células endoteliais e tumorigênicas e do peptídeo provocando elevação da expressão de *EP3* nas células HUVEC.

Juchniewicz e colaboradores (2017) verificaram que, no câncer esofágico, há superexpressão de *MMP7*, *MMP10*, *TIMP1* e *TIMP2*, ou seja, aumento da expressão de *TIMPs* e *MMPs*, já em nosso trabalho, verificamos que o tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26}, o co-cultivo celular e ambos, fizeram com que as células Hep-2 expressassem significativamente menos os genes *TIMP1* e *TIMP2*. As células Hep-2 co-cultivadas e tratadas com peptídeo e as células somente tratadas expressaram menos os genes *MMP2* e *MMP9* em relação ao co-cultivo sem o tratamento, então provavelmente o peptídeo seja o responsável pela redução da expressão destes genes (*MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*) já que apenas o meio condicionado (co-cultivo) não foi o suficiente para reduzir tanto essa expressão.

Nas células HUVEC, o tratamento com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} e o co-cultivo celular fizeram com que as células expressassem menos os genes *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*, porém, o co-cultivo junto com o tratamento fez com que as células HUVEC expressassem mais o gene *MMP9*. Possivelmente as células HUVEC expressaram mais o gene *MMP9* ao combinar o tratamento com o peptídeo e co-cultivo celular, devido aos fatores parácrinos do microambiente que estimularam estas células a expressarem mais *MMP9* para poderem gerar alguma resposta de “invasão” destas células.

Se *MMP2* e *MMP9* são genes responsáveis, entre outras funções, por permitirem que as células causem destruição tecidual para potencial invasão de outros tecidos que não os de origem, então o meio condicionado do microambiente, juntamente com a ação do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} está estimulando as células HUVEC a expressarem mais *MMP9*, consequentemente, a aumentarem o potencial metastático. Apenas o co-cultivo celular ou apenas o tratamento com o peptídeo não é suficiente para que as células HUVEC expressem mais *MMP9*, porém quando os dois fatores são combinados, co-cultivo e tratamento, o efeito é invertido e as células expressam

mais *MMP9*, o que poderia gerar um potencial metastático nas células. Então, os fatores parácrinos do microambiente, sob efeito da ação do peptídeo, fazem com que as células expressem mais *MMP9* e isto pode ocorrer porque as células HUVEC, por mecanismos de defesa, já que estão no mesmo ambiente que as células tumorigênicas Hep-2, expressam mais *MMP9* como forma defensiva para saírem deixando o ambiente, ou estas células expressam mais *MMP9* porque os fatores parácrinos das células tumorigênicas e a ação do peptídeo estimulam as células normais endoteliais a também terem o comportamento metastático, que é uma característica das células tumorigênicas.

Poucos estudos têm avaliado o efeito do peptídeo ANXA1_{Ac2-26} na expressão dos genes estudados, especialmente relacionando esta cascata gênica inflamatória com câncer de cabeça e pescoço, mas nosso estudo mostrou, pela primeira vez, que o peptídeo promove a redução significativa da expressão desses genes. Ainda, acrescentamos conhecimento sobre a interação celular entre células endoteliais e tumorigênicas modular a expressão dos genes, mostrando como os fatores parácrinos liberados pelas células tumorais Hep-2 e células endoteliais normais HUVEC influenciam diretamente na expressão gênica destas células. Assim, mostramos que tanto a interação entre células e fatores liberados no microambiente como o peptídeo, possuem um importante papel de bloqueio na via inflamatória e de invasão tumoral.

6. Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que o efeito do meio condicionado por células tumorais (Hep-2) em células endoteliais (HUVEC) e vice-versa, tratadas com o peptídeo sintético da proteína ANXA1:

- não modifica a morfologia e a migração celular, mas altera a proliferação;
- não é citotóxico, porém é genotóxico;
- induz ao processo de apoptose tardia;
- modifica a expressão das citocinas/quimiocinas IL-8, RANTES e TNF- α .
- modula a expressão dos genes *COX-2*, *EP3*, *EP4*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2*.

Assim, concluímos que a interação entre células endoteliais e tumorigênicas, juntamente com a ação do ANXA1_{Ac2-26} nas células endoteliais e/ou tumorais, participam do processo tumorigênico, provavelmente por mecanismos relacionados às vias anti-proliferativas, apoptóticas e/ou inflamatórias e abrem novas possibilidades de estudos para alternativas terapêuticas no câncer de cabeça e pescoço.

7. Referências Bibliográficas

ABRAHAO, A. C.; CASTILHO, R. M.; SQUARIZE, C. H.; MOLINOLO, A. A.; SANTOS-PINTO, J. R. D.; GUTKIND, J. S. A role for COX2- derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. **Oral Oncol**, v.46, n.12, p.880-7, 2010.

AGGARWAL, B. B.; GEHLOT, P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? **Curr Opin Pharmacol**, v.9, n.4, p.351-69, 2009.

AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R.V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 2, p. 425-30, 2009.

ALVES, V. A. F.; NONOGAKI, S.; CURY, P. M.; WÜNSCH-FILHO, V.; DE CARVALHO, M. B.; MICHALUART-JÚNIOR, P.; MOYSES, R. A.; CURIONI, O. A.; FIGUEIREDO, D. L.; SCAPULATEMPO-NETO, C.; PARRA, E. R.; POLACHINI, G. M.; SILISTINO-SOUZA, R.; OLIANI, S. M.; SILVA-JÚNIOR, W. A.; NOBREGA, F. G.; Head and Neck genome project/GENCAPO, TAJARA, E. H.; ZAGO, M. A. Annexin A1 subcellular expression in laryngeal squamous cell carcinoma. **Histopathology**, Oxford. v.53, p.715 - 27, 2008.

BASHEER, H. A.; PAKANAVICIUS, E.; COOPER, P. A.; SHNYDER, S. D.; MARTIN, L.; HUNTER, K. D.; VINADER, V.; AFARINKIA, K. Hypoxia modulates CCR7 expression in head and neck cancers. **Oral Oncology**, 80, 64–73, 2018.

BIAOXUE, R.; XIGUANG, C.; SHUANYING, Y. Annexin A1 in malignant tumors: current opinions and controversies. **International Journal of Biological Markers**, v.29, n.1, 2014.

BODNAR, M.; SZYLBERG, L.; KAZMIERCZAK, W.; MARSZALEK, A. Tumor progression driven by pathways activating matrix metalloproteinases and their inhibitors. **J Oral Pathol Med**. 44:437–443, 2015.

BOURBOULIA, D.; HAN, H.; JENSEN-TAUBMAN, S.; GAVIL, N.; ISAAC, B.; WEI, B.; NECKERS, L.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Semin Cancer Biol**. vol.20, n.3, p.161-168, 2013.

CANEVARI, R. A.; ROGATTO, S. R. **Câncer de cabeça e pescoço**. In: FERREIRA C.G., CASALLI J.C.R., organizadores. **Oncologia molecular**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 189-203, 2004.

CARDIN, Laila Toniol. **Ação do peptídeo ANXA1_{AC2-26} e interação vascular em carcinoma de colo de útero**. 2016, 35 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Genética, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, CAMPUS de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2016.

CARDIN, L. T.; SONEHARA, N. M.; MIMURA, K. K.; RAMOS DINARTE DOS SANTOS, A.; DA SILVA, W. A. JR.; SOBRAL, L. M.; LEOPOLDINO, A. M.; DA CUNHA, B. R.; TAJARA, E. H.; OLIANI, S. M.; RODRIGUES-LISONI, F. C. ANXA1_{AC2-26} peptide, a possible therapeutic approach in inflammatory ocular diseases. **Gene**, v.30, p.26-36, 2017.

CIRINO, G.; CICALA, C.; SORRENTINO, L.; CILIBERTO, G.; ARPAIA, G.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. **British journal of pharmacology**, v.108, n.3, p.573–4, mar. 1993.

CLEVERS, H. At the crossroads of inflammation and cancer. **Cell**, Cambridge, v.118, n.6, p.671-674, 2004.

CRIPPEN, M. M.; PATEL, N.; FILIMONOV, A.; BRADY, J.S.; MERCHANT, A.; BAREDES, S.; PARK, R. C. W. Association of smoking tobacco with complications in Head and Neck microvascular reconstructive surgery. **JAMA Facial Plast Surg**, v.21, p.20-26, 2019.

CUNHA, B. R.; TAJARA, E. H. **Investigação do perfil de expressão gênica e proteica de componentes do microambiente tumoral**. Universidade de São Paulo - Instituto de Biociências, 2012.

DAMAZO, A. S.; YONA, S.; D'ACQUISTO, F.; FLOWER, R. J.; OLIANI, S. M.; PERRETTI, M. Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. **The American journal of pathology**, v.166, n.6, p.1607–1617, 2005.

DAMAZO, A. S.; YONA, S.; FLOWER, R. J.; OLIANI, S. M.; PERRETTI, M. Spatial and Temporal Profiles for Anti-Inflammatory Gene Expression in Leukocytes during a Resolving Model of Peritonitis. **The Journal of Immunology**, v.176, n.7, p.4410–4418, 2006.

DE WEVER, O.; MAREEL, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **The Journal of pathology**, v.200, n.4, p.429–447, 2003.

DIAKOS, C. I.; CHARLES, K. A.; MCMILLAN, D. C.; CLARKE, S. J. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. **Lancet Oncol**, v.15, p.493-503, 2014.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **The New England journal of medicine**, v.315, n.26, p.1650–1659, 1986.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v.35, n.4, p.495–516, jun. 2007.

FARROW, B.; SUGIYAMA, Y.; CHEN, A.; UFFORT, E.; NEALON, W.; EVERSB, M. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. **Annals of Surgery**, Philadelphia v.239, n.6, p.763-771, 1990.

FEDERICO, A.; MORGILLO, F.; TUCCILLO, C.; CIARDIELLO, F.; LOGUERCIO, C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **Int J Cancer**, v.121, n.11, p.2381-6, 2007.

FLAVELL, R. A.; SANJABI, S.; WRZESINSKI, S. H.; LICONA-LIMON, P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . **Nat Rev Immunol**, v.10: 554–567, 2010.

FLOWER, R. J. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **J Pharmacol**, v.94, p.987-1015, 1988.

FRANCHI, A.; SANTUCCI, M.; MASINI, E.; SARDI, I.; PAGLIERANI, M.; GALLO, O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. **Cancer**. 95(9) p.1902-10, 2002.

GAN, L.; QIU, Z.; HUANG, J.; LI, Y.; HUANG, H.; XIANG, T.; WAN, J.; HUI, T.; LIN, Y.; LI, H.; REN, G. Cyclooxygenase-2 in tumor associated macrophages promotes metastatic potential of breast cancer cells through Akt pathway. **Int J Biol Sci**, v.12, p.1533-1543, 2016.

GAO, Y.; CHEN, Y.; XU, D.; WANG, J.; YU, G. Differential expression of ANXA1 in benign human gastrointestinal tissues and cancers. **Biomed Central Cancer**, China, v.14, 2014.

GASTARDELO, T. S.; CUNHA, B. R.; RAPOSO, L. S.; MANIGLIA, J. V.; CURY, P. M.; RODRIGUES-LISONI, F. C.; TAJARA, E. H.; OLIANI, S. M. Inflammation and cancer: role of annexin A1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma. **PloS one**, v.9, 2014.

GAVINS, F. N. E.; DALLI, J.; FLOWER, R. J.; GRANGER, D. N.; PERRETTI, M. Activation of the annexin 1 counter-regulatory circuit affords protection in the mouse brain microcirculation. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.21, n.8, p.1751–1758, 2007.

GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: from structure to function. **Physiol. Rev**, v.82, p.331–371, 2002.

GIBBS, L.; CAROLLO, M. G.; DAMAZO, A. S.; OLIANI, S. M.; PERRETTI, M. Time-dependent expression of annexin 1 in a model of chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, Basel. v.51, n.6, p.300-6, 2002.

GIMENES, A. D.; ANDRADE, T. R. M.; MELLO, C. B.; RAMOS, L.; GIL, C. D.; OLIANI, S. M. Beneficial effect of annexin A1 in a model of experimental allergic conjunctivitis. **Experimental Eye Research**, v.134, p.24–32, 2015.

GIROL, A. P.; MIMURA, K. K. O.; DREWES, C. C.; BOLONHEIS, S. M.; SOLITO, E.; FARSKY, S. H. P.; GIL, C. D.; OLIANI, S. M. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **The Journal of Immunology**, v.190, p.5689–701, 2013.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. **Comet assay for detection of DNA damage and repair in individual cells**. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, editors. Mutagênese ambiental. Canoas, RS, Brazil: ULBRA Inc.; p. 247–75, 2003.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v.140, p.883–899, 2010.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. **Ann Rheum Dis**, v.70 Suppl 1, p.104-8, 2011.

GUEDEZ, L.; JENSEN-TAUBMAN, S.; BOURBOULIA, D.; KWITYN, C. J.; WEI, B.; CATERINA, J.; STETLER-STEVENSON, W. G. TIMP-2 targets tumor associated-myeloid

suppressor cells with effects in cancer immune dysfunction and angiogenesis. **J Immunother**, vol.35, n.6, p.502–512, 2012.

GUO, C.; LIU, S.; SUN, M., Z. Potential role of ANXA1 in cancer. **Future oncology**. London, v.9, p.1773–93, 2013.

GUPTA, A.; AGRAWAL, G.; TIWARI, S.; VERMA, K.; AGRAWAL, R.; CHOUDHARY, V. Pectoralis major myocutaneous flap in head and neck reconstruction: an interesting experience from central India regional cancer center. **Int J Res Med Sci**, v.3, p.3065-8, 2015.

HAN, G. H.; LU, K. J.; HUANG, J. X.; ZHANG, L. X.; DAI, S. B.; DAI, C. L. Association of serum annexin A1 with treatment response and prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.14, p.667-74, 2018.

HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, 2014.

HSIANG, C. H.; TUNODA, T.; WHANG, Y. E.; TYSON, D. R.; ORNSTEIN, D. K. The impact of altered annexin I protein levels on apoptosis and signal transduction pathways in prostate cancer cells. **Prostate**, v.66, p.1413–1424, 2006.

HURD, T. R.; DEGENNARO, M.; LEHMANN, R. Redox regulation of cell migration and adhesion. **Trends Cell Biol**, v.22, p.107–115, 2011.

JORGE, Y. C.; MATARUCO, M. M.; ARAÚJO, L. P.; ROSSI, A. F. T.; DE OLIVEIRA, J. G.; VALSECHI, M. C.; CAETANO, A.; MIYAZAKI, K.; FAZZIO, C. S. J.; THOMÉ, J. A.; RAHAL, P.; OLIANI, S. M.; SILVA A. E. Expression of Annexin-A1 and Galectin-1 Anti-Inflammatory Proteins and mRNA in Chronic Gastritis and Gastric Cancer. **Mediators of Inflammation**, v.2013, p.11, 2013.

JUCHNIEWICZ, A.; KOWALCZUK, O.; MILEWSKI, R.; LAUDAŃSKI, W.; DZIĘGIELEWSKI, P.; KOZŁOWSKI, M.; NIKLIŃSKI, J. MMP-10, MMP-7, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in esophageal cancer. **Acta Biochim Pol**, v.64, p.295-99, 2017.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun**, v.3, p.103-115, 1995.

LACERDA, J. Z.; DREWES, C. C.; MIMURA, K. K. O.; ZANON, C. F.; ANSARI, T.; GIL, C. D.; GRECO, K. V.; FARSKY, S. H. P.; OLIANI, S. M. Annexin A1₂₋₂₆ treatment improves skin heterologous transplantation by modulating inflammation and angiogenesis processes. **Frontiers in Pharmacology**, 9:1015, 2018.

LARKINS, T. L.; NOWELL, M.; SINGH, S.; SANFORD, G. L. Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. **BMC Cancer**, v.6, n.181, 2006.

LEE, J.; BANU, S. K.; SUBBARAO, T.; STARZINSKI-POWITZ, A.; AROSH, J. A. Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 inhibits invasions of human immortalized

endometrial epithelial and stromal cells through suppressions of metalloproteinases. **Mol Cell Endocrinol**, vol.332, n.1-2, p.306-13, 2011.

LEE, J.; BANU, S. K.; NITHY, T. K.; AROSH, J. A. Early pregnancy induced expression of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 in the ovine endometrium and regulated by interferon tau through multiple cell signaling pathways. **Mol Cell Endocrinol**, v.348, n.1, p.211-23, 2012.

LIAO, L.; YAN, W.-J.; TIAN, C.-M.; LI, M.-Y.; TIAN, Y.-Q.; ZENG, G.-Q. Knockdown of Annexin A1 enhances radioresistance and inhibits apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v.17, p.1-10, 2018.

LIM, L. H.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **The FASEB J**, v.21, p.968-75, 2007.

LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; LAUBY-SECRETAN, B.; EL GHISSASSI, F.; BOUVARD, V.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; BAAN, R.; MATTOCK, H.; STRAIF, K. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER MONOGRAPH WORKING GROUP IARC. The carcinogenicity of outdoor air pollution. **The Lancet. Oncology**, v.14, n.13, p.1262-3, 2013.

MOILANEN, M.; PIRILA, E.; GRENMAN, R.; SORSA, T.; SALO, T. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. **J Pathol**, v.197, p.72-81, 2002.

MORAES, L. A.; AMPOMAH, P. B.; LIM, L. H. K. Annexin A1 in inflammation and breast cancer: a new axis in the tumor microenvironment. **Cell Adhesion & Migration**, p.1-7, 2018.

MOREIRA, Heloisa Trindade. **Análise celular e molecular do efeito da proteína anti-inflamatória Anexina A1 nas células de carcinoma de colo de útero**. 2015. 68 f. Tese (Mestrado) – Programa de Genética, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2015.

MUELLER, M. M.; FUSENIG, N. E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v.4, n.11, p.839-49, 2004.

NEURATH, M. F.; FINOTTO, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.22, n.2, p.83-9, 2011.

OLIANI, S. M.; PAUL-CLARK, M. J.; CHRISTIAN, H. C.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Neutrophil interaction with inflamed post-capillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **The American Journal of Pathology**, v.158, p.603-615. 2001.

OLIANI, S. M.; CIOCCA, G. A.; PIMENTEL, T. A.; DAMAZO, A. S.; GIBBS, L.; PERRETTI, M. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, Basel, v.57, n.10, p.450-6, 2008.

PARISI, J. S.; CORRÊA, M. P.; GIL, C. D. Lack of endogenous Annexin A1 increases mast cell activation and exacerbates experimental atopic dermatitis. **Cells**, v.8, 51, 2019.

PASSAMANI, Paulo Zanchetta. **Adaptação da metodologia de ensaio cometa para avaliação de genotoxicidade do glifosato em milho (*Zea mays* L.)**. 88 f. Tese (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

PERRETTI, M.; GETTING, S. J.; SOLITO, E.; MURPHY, P. M.; GAO, J. L. Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. **The American Journal of Pathology**, Bethesda. v.158, n.6, p.1969-73, 2001.

PERRETTI, M.; DALLI, J. Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. **British Journal of Pharmacology**, v.158, n.4, p.936, 2009.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, London, v.9, n.29, p.2002-07, 2001.

PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. **Integrative Biology**, v.3, p.279–296, 2011.

POETER, M.; RADKE, S.; KOESE, M.; HESSNER, F.; HEGEMANN, A.; MUSIOL, A.; GERKE, V.; GREWAL, T.; RESCHER, U. Disruption of the annexin A1/S100A11 complex increases the migration and clonogenic growth by dysregulating epithelial growth factor (EGF) signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v.1833, n.7, p.1700–11, 2013.

POLLI-LOPES, A. C.; ESTOFOLETE, C. F.; OLIANI, S. M.; ZUCOLOTO, S.; CUNHA, F.; GIL, C. D. Myenteric denervation in gastric carcinogenesis: differential modulation of nitric oxide and annexin-A1. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.6, n.1, p.13, 2013.

POSSEBON, L.; COSTA, S. S.; SOUZA, H. R.; AZEVEDO, L. R.; SANT'ANA, M.; IYOMASA-PILON, M. M.; OLIANI, S. M.; GIROL, A. P. Mimetic peptide AC2-26 of annexin A1 as a potential therapeutic agent to treat COPD. **International Immunopharmacology**, v.63, p.270–281, 2018.

POWELL, D. W.; MIFFLIN, R. C.; VALENTICH, J. D.; CROWE, S. E.; SAADA, J. I.; WEST, A. B. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. **The American journal of physiology**, v.277, n.1, p.C183–C201, 1999.

PRATES, J.; FRANCO-SALLA, G. B.; DINARTE DOS SANTOS, A. R.; DA SILVA, W. A. JR, DA CUNHA, B. R.; TAJARA, E. H.; OLIANI, S. M.; RODRIGUES-LISONI, F. C. ANXA1_{Ac2-26} peptide reduces ID1 expression in cervical carcinoma cultures. **Gene**, v.570, n.2, p.248-254, 2015.

RAULF, N.; LUCARELLI, P.; THAVARAJ, S.; BROWN, S.; VICENCIO, J. M.; SAUTER, T.; TAVASSOLI, M. Annexin A1 regulates EGFR activity and alters EGFR-containing tumour-derived exosomes in head and neck cancers. **European Journal of Cancer**, v.102, p.52-68, 2018.

RAYNAL, P.; POLLARD, H. B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1197, n.1, p.63–93, 1994.

REGULSKI, M.; REGULSKA, K.; PRUKAŁA, W.; PIOTROWSKA, H.; STANISZ, B.; MURIAS, M. COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer. **Drug discovery today**, v.21, n.4, p.598–615, 2016.

RETTORI, M. M.; DE CARVALHO, A. C.; LONGO, A. L.; DE OLIVEIRA, C. Z.; KOWALSKI, L. P.; CARVALHO, A. L.; VETTORE, A. L. TIMP3 and CCNA1 hypermethylation in HNSCC is associated with an increased incidence of second primary tumors. **J Transl Med**, 11:316, 2013.

RIZZO, M. T. Cyclooxygenase-2 in oncogen. **Clínica Chimica Acta**, v.412, p.671–687, 2011.

ROBINSON-BENNETT, B. L.; DEFORD, J.; DIAZ-ARRASTIA, C. LEVINEL.; WANGH-Q.; HANNIGANE, V. Implications of tyrosine phosphoproteomics in cervical carcinogenesis. **Journal of carcinogenesis**, v.7, n.2, p.1–10, 2008.

RODRIGUES-LISONI, F. C.; HENRIQUE, T.; TAJARA, E. H. ANXA1 (annexin A1). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, v.15, n.2, p.117–121, 2011.

RODRIGUES-LISONI, F. C.; MEHEMET, D. K.; PEITL, P.; JOHN, C. D.; TAJARA, E. H.; BUCKINGHAM, J. C.; SOLITO, E. *In vitro* and *in vivo* studies on CCR10 regulation by Annexin A1. **FEBS Letters**, v.580, n.5, p.1431–1438, 2006.

RONNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O. W. ADP-ribosylation of actins in fibroblasts and myofibroblasts by botulinum C2 toxin: influence on microfilament morphology and migratory behavior. **Electrophoresis**, v.17, n.11, p.1776–1780, 1996.

SANSONE, P.; BROMBERG, J. Environment, inflammation, and cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v.21, n.1, p.80-5, 2011.

SARTAKHTI, J.; MANSHAEI, M. H.; SADEGHI, M. MMP–TIMP interactions in cancer invasion: An evolutionary game-theoretical framework. **Journal of Theoretical Biology**, v.412, p.17–26, 2017.

SEMMLINGER, A.; VON SCHOENFELDT, V.; WOLF, V.; MEUTER, A.; KOLBEN, T. M.; KOLBEN, T.; ZEDER-GOESS, C.; WEIS, F.; GALLWAS, J.; WUERSTLEIN, R.; HERMELINK, K.; SCHMOECKEL, E.; HARBECK, N.; MAYR, D.; MAHNER, S.; JESCHKE, U.; DITSCH, N. EP3 (prostaglandin E2 receptor 3) expression is a prognostic factor for progression-free and overall survival in sporadic breast cancer. **BMC Cancer**, 18:431, 2018.

SILISTINO-SOUZA, R.; RODRIGUES-LISONI, F. C.; CURY, P. M.; MANIGLIA, J. V.; RAPOSO, L. S.; TAJARA, E. H.; CHRISTIAN, H. C.; OLIANI, S. M. Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. **International Journal of Cancer**, v.120, n.12, p.2582–2589, 2007.

SUH, Y-E.; RAULF, N.; GAKEN, J.; LAWLER, K.; URBANO, T. G.; BULLENKAMP, J.; GOBEIL, S.; HUOT, J.; ODELL, E.; TAVASSOLI, M. MicroRNA-196a promotes an oncogenic effect in head and neck cancer cells by suppressing annexin A1 and enhancing radioresistance. **International Journal of Cancer**, v.137, n.5, p.1021-34, 2015.

TEIXEIRA, R. A. P.; MIMURA, K. K. O.; ARAUJO, L. P.; GRECO K. V.; OLIANI, S. M. The essential role of annexin A1 mimetic peptide in the skin allograft survival. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.10, n.2, p.E44–E53, 2016.

TLSTY, T. D.; HEIN, P. W. Know thy neighbor: Stromal cells can contribute oncogenic signals. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.11, n.1, p.54–59, 2001.

WALLNER, B. P.; MATTALIANO, R. J.; HESSION, C.; CATE, R. L.; TIZARD, R.; SINCLAIR, L. K.; FOELLER, C. E.; CHOW, P.; BROWNING, J. L.; RAMACHANDRAN, K. L.; PEPINSKY, R. B. Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. **Nature**, v.320, n.6057, p.77–81, 1986.

WAN, Y-M.; LING, Q.I.; LI-MEI LIU, NING, X. U. ANXA1 affects cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma. **Experimental And Therapeutic Medicine**, p.5214-5218, 2017.

WANG, L. D.; YANG, Y. H.; LIU, Y.; SONG, H. T.; ZHANG, L. Y.; LI, P. L. Decreased expression of annexin A1 during the progression of cervical neoplasia. **The Journal of international medical research**, v.36, n.4, p.665–72, 2008.

WANG, M.; WU, C-P.; PAN, J-Y.; ZHENG, W-W.; CAO, X-J.; FAN, G-K. Cancer-Associated Fibroblasts in a human Hep-2 established laryngeal xenografted tumor are not derived from cancer cells through epithelial-mesenchymal transition, phenotypically activated but karyotypically normal. **PLoS ONE** 10(2): e0117405. doi:10.1371/journal, 2015.

WERNER, J. A.; RATHCKE, I. O.; MANDIC, R. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Clin Exp Metastasis**, v.19, n.4, p.275-82, 2002.

YASMIN, R.; SIRAJ, S.; HASSAN, A.; KHAN, A. R.; ABBASI, R.; AHMAD, N. Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. **Mediators of Inflammation**, p.1-8, 2015.

YAZID, S.; GARDNER, P. J.; CARVALHO, L.; CHU, C. J.; FLOWER, R. J.; SOLITO, E.; LEE, R. W. J.; ALI, R. R.; DICK, A. D. Annexin-A1 restricts Th17 cells and attenuates the severity of autoimmune disease. **Journal of Autoimmunity**, v.58, p.1–11, 2015.

YOSHIZAKI, T.; MARUYAMA, Y.; SATO, H.; FURUKAWA, M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v.95, n.1, p.44-50, 2001.

YU, G.; WANG, Y.; FU, A.; SHI, W.; YEO, D.; LUO, K. Q.; OW, H.; XU, C. Tracking mesenchymal stem cell tumor-homing using fluorescent silica nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry B**, v.3, p.1245-1253, 2015.

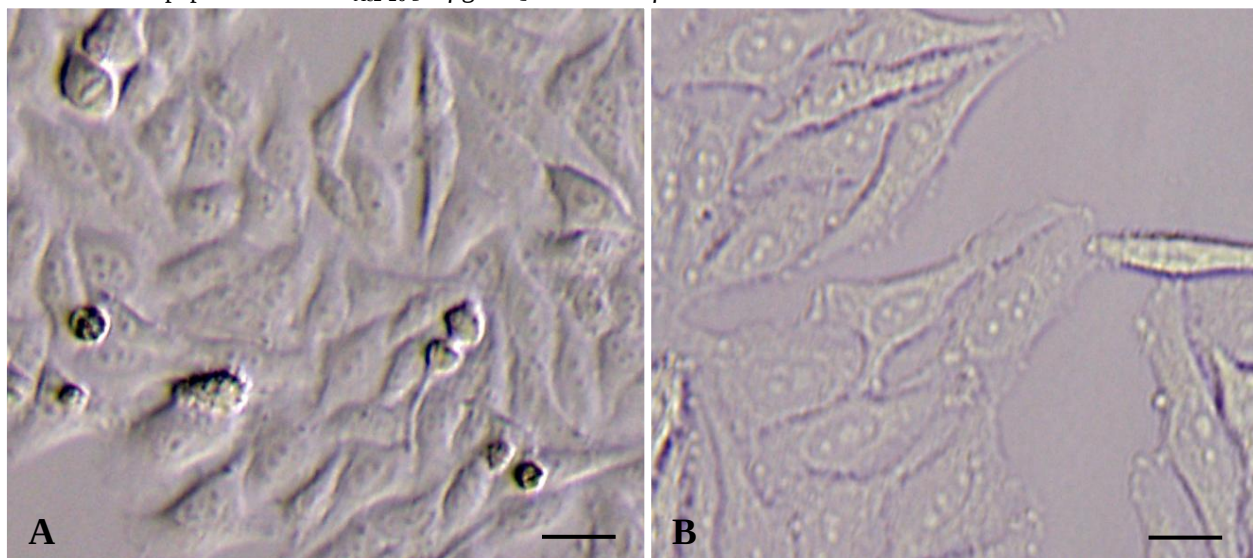
ZHANG, L.; ZHENG, Y. L.; HU, R. H.; ZHU, L.; HU, C. C.; CHENG, F.; LI, S.; LI, J. G. Annexin A1 mimetic peptide AC2-26 inhibits sepsis-induced cardiomyocyte apoptosis through LXA4/PI3K/AKT signaling pathway. **Current Medical Science**, v.38, n.6, p.997-1004, 2018.

ZHANG, X. W.; LI, J.; JIANG, Y. X.; CHEN, Y. X. Association between COX-2 -1195G>A polymorphism and gastrointestinal cancer risk: A meta-analysis. **World J Gastroenterol**, p.2234-2245, 2017.

ZIJLMANS, H. J.; FLEUREN, G. J.; HAZELBAG, S.; DREEF, E. J.; KENTER, G. G.; GORTER, A. Expression of endoglin (CD105) in cervical cancer. **British Journal of Cancer**, v.100, n.10, p.1617-1626, 2009.

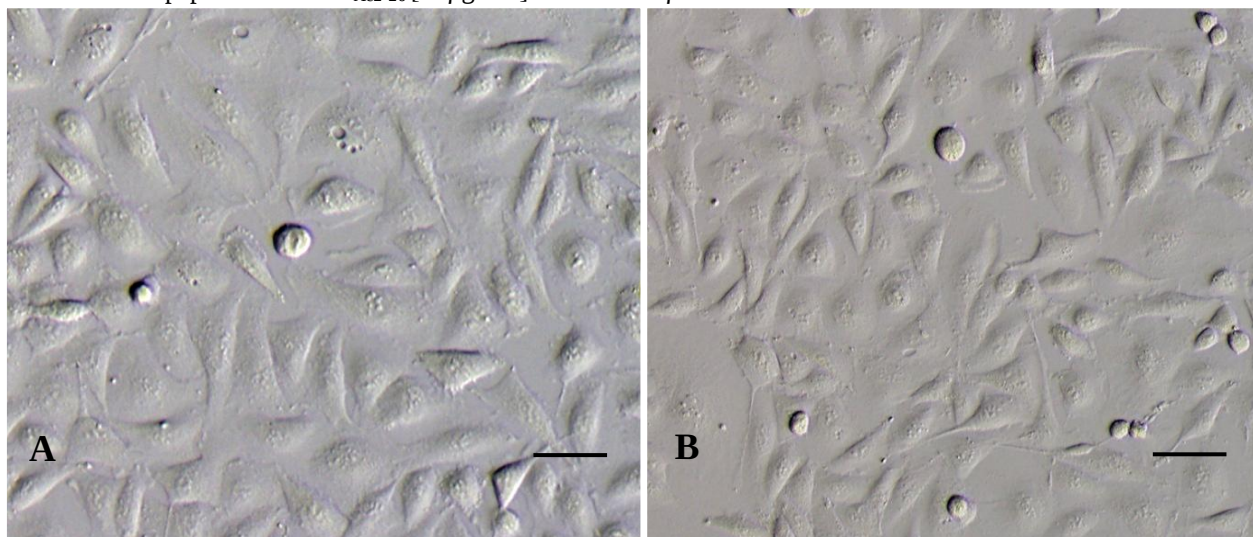
8. Figuras

Figura 6 - Imagens mostrando a morfologia da linhagem celular Hep-2 após 48 horas: (A) sem tratamento e (B) tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. Escala: 50µm.



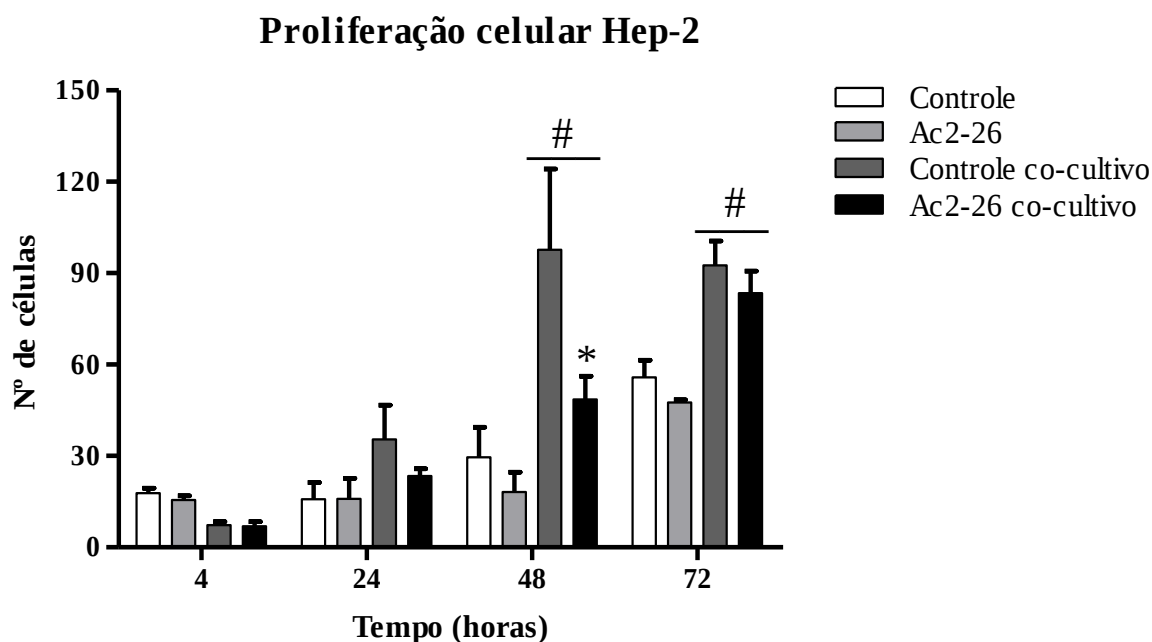
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Figura 7 - Imagens mostrando a morfologia da linhagem celular HUVEC após 48 horas: (A) sem tratamento e (B) tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. Escala: 100µm.



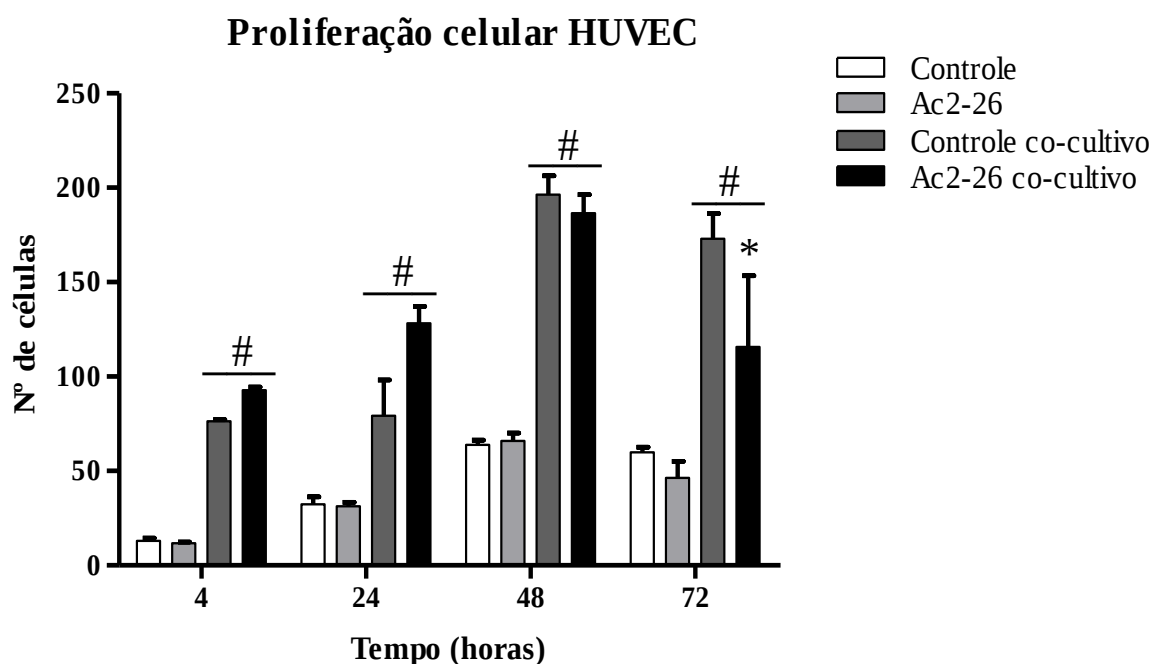
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Figura 8 - Gráfico da proliferação celular da linhagem Hep-2. Células co-cultivadas com linhagem HUVEC e tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. *Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. #Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células co-cultivadas ou não.



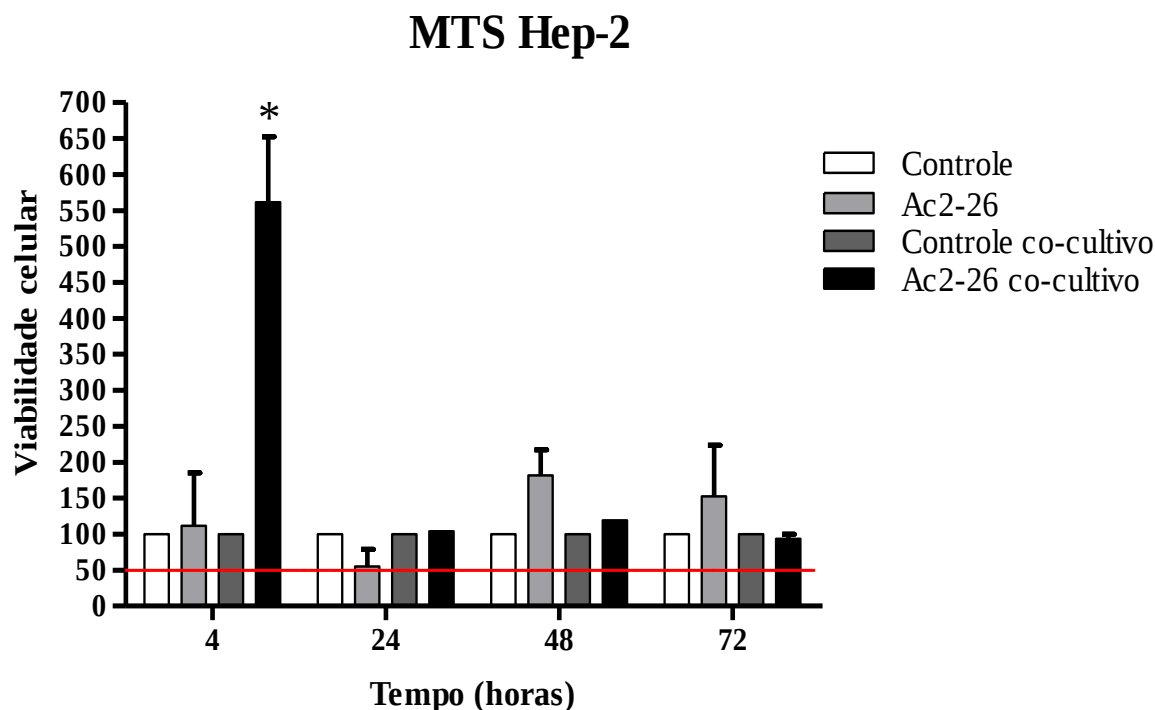
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Figura 9 - Gráfico da proliferação celular da linhagem HUVEC. Células co-cultivadas com linhagem Hep-2 e tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. *Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. #Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células co-cultivadas ou não.



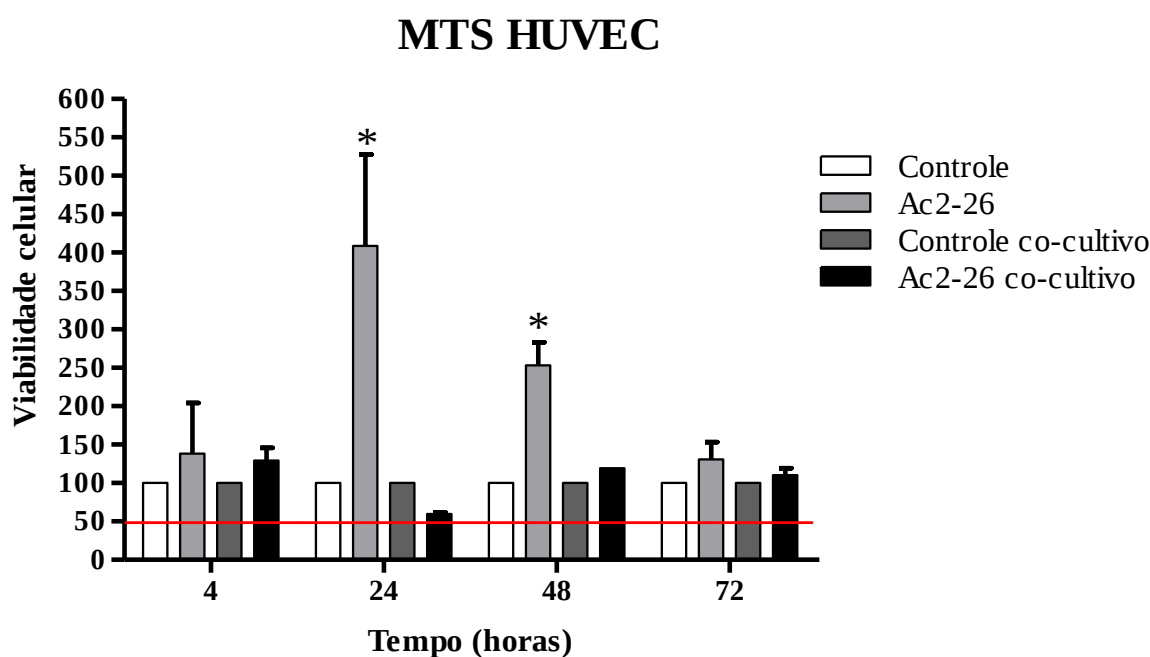
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Figura 10 - Densitometria do ensaio de Viabilidade celular da linhagem Hep-2. Células tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], nas condições com e sem co-cultivo com a linhagem HUVEC. Viabilidade celular (%) obtida pela fórmula $A/B \times 100$. Traço em vermelho indica IC₅₀. Experimento realizado em triplicata. *Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. Viabilidade celular (%).



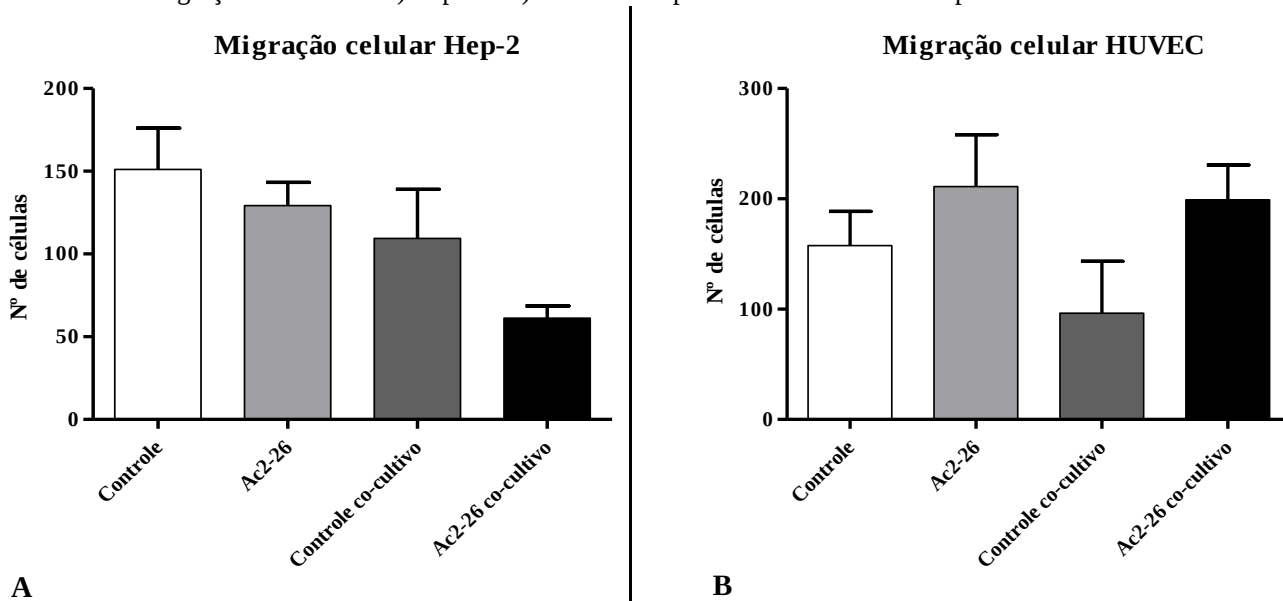
Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Figura 11 - Densitometria do ensaio de Viabilidade celular da linhagem Hep-2. Células tratadas com o peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], nas condições com e sem co-cultivo com a linhagem HUVEC. Viabilidade celular (%) obtida pela fórmula $A/B \times 100$. Traço em vermelho indica IC₅₀. Experimento realizado em triplicata. *Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. Viabilidade celular (%).



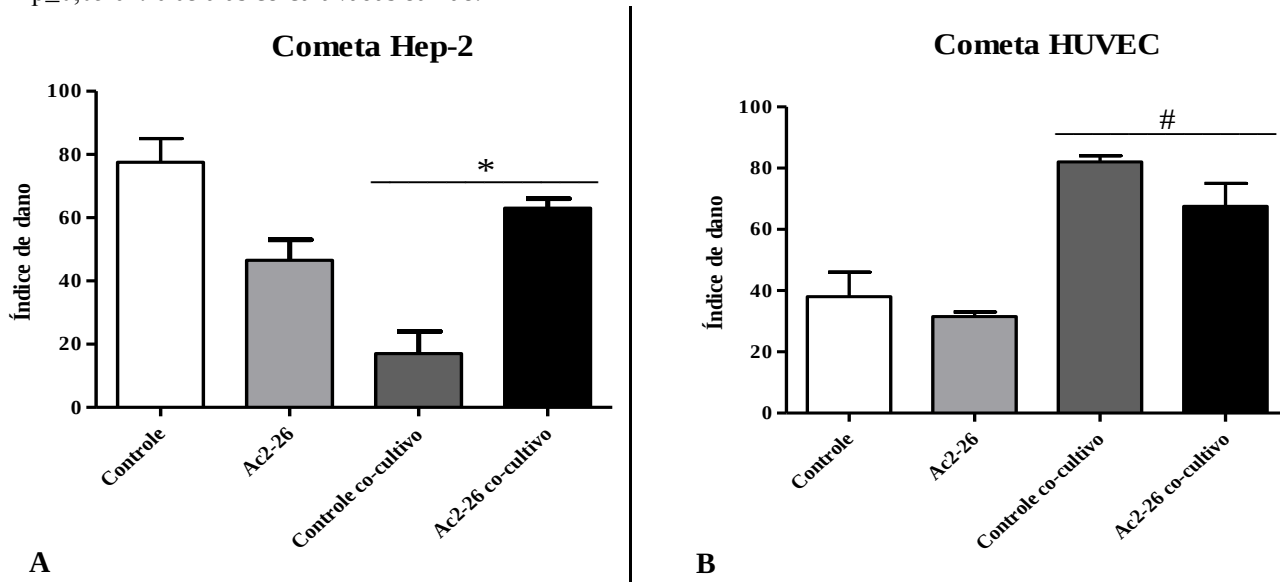
Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Figura 12 - Resultado do ensaio de migração celular das linhagens Hep-2 e HUVEC. Gráficos da análise estatística do ensaio de migração das células A) Hep-2 e B) HUVEC. Experimento realizado em triplicata.



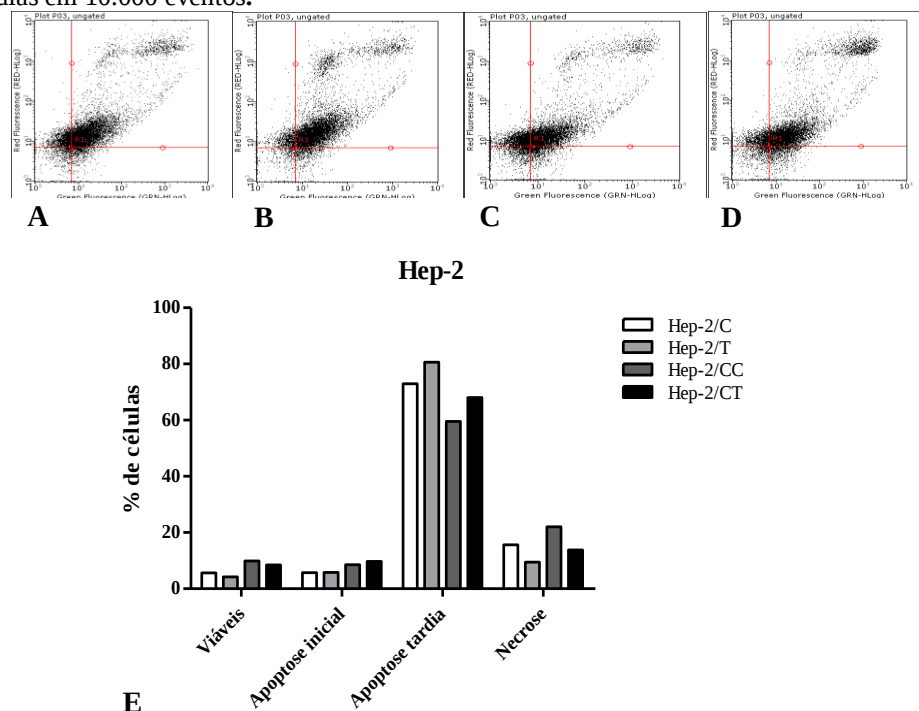
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Figura 13 - Gráficos dos resultados do ensaio Cometa para as linhagens A) Hep-2 e B) HUVEC em co-cultivo e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL] por 48 horas. Experimento realizado em triplicata. *Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. #Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células co-cultivadas ou não.



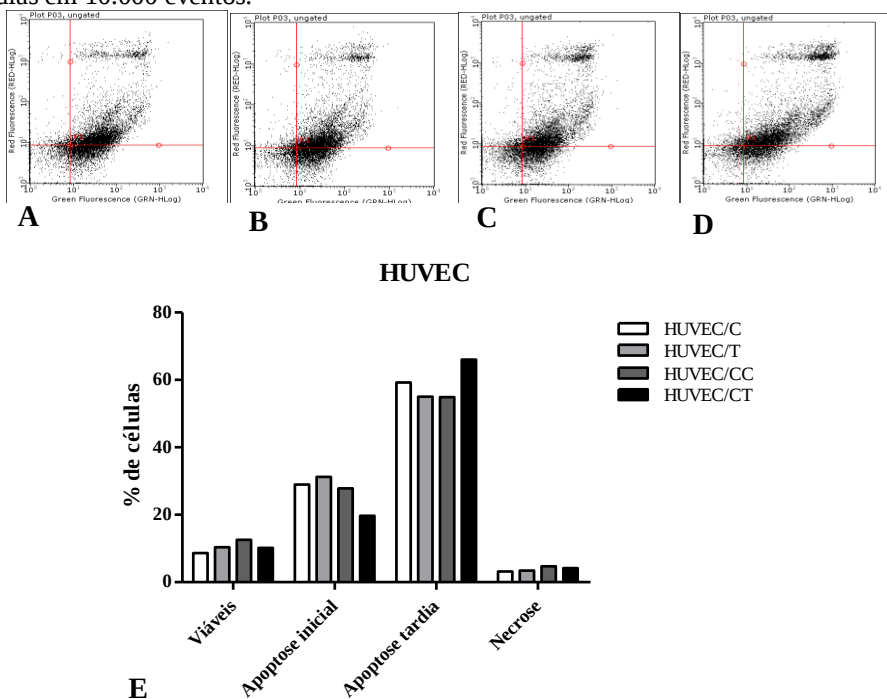
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Figura 14 - Dados da citometria de fluxo com a linhagem Hep-2. Gráficos A-D: dotplots com x= FITC Anexina V e y= Iodeto de propídeo, A) Controle, B) ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], C) Co-cultivo controle, D) Co-cultivo com ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. E) Densitometria do ensaio de citômetro de fluxo com x= estágios celulares e y= porcentagem de células em 10.000 eventos.



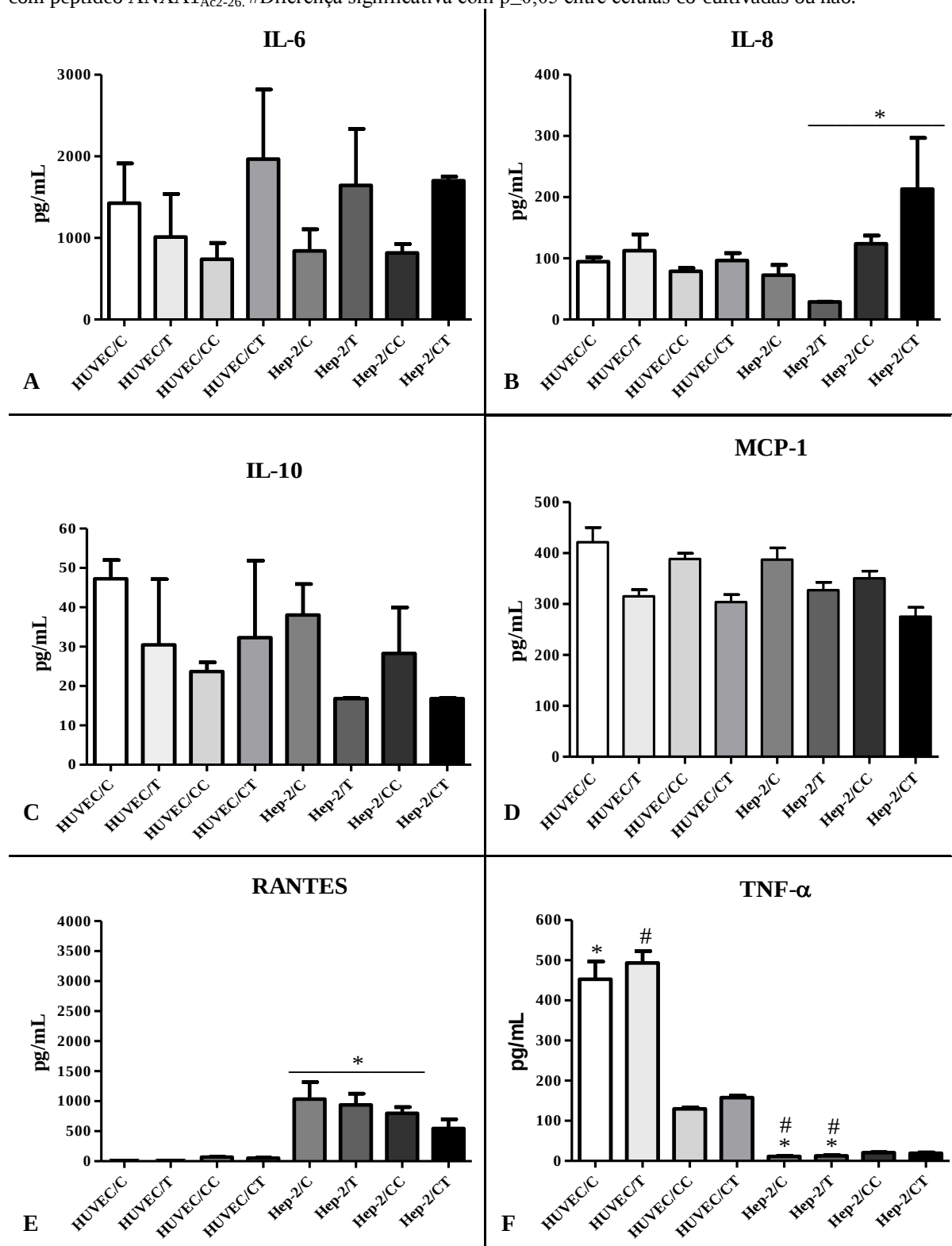
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Figura 15 - Dados da citometria de fluxo com a linhagem HUVEC. Gráficos A-D: dotplots com x= FITC Anexina V e y= Iodeto de propídeo, A) Controle, B) ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], C) Co-cultivo controle, D) Co-cultivo com ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL]. E) Densitometria do ensaio de citômetro de fluxo com x= estágios celulares e y= porcentagem de células em 10.000 eventos.



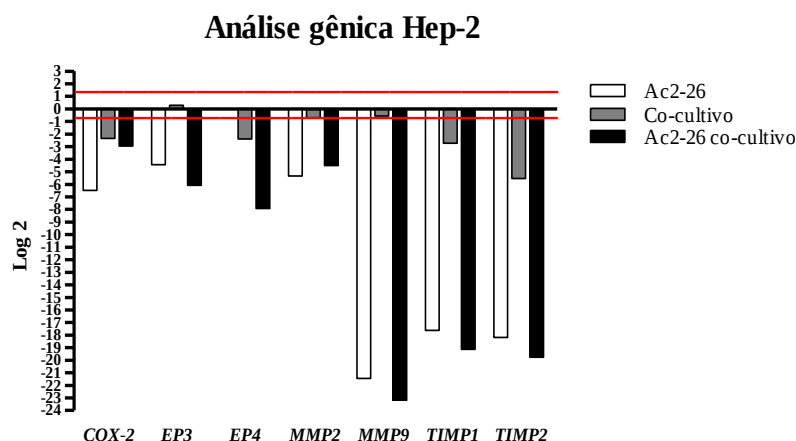
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Figura 16 - Gráficos do ensaio colorimétrico ELISA para análise de citocinas/quimiocinas. A) IL-6, B) IL-8, C) IL-10, D) MCP-1, E) RANTES e F) TNF- α . C: células controle, T: células tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10 μ g/mL], CC: células em co-cultivo e controle, CT: células em co-cultivo e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10 μ g/mL]. Experimento realizado em triplicata. *Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células controle e tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26}. #Diferença significativa com $p \leq 0,05$ entre células co-cultivadas ou não.



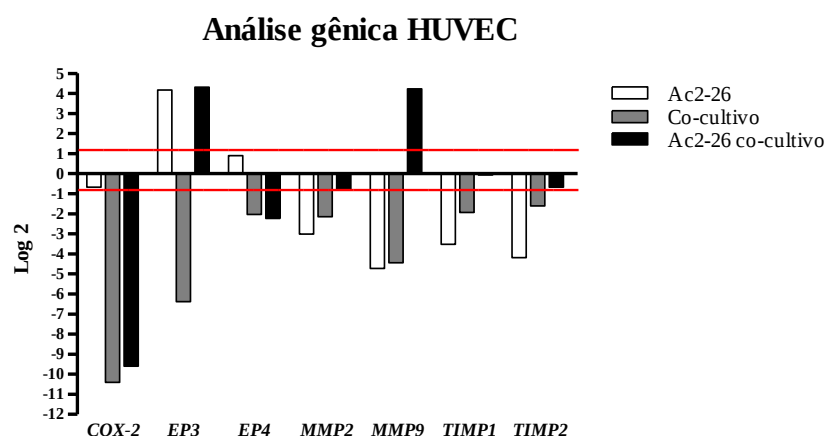
Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Figura 17 – Padrão de expressão gênica das células Hep-2 tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], co-cultivadas e co-cultivadas e tratadas. O grupo controle não é a base de comparação, sendo sua expressão, em logaritmo de base 2, considerada zero; e com base nisso, foram considerados diferencialmente expressos os transcritos que exibiram expressão relativa ≥ 1.0 ou ≤ -1.0 em relação ao controle (linha vermelha). Experimento realizado em triplicata.



Fonte: elaborado pela autora, 2018.

Figura 18 - Padrão de expressão gênica das células HUVEC tratadas com peptídeo ANXA1_{Ac2-26} [10µg/mL], co-cultivadas e co-cultivadas e tratadas. O grupo controle não é a base de comparação, sendo sua expressão, em logaritmo de base 2, considerada zero; e com base nisso, foram considerados diferencialmente expressos os transcritos que exibiram expressão relativa ≥ 1.0 ou ≤ -1.0 em relação ao controle (linha vermelha). Experimento realizado em triplicata.



Fonte: elaborado pela autora, 2018.



TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes,
para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/03/2019

Thaís Bruno Pires

Assinatura do autor