NATASSJA FOIZER MORAES

O C-terminal da proteína S100A9 murina modula os eventos envolvidos na angiogênese e na progressão tumoral em modelos *in vitro*

São Paulo

2015

NATASSJA FOIZER MORAES

O C-terminal da proteína S100A9 murina modula os eventos envolvidos na angiogênese e na progressão tumoral em modelos *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profª. Drª. Renata Giorgi

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3202
FMVZ

Moraes, Natassja Foizer
O C-terminal da proteína S100A9 murina modula os eventos envolvidos na angiogênese e na progressão tumoral em modelos *in vitro* / Natassja Foizer Moraes. -- 2015.
81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profª. Drª. Renata Giorgi.

1. pS100A9m. 2. S100A9. 3. Inibição. 4. Angiogênese. 5. Tumorigênese. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do efeito modulatório *in vitro* do C-terminal da proteína S100A9 sobre o crescimento de células tumorais da linhagem LLC Walker 256 e sobre a proliferação e migração de células endoteliais tímicas (tEnd.1)", protocolado sob o nº 2900/2013, utilizando linhagens de células endoteliais tímicas de camundongos, sob a responsabilidade do(a) Dra. Renata Giorgi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Evaluation of *in vitro* modulatory effect of the C-terminal of protein S100A9 on the growth of tumoral cells lineage LLC Walker 256 and on the proliferation and migration of thymic endotelial cells (tEnd.1)", protocol number 2900/2013, under the responsibility Dra. Renata Giorgi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

INSTITUTO BUTANTAN

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 13 de dezembro de 2012.

Protocolo: I-989/12

Dra. Renata Giorgi
Laboratório de Fisiopatologia
Instituto Butantan

Referente Projeto: "Avaliação do efeito modulatório *in vitro* do C-terminal da proteína S100A9 sobre o crescimento de células tumorais da linhagem LLC Walker 256 e sobre a Proliferação e Migração de células endoteliais tímicas (tEnd.1)".

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados em sua execução.

Cordialmente,

P/ Dr. Marcelo Larami Santoro
Coordenador da CEUAIB

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MORAES, Natassja Foizer

Título: **O C-terminal da proteína S100A9 murina modula os eventos envolvidos na angiogênese e na progressão tumoral em modelos *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo cuidado e sustento. *"Buscai, pois, o reino de Deus, e todas estas coisas vos serão acrescentadas"* (Lucas, 12:31).

Agradeço à minha família (Samuel, Nadieliz, Rayssa e Maressa) por todo o apoio, cuidado, pelas caronas tarde da noite e por me sustentarem nos momentos que eu não estava recebendo! Agradeço também pelo incentivo e por insistirem pra eu fazer o mestrado, foi difícil, mas foi bom!

Um agradecimento especial ao meu namorado. Gui, muito obrigado por ser meu companheiro, por me ouvir nas minhas milhares de crises e me dar forças pra continuar até o final.

Agradeço aos meus avós Nancy e Enildo por todo o carinho e a avó Clarice por sempre perguntar como estão os ratinhos, mesmo que eu só tenha trabalhado com células! E agradeço pela infinidade de tios e primos que deixam os dias que nos encontramos mais alegres!

Quero agradecer também aos meus amigos de longa data, especialmente a Lorraine, Stela e Paulo, pela compreensão pela falta de tempo. Sei que todos passam por momentos mais atarefados, mas fico feliz por não ter perdido essas amizades enquanto estava escrevendo relatório ou fazendo experimento até mais tarde!

Agradeço as meninas da Fisiopatologia! Vocês deixaram as muitas horas de experimento mais leves com todas as risadas! Mas agradeço especialmente as meninas da sala do fundo (Cá, Gabi e Ana) por todas as conversas, conselhos, almoços e pela amizade! A Jaque e Bruna também, que não estão mais na sala do fundo, mas a amizade continua! Agradeço a Lu por toda a ajuda nos experimentos, pela troca de experiências e pela confiança! Você me ajudou muito!

E, principalmente, as minhas irmãs da ciência! Tati, obrigada por ser essa menina serena, prudente e honesta! Você é a parte mais sensata desse trio! Eloá, muito obrigada por todos os hambúrgueres! Obrigada por ser a parte aborrecida do trio, com todas as suas onças e críticas sociais! Mas quero agradecer mesmo por me enxergar de uma forma mais bonita e me mostrar isso! Nesse trio, cada uma de nós tem o seu espaço e eu gosto da forma como nos

entendemos! Vou sentir muito a falta de vocês, mas não quero de forma alguma que a gente se perca pelo caminho!

Quero levar as minhas amigas da Fisiopatologia pra sempre comigo! A amizade de vocês me faz bem!

Nesse momento quero agradecer a quem realmente me possibilitou desenvolver esse trabalho, as minhas orientadoras, Renata Giorgi e Sandra Sampaio! Re, obrigada por todos esses anos de orientação, pelo aprendizado e crescimento que eu alcancei desde a minha Iniciação Científica até o final do Mestrado! E San, obrigada pelas várias ideias e colaboração que você me deu desde o começo. Sem a sua ajuda, esse projeto não seria concluído da mesma forma! Eu agradeço também por você ter trazido a minha "Árvore da Felicidade" pro 'AGORA', isso me fez entender o Mestrado de uma forma diferente!

Agradeço ao Departamento de Patologia da Veterinária por acreditar no meu potencial e me aceitar. E, também, aos outros colaboradores que me emprestaram os fotomicroscópios para eu fazer essas fotos lindas! Um muito obrigado a todos os pesquisadores e funcionários do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, por manter o espaço funcionando em meio à loucura dos experimentos.

E, finalmente, mas muito importante, ao apoio financeiro do CNPq (133358/2013-5) e da FAPESP (2013/01295-4).

“Valeu a pena?

Tudo vale a pena quando a alma não é pequena”

Fernando Pessoa

“Façam tudo com AMOR.”

1 Coríntios 16:14

RESUMO

MORAES, N. F. **O C-terminal da proteína S100A9 murina modula os eventos envolvidos na angiogênese e na progressão tumoral em modelos *in vitro*.** [The C-terminus of the murine protein S100A9 modulates the events involved in angiogenesis and tumor progression using *in vitro* models.]. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As proteínas S100A8/A9 são expressas em diferentes tipos celulares e quando sozinhas ou complexadas e em baixas concentrações, promoveram proliferação, migração celular e formação de estruturas capilares. Por outro lado, quando em altas concentrações, esse complexo inibe o crescimento de diversos tipos de células tumorais murinas e humanas. Ainda, tanto a proteína S100A9 humana, quanto um peptídeo sintético idêntico a porção C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9m) possuem efeitos antinociceptivo e imunorregulatório. Apesar dessas evidencias, até o momento não foi investigado o efeito do pS100A9m sobre a angiogênese e a tumorigênese. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar, *in vitro*, o efeito do pS100A9m sobre os eventos fundamentais envolvidos com a angiogênese e o desenvolvimento tumoral. Para tanto, a fim de avaliar o efeito do pS100A9m sobre a angiogênese foi utilizada a linhagem de células endoteliais tímicas murinas (tEnd.1) nos ensaios de proliferação, migração da célula endotelial em meio de cultura, avaliada nos modelos de *wound healing e transwell* ou migração em meio condicionado, obtido de células tumorais LLC WRC256, avaliada no modelo de *transwell*, ensaio de adesão (aos componentes de matriz, tais como o colágeno tipo I, fibronectina e laminina) e formação de tubos em matrigel tridimensional (3D). Para os estudos sobre o efeito do pS100A9m sobre as células tumorais, foi utilizada a linhagem de células LLC WRC256 para realização dos ensaios funcionais de proliferação, migração (*wound healing*) e adesão (sobre os componentes da matriz extracelular). Os resultados obtidos demonstraram que o pS100A9m inibe a proliferação, migração, adesão sobre os componentes de matriz e, consequentemente, a formação de estruturas capilares em matriz 3D. Em relação às células tumorais LLC WRC256, foi observada, novamente, a ação inibitória do pS100A9m sobre os eventos de proliferação e migração. Em relação à adesão, o peptídeo aumentou a capacidade de adesão das células tumorais sobre o colágeno tipo I e fibronectina, porém inibiu a adesão dessas células sobre laminina. Em conclusão, os dados aqui obtidos demonstram que o pS100A9m inibe *in vitro* os eventos fundamentais envolvidos com a angiogênese e com a progressão tumoral. Desta forma, o peptídeo da porção C-terminal da proteína S100A9 pode ser

considerado uma nova ferramenta para o estudo da angiogênese e tumorigênese, além apresentar potencial para uma possível aplicação terapêutica nesses processos.

Palavras-chave: pS100A9m. S100A9. Inibição. Angiogênese. Tumorigênese.

ABSTRACT

MORAES, N. F. **The C-terminus of the murine protein S100A9 modulates the events involved in angiogenesis and tumor progression using *in vitro* models.** [O C-terminal da proteína S100A9 murina modula os eventos envolvidos na angiogênese e na progressão tumoral em modelos *in vitro*]. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The S100A8/A9 proteins are expressed in different cell types and alone or when complexed, and at low concentrations promoted proliferation, cell migration and formation of capillary structures. On the other hand, at higher concentrations, this compound inhibits the growth of many types of murine and human tumor cells. Moreover, both human S100A9 protein and a synthetic peptide identical to the C-terminal portion of murine S100A9 (mS100A9p) present antinociceptive and immunomodulatory effects. Despite these evidences, the effect of mS100A9p on angiogenesis and tumorigenesis has not been investigated. Therefore, the aim of this study was to investigate the *in vitro* effect of mS100A9p on crucial events involved in angiogenesis and tumor development. For this, in order to evaluate the effect of mS100A9p on angiogenesis was used the murine endothelial cell line derived from thymus hemangioma (tEnd.1) for proliferation assays, endothelial cell migration in the presence of culture medium (scratch wound healing and chemotaxis assays) or in conditioned medium prevenient from LLC WRC256 tumor cells (chemotaxis assays), adhesion assay (on extracellular matrix components, such as type I collagen, fibronectin and laminin) and tube like-structure formation in 3D matrix. For the analyzes of the effect of mS100A9p on tumor cells, the cell line LLC WRC256 was used to perform functional assays such as proliferation, migration (scratch wound healing model) and adhesion (on components of the extracellular matrix). The results showed that the mS100A9p inhibits the proliferation, migration and adhesion of endothelial cells to the matrix components and consequently the formation of capillary structures in 3D matrix. Regarding LLC WRC256 tumor cells, it was observed again the inhibitory action of the mS100A9p on proliferation and migration events. In relation to cellular adhesion, this peptide increased this parameter of tumor cells on type I collagen and fibronectin. However mS100A9p inhibited the adhesion of these cells on laminin. In conclusion, the data obtained show that the mS100A9p inhibits *in vitro* crucial events involved in angiogenesis and tumor progression. Thus, the C-terminal portion of murine S100A9 protein may be considered as a new tool for the study of tumorigenesis and

angiogenesis besides presenting potential to a possible therapeutic application in these processes.

Keywords: mS100A9p. S100A9. Inhibition. Angiogenesis. Tumorigenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização da actina 22
Figura 2 - Células endoteliais da linhagem tEnd.1 em cultura.. 42
Figura 3 - Efeito do pS100A9m sobre a proliferação de células endoteliais tEnd.1.. 43
Figura 4 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células endoteliais tEnd.1 ao colágeno tipo I..... 44
Figura 5 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células endoteliais tEnd.1 à fibronectina.. 45
Figura 6 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células endoteliais tEnd.1 à laminina..... 46
Figura 7 - Efeito do pS100A9m sobre a migração de células endoteliais tEnd.1 pelo método do *wound healing*.. 48
Figura 8 - Efeito do pS100A9m sobre a migração de células endoteliais tEnd.1 pelo sistema do *transwell*..... 50
Figura 9 - Ensaio de migração celular pelo sistema de transwell com células tEnd.1 e meio RPMI.. 51
Figura 10 - Ensaio de migração celular pelo sistema de transwell com células tEnd.1 e meio condicionado de células LLC WRC256..... 52
Figura 11 - Efeito do pS100A9m sobre a formação de tubos pelas células endoteliais tEnd.1.. 54
Figura 12 - Células tumorais da linhagem LLC Walker 256 em cultura..... 55
Figura 13 - Efeito do pS100A9m sobre a proliferação celular de células LLC WRC256.. 56
Figura 14 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células LLC WRC256 ao colágeno tipo I..... 58
Figura 15 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células LLC WRC256 à fibronectina.. 58
Figura 16 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células LLC WRC256 à laminina..... 59
Figura 17 - Efeito do pS100A9m sobre a migração de células LLC WRC256 pelo método do *wound healing* 61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
1.1 PROGRESSÃO TUMORAL E ANGIOGÊNESE 18
1.2 MIGRAÇÃO CELULAR – ASPECTOS BÁSICOS 21
1.3 MODELOS *IN VITRO* PARA O ESTUDO DOS EVENTOS CELULARES 25
1.4 CARCINOMA WALKER 256 E CULTURA DE CÉLULAS LLC WRC 256 27
1.5 AÇÃO DAS PROTEÍNAS S100A8/S100A9 NA PROGRESSÃO TUMORAL 28
1.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO PEPTÍDEO DO C-TERMINAL DA PROTEÍNA S100A9 MURINA (pS100A9m) 32
2 JUSTIFICATIVA 34
3 OBJETIVOS 35
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 35
4 METODOLOGIA 36
4.1 SÍNTESE DO PEPTÍDEO CORRESPONDENTE AO C-TERMINAL DA PROTEÍNA S100A9 MURINA: 36
4.2 LINHAGENS CELULARES 36
4.2.1 Célula endotelial tímica tEnd.1 36
4.2.2 Células tumorais LLC Walker 256 37
4.2.3 Cultivo de células tEnd.1 e LLC WRC256 37
4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR 37
4.4 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR 38
4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO DO *WOUND HEALING* 39
4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS TEND.1 PELO SISTEMA *TRANSWELL* 39
4.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE TUBOS COM CÉLULAS tEnd.1 40
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA 40
5 RESULTADOS 42
Experimentos utilizando células endoteliais tímicas tEnd.1: 42
5.1 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS tEnd.1 EM CULTURA 42
5.2 EFEITO DO pS100A9m SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS tEnd.1 43

5.3 EFEITO DO pS100A9m SOBRE A ADESÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS TÍMICAS (tEnd.1) EM DIFERENTES LIGANTES DA MATRIZ EXTRACELULAR 44
5.4 EFEITO DO pS100A9m NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS tEnd.1 47
5.4.1 Migração pelo modelo do *Wound healing* 47
5.4.2 Efeito do pS100A9m sobre a migração de células endoteliais tEnd.1 pelo sistema *transwell* 49
5.5 EFEITO DO pS100A9m SOBRE A DE FORMAÇÃO DE TUBOS COM CÉLULAS ENDOTELIAIS tEnd.1 53
Experimentos utilizando células tumorais LLC WRC256: 55
5.6 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS LLC WRC256 EM CULTURA 55
5.7 EFEITO DO pS100A9m SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS LLC WRC256 56
5.8 EFEITO DO pS100A9m SOBRE A ADESÃO DE CÉLULAS TUMORAIS LLC WRC256 EM DIFERENTES LIGANTES DA MATRIZ EXTRACELULAR 57
5.9 EFEITO DO pS100A9m NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS LLC WRC256 PELO MÉTODO DO *WOUND HEALING* 60
6 DISCUSSÃO 62
7 RESUMO DOS RESULTADOS 69
8 CONCLUSÕES 70
REFERÊNCIAS 71

1 INTRODUÇÃO

Neoplasia é o nome dado a uma massa celular em crescimento (ROBBINS; COTRAN, 2005). Considerando que durante a carcinogênese uma única célula que sofreu mutações e se diferenciou passa a proliferar de forma acelerada, dando início a uma massa celular em crescimento, assim, o câncer, ou tumor, é considerado um neoplasma (ROBBINS; COTRAN, 2005; KASHIDA; KUDO, 2006). É interessante ressaltar que câncer é um termo genérico dado a mais de 150 doenças distintas que compartilham duas características específicas: crescimento celular descontrolado e habilidade de danificar tecidos normais (GHAVAMI et al., 2009). Um tumor surge a partir de uma única célula que deixa de responder aos fatores de regulação de divisão celular. A partir daí, as células que surgem são clones da primeira (RAJESH et al., 2015). Essa transformação em células tumorais ocorre por meio de três fases: a) *iniciação*, b) *promoção* e c) *progressão*. A *iniciação* acontece em tecidos normais que sofrem alterações genéticas ao serem expostos a agentes carcinogênicos ou mutagênicos. Durante a *promoção* do tumor, as células iniciadoras são diferenciadas em células neoplásicas. E, na última fase, há uma evolução das células neoplásicas para um grau mais avançado de malignidade (ROBBINS; COTRAN, 2005; RAJESH et al., 2015).

1.1 PROGRESSÃO TUMORAL E ANGIOGÊNESE

O desenvolvimento do câncer depende da sobrevida, crescimento e proliferação da célula tumoral, considerando que a expansão do tumor para os tecidos adjacentes depende, primeiramente, da migração celular (RIDLEY, 2004). Ainda, a expansão tumoral só é possível por conta da formação de novos vasos sanguíneos, para que as células tumorais possam obter a quantidade necessária de nutrientes para se proliferarem. O nome dado a essa formação de novos vasos é angiogênese, processo que envolve o crescimento de novos vasos e migração e maturação celular (HANNUN, 1993). A angiogênese pode ocorrer tanto em processos fisiológicos, como o desenvolvimento vascular embrionário, mas também é essencial para a progressão de diversas doenças que dependem diretamente da neovascularização, tais como retinopatias diabéticas, artrite reumatóide e crescimento tumoral (FOLKMAN, 1995). Dessa forma, sem a angiogênese o tumor ficaria restrito a um tamanho de aproximadamente 0,2mm (YOON et al., 2003). Cabe destacar que a angiogênese em

tumores é difusa, com vasos tortuosos e dilatados além de, normalmente, possuírem suas paredes formadas por uma mescla de células endoteliais e tumorais, o que as deixam mais permeável à passagem de diferentes substâncias (CARMELIET; JAIN, 2000).

A neovascularização tumoral pode ocorrer via três processos: a) novos vasos que brotam da superfície de vasos pré-existentes; b) invaginação, a partir de grandes vasos ou; c) a partir de célula endotelial derivada de célula-tronco (CAO, 2005). Esses brotamentos crescem e migram através do tecido conjuntivo em direção à célula tumoral. Os vasos organizam-se em uma rede de capilares e adquirem suas características estruturais e funcionais (CUENOD et al., 2006). Além das células tumorais, os fatores angiogênicos podem ser provenientes de células endoteliais, sanguíneas ou, ainda, da matriz extracelular, sendo que sua influência pode variar dependendo do tipo de tumor e de onde ele está alocado (CARMELIET; JAIN, 2000).

A formação de novos vasos capilares por estruturas vasculares preexistentes é de importância fundamental em metástases tumorais (FOLKMAN, 2007). A metástase é uma das principais causas de morte por câncer, sendo que as células tumorais devem seguir uma série de passos para que ela ocorra.

Ainda, com relação a neovascularização, a hipóxia tecidual causada pelo crescimento exacerbado da massa tumoral é um dos fatores que estimulam o recrutamento de células endoteliais, uma vez que, quando as células tumorais se proliferam, há supressão de inibidores para angiogênese e um aumento da expressão de fatores angiogênicos, tais como: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e metaloproteinases de matriz (MMPs) (CAO, 2005; DASS; TRAN; CHOONG, 2007; EELEN et al., 2015). Esses fatores podem também ser liberados pela própria célula tumoral e são essenciais para a adesão, proliferação, migração e morfogênese das células endoteliais, ou seja, a magnitude e qualidade da resposta angiogênica são determinadas pela soma de fatores pró e anti-angiogênicos (CUENOD et al., 2006; WEIS; CHERESH, 2011; EELEN et al., 2015). Portanto, as MMPs têm sido apontadas como o principal grupo de enzimas proteolíticas responsáveis não só pela metástase, como também, pela invasão tumoral e angiogênese (YOON et al., 2003).

Assim, a angiogênese é mediada por interações entre células endoteliais e fatores presentes no microambiente extracelular, o qual é capaz de recrutar e ativar células quiescentes presentes nesse microambiente. Inicialmente, o tumor cresce em área avascular, aumentando a necessidade por nutrientes e fornecimento de oxigênio a partir do sangue,

levando a transcrição do gene VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), um importante fator angiogênico (CARMELIET; JAIN, 2000). A interação entre o VEGF e seu receptor (VEGFR) resulta na migração e proliferação de células precursoras das endoteliais derivadas da medula, que irão se diferenciar em células endoteliais vasculares (CEVs) (CALFA et al., 2006). No tumor, as CEVs proliferam de 50 a 100 vezes mais rápidas do que as células normais, sendo uma CEV capaz de manter mais de cem células tumorais (DASS; TRAN; CHOONG, 2007). Portanto, a destruição de um único vaso sanguíneo pode erradicar um considerável número de células tumorais (DASS; TRAN; CHOONG, 2007).

As proteínas de matriz extracelular desempenham um papel crucial na organização e comportamento da célula endotelial durante o processo de angiogênese. A célula endotelial expressa em sua membrana moléculas de adesão do tipo integrina (ICAM-1, VCAM-1 E PECAM) e selectinas (selectina P e selectina E), bem como receptores para proteínas de matriz extracelular, como fibronectina, laminina, trombospondina, colágenos I, II, III, IV e V, elastina, heparan sulfato, condroitim sulfato, entre outros (JAFFE, 1987). As proteínas colágeno tipo IV e laminina são as proteínas predominantes da membrana basal celular, a qual promove suporte estrutural para as células endoteliais e separa os vasos das células perivasculares. Já, a fibronectina é responsável pela permeabilidade vascular (CAMPBELL et al., 2010,). Mudanças na composição de matriz extracelular que circundam as células endoteliais coincidem com o comportamento proliferativo dessas células (FORM; PRATT; MADRI, 1986). A matriz extracelular é capaz de interagir com a superfície basal da camada achatada de células da superfície de vasos sanguíneos por meio de ligações com integrinas, as quais são expressas em maior quantidade na angiogênese tumoral (MONTESANO; ORCI; VASSALLI, 1983; CAMPBELL et al., 2010). Essas interações são determinadas por propriedades químicas, físicas e mecânicas da matriz extracelular (FRANCIS; URIEL; BREY, 2008).

Como destacado anteriormente, a hipóxia é um dos fatores preponderantes para o desenvolvimento de novos vasos durante o processo tumoral. Essa hipóxia está associada ao aumento da invasividade, metástase e resistência das células tumorais à radioterapia e quimioterapia. Em situações de hipóxia tumoral, diversos marcadores endógenos são liberados, dentre eles, está o transportador de glicose 1 (GLUT-1), um gene relacionado a agressividade tumoral, expresso a fim de acelerar a entrada de glicose em respiração anaeróbica, para compensar a falta de oxigênio e prevenir a morte celular (FRAGA et al., 2015). Entretanto, existem outras formas de atrair células endoteliais para a formação de novos vasos sanguíneos, dado o fato que apenas uma célula ou um pequeno aglomerado de

células tumorais podem secretar fatores angiogênicos (MEIERJOHANN, 2015). Espécies reativas de oxigênio (ROS) são exemplos de substâncias que possuem essa capacidade. Tem sido demonstrado que ROS produzido dentro do tumor induz a secreção de fatores pró-angiogênicos. Dentro do ambiente tumoral, os ROS podem ser produzidos por diferentes vias, como a NADPH oxidase induzida pela secreção de VEGFA ou angiopoietina-1 (MEIERJOHANN, 2015).

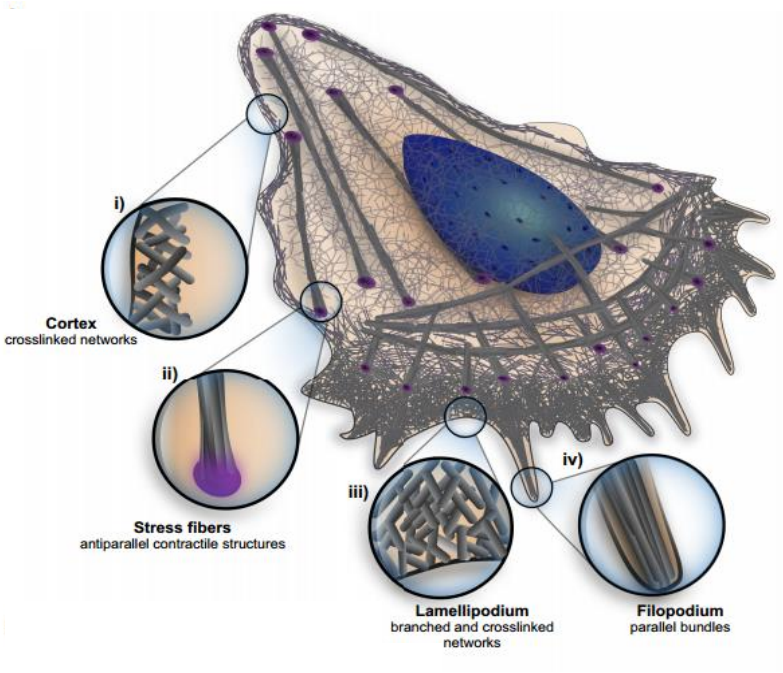
Outro fator importante na formação de novos vasos, não é dependente da hipóxia tumoral, é a secreção de MMPs de matriz extracelular por meio da mobilização ou ativação de fatores pró-angiogênicos, como fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) ou fator de crescimento transformador β (TGF-β) (OVERALL; LÓPEZ-OTÍN, 2002, para revisão). As metaloproteinases são também responsáveis pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular, contribuindo para a formação do microambiente tumoral. Essas substâncias são importantes por modularem e co-localizarem a ligação de receptores célula-célula e célula-matriz extracelular (YOON et al., 2003; YADAV et al., 2014). Ao remodelar a matriz extracelular, as metaloproteinases permitem a migração de células endoteliais, sendo também importantes na promoção do crescimento celular, morfogênese e estabilização de novos vasos sanguíneos juntamente com a matriz extracelular (SOTTILE, 2004; YADAV et al., 2014). As metaloproteinases mais abundantes durante a neovascularização relacionada ao desenvolvimento tumoral são as MMP-2 e MMP-9, as quais estimulam a produção de fatores de crescimento (CAMPBELL et al., 2010).

1.2 MIGRAÇÃO CELULAR – ASPECTOS BÁSICOS

Todos os organismos multicelulares possuem a migração celular como processo biológico fundamental, sendo que a migração é essencial para eventos como reparo tecidual e sobrevivência imunológica (LÄMMERMANN et al., 2008). A migração da maioria das células consiste em quatro eventos sequenciais básicos, que ocorrem de maneira cíclica: 1) protrusão da parte dianteira do corpo celular, 2) adesão à matriz extracelular, 3) deslocamento do corpo celular, e 4) retração da parte traseira (RIDLEY et al., 2003; BLANCHOIN et al., 2014). Todos estes eventos dependem das modificações do citoesqueleto de actina e tubulina (HORWITZ; WEBB, 2003). Os filamentos de actina são polímeros polares que possuem duas

terminações, uma mais dinâmica que é capaz de se polimerizar 10 vezes mais rápido que a outra terminação e é capaz de se dobrar, enquanto a outra terminação, mais rígida, é responsável pela ancoragem da célula à matriz extracelular (BLANCHOIN et al., 2014). Durante a migração, ocorre a polimerização da actina na parte dianteira da célula (*leading edge*), voltada para a direção de migração, formando um processo denominado lamelipódio. Dessa região, devido à polimerização de actina, podem ser projetados prolongamentos mais finos e longos com caráter exploratório, denominados filopódios. Essas duas estruturas (lamelipódios e filopódios) formam adesões nascentes com a matriz extracelular, sendo estas estruturas pequenas e puntiformes, que possuem receptores de adesão à matriz (integrinas) e moléculas sinalizadoras - **Figura 1** (BLANCHOIN et al., 2014). Portanto, cabe ressaltar que a matriz extracelular é responsável por direcionar o movimento celular por meio de sinais físicos e químicos durante a migração.

Figura 1 - Organização da Actina



Fonte: Blanchoin et al. In: Physiol Rev 94: 235–263, 2014

Legenda: Na parte anterior da célula, redes reticuladas e ramificadas em uma lâmina bidimensional compõem o lamelipódio, principal mecanismo de movimentação das células, uma vez que essas redes empurram a membrana celular contra o lamelipódio (iii). Feixes alinhados subjacentes denominados filopódios são as estruturas digitiformes na parte da frente da célula, importantes para a resposta direcional da célula (iv).Uma fina camada de actina, chamada de córtex celular, cobre a membrana plasmática na parte posterior e nas laterais da célula, importante para a manutenção da forma e alteração do citoesqueleto da célula (i). No resto da célula, contém uma rede tridimensional de filamentos reticulados intercalada com feixes contráteis, incluindo *stress fibers* que ligam o citoesqueleto da célula à matriz extracelular, por meio de adesões focais locais (ii).

À medida que a célula avança, algumas dessas adesões se desfazem enquanto outras amadurecem, tornando-se complexos focais e posteriormente adesões ou contatos focais, que ancoram feixes de filamentos de actina e miosina II (fibras de estresse) e servem como pontos de ancoragem durante a migração (BLANCHOIN et al., 2014).

Após o amadurecimento das adesões junto ao substrato a célula desloca seu corpo para frente e a parte traseira é tracionada pelos feixes contráteis formados por fibras de actina e miosina II inseridos nas adesões. A atividade de miosina II é regulada pela fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC), que é positivamente regulada pela quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) e por proteínas da família Rho das guanosinas trifofatases (GTPases), dentre estas, a Rho quinase ROCK é negativamente regulada pela fosfatase da cadeia leve, que também é um substrato de ROCK (RIENTO; RIDLEY, 2003). A fosforilação de MLC ativa a miosina, resultando no aumento da contratilidade e transmissão de tensão para os sítios de adesão. O ciclo termina com a liberação das adesões que foram utilizadas na parte traseira da célula, podendo estas entrar em uso novamente. A família de GTPase Rho possui mais de 20 membros e é bastante conservada, possuindo as RhoA, Rac1 e Cdc42 como melhor caracterizadas e mais amplamente distribuídas (NOBES; HALL, 1999; SANDER; COLLARD, 1999; MARINKOVIC et al., 2015). Estas proteínas ciclam entre um estado inativo (ligadas a GDP) e um estado ativo (ligadas a GTP). Quando ativadas, exercem seus efeitos por meio de uma vasta quantidade de proteínas efetoras que regulam diversas funções celulares como migração, proliferação, diferenciação, apoptose, etc. ROCK é uma das proteínas efetoras reguladas por RhoA. Na migração celular, cada etapa é regulada por GTPases específicas. A proteína Rac1 está principalmente envolvida na formação de lamelipódios e adesões imaturas, Cdc42 na formação de filopódios e Rho (isoformas A, B e C) na formação das fibras de estresse e na maturação de adesões (Ridley e Hall, 1992; Ridley et al., 1992). O balanço recíproco entre Rac1 e RhoA determina a morfologia celular e o comportamento migratório (HERBRAND; AHMADIAN, 2006; MARINKOVIC et al., 2015).

No que diz respeito às células endoteliais, ao atingirem o tecido lesionado e serem ativadas, essas células precisam aderir ao tecido para proliferarem e formar os vasos. Sendo assim, as integrinas são as primeiras moléculas de adesão à matriz que integram vias de sinais intracelulares e a matriz extracelular. Cada integrina é um heterodímero formado por subunidades α e β que se combinam para ligar às proteínas da matriz extracelular. Essa ligação é primordial para que haja a ativação de citocinas e receptores para fatores de crescimento. A sinalização feita por essas ligações são determinantes para que a célula possa

se perceber em um microambiente apropriado, além de afetar sua sobrevivência e migração (WEIS; CHERESH, 2011). A combinação das cadeias α e β confere aos receptores especificidade de ligação. Frequentemente os receptores de diversas proteínas da matriz extracelular possuem a subunidade β_1 ou β_3. Receptores que reconhecem fibronectina e proteínas similares (fibrinogênio e vitronectina, por exemplo) possuem as subunidades α_4, α_5 e α_v, já os receptores de colágeno contem as subunidades α_1 ou α_2 (HYNES, 1999, 2003).

Situações como cicatrização, infarto do miocárdio, vasculogênese tumoral e hipóxia local são os principais estímulos para a migração de células endoteliais progenitoras na vida adulta. Em situações de hipóxia nos tecidos isquêmicos, o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) é produzido, o que promove a proliferação e diferenciação de células endoteliais progenitoras (SHWEIKI et al., 1992; PEICHEV et al., 2000). Além de fatores de crescimento como VEGF, outras citocinas como o fator-1 derivado de células estromais (SDF-1) são produzidas em situações de hipóxia que, por apresentarem propriedades quimiotáticas, possibilitam as células endoteliais progenitoras de migrar e entrar nesses tecidos prejudicados (PEPLOW, 2014). A estimulação por fatores de crescimento depende da adesão da célula ao substrato presente na matriz extracelular, processo modulado por integrinas específicas importantes para a adesão de diversos tipos celulares presentes na angiogênese (WEIS; CHERESH, 2011).

No que diz respeito à célula tumoral, o perfil celular de alta proliferação e fenótipo maligno do tumor estão associados à transição epitélio-mesênquima, ou seja, perda de marcadores epiteliais e ganho de marcadores mesenquimais, acarretando o aumento da capacidade migratória e invasiva (YILMAZ; CHRISTOFORI; LEHEMBRE, 2007; SILVA et al., 2014). Para que a metástase seja possível, a célula tumoral deve invadir a matriz extracelular, aderir à parede vascular, migrar pelo endotélio e invadir os tecidos. Neste sentido, é proposto que algumas moléculas de adesão entre as células tumorais e endoteliais ou plaquetas poderiam facilitar esses processos (YILMAZ; CHRISTOFORI; LEHEMBRE, 2007).

Células tumorais que possuem um perfil metastático apresentam perda da aderência celular, resultando em diminuição da expressão das moléculas de adesão e aumento da atividade de MMPs, as quais são responsáveis por degradar a matriz extracelular por meio de mecanismo dependente de zinco (KONDO et al., 2007). O ambiente tumoral normalmente apresenta uma expressão e atividade elevadas de MMP-2, sendo que essa metaloproteinase está diretamente relacionada à invasão e metástase tumoral (PELLIKAINEN et al., 2004; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2005).

Durante a migração tumoral a GTPase RhoA promove protrusões na membrana de células tumorais invasivas ricas em actina, chamadas invadopódias, por mecanismos que envolvem tanto a dinâmica da actina, quanto a liberação de MMPs (WU et al., 2014). Mudanças no citoesqueleto promovem alterações na morfologia das células, regulando a migração e a invasão tumoral.

A metástase tumoral é responsável por 90% das mortes por câncer. Existem dois tipos de metástase: 1) apenas uma célula que invade outros tecidos e 2) aglomerados de células que vão colonizar um novo microambiente. Essa distinção de mecanismo invasivo depende do tipo tumoral. O sítio tumoral metastático é formado a partir de células que se desprenderam do tumor primário e atingiram vasos sanguíneos ou linfáticos para encontrar novos locais no corpo e estabelecer o tumor secundário (YILMAZ; CHRISTOFORI; LEHEMBRE, 2007). Como assinalado anteriormente, durante a metástase, as células tumorais perdem temporariamente as moléculas de aderência, como a E-caderina, ao tumor primário, pois essas moléculas serão novamente expressas para que as células possam aderir e se proliferar em um novo sítio colonizado. Para que seja possível o extravasamento da célula tumoral, moléculas de adesão são expressas tanto para a mobilidade celular, quando para a passagem pelo endotélio vascular. Além disso, fatores angiogênicos como o VEGF são fundamentais para aumentar a permeabilidade do endotélio e assim, facilitar o processo de extravasamento celular (YILMAZ; CHRISTOFORI; LEHEMBRE, 2007).

1.3 MODELOS *IN VITRO* PARA O ESTUDO DOS EVENTOS CELULARES

Ao estabelecer um modelo *in vitro* para estudos dos eventos celulares, são imprescindíveis os cuidados com a observação, mensuração e a manipulação das células para que esse sistema *in vitro* seja biomimético, ou seja, reproduza o comportamento celular observado no ambiente *in situ*. Os estudos de migração celular e invasão são amplamente realizados em modelos de matriz extracelular (MEC) de colágeno (WOLF et al., 2009, para revisão). No colágeno se obtém uma estrutura de substrato fibrilar que favorece a adesão, bem como, apresenta-se como barreira para a movimentação celular similar aos tecidos intersticiais ricos em colágeno obtidos *in vivo*. Portanto, estes modelos são adequados e amplamente utilizados para examinar aspectos distintos do movimento celular em um ambiente similar ao tecido, considerando sua geometria, fonte e variação em suas

propriedades estruturais básicas. Os monômeros de colágeno podem ser obtidos de diferentes espécies, tais como roedores e bovinos. Neste sentido, estudos sobre o comportamento celular vêm sendo analisado em matriz de colágeno extraído de cauda de rato (EHRMANN; GEY, 1956; ELSDALE; BARD, 1972) reconstituído bi ou tridimensionalmente (NTAYI et al., 2001; WOLF et al., 2003; ALEXANDER et al., 2008; WOLF, et al., 2009).

Considerando que a matriz extracelular está presente no microambiente em que as células endoteliais e tumorais se encontram, diversos estudos *in vitro* utilizam componentes da matriz para mimetizar a migração e adesão de células tanto endoteliais, quanto tumorais em substratos como colágeno, fibronectina e laminina (LEAVESLEY et al., 1992; LEAVESLEY et al., 1993).

O estudo com células endoteliais pode ser feito, por exemplo, por meio do cultivo das células em monocamada, utilizando-se células endoteliais originárias de diversos tecidos, como veia de cordão umbilical humano (HUVEC), aorta bovina e veia safena humana (MORGAN, 1996). Também, podem ser utilizadas linhagens celulares que possuem maior capacidade de proliferação e que são capazes de manter um fenótipo próximo ao das células originais por um número maior de passagens, o que viabiliza a realização de vários experimentos (HULL, 1953), além de serem responsivas a substâncias endógenas, tais como hormônio do crescimento, levando à alteração da migração e proliferação em ensaios *in vitro* (RAMOS, 2008).

Outra forma de avaliar a função de células endoteliais é por meio do sistema de *transwell*. Esse sistema é utilizado para mimetizar *in vitro* a migração celular que ocorre em um organismo, uma vez que são colocados quimioatratantes na parte inferior do sistema que irão interagir com as células endoteliais colocadas no compartimento superior, permitindo que as células migrem pelos poros presentes na membrana em direção a esse gradiente (CORNING, 2010). Os quimioatrantes podem ser meio de cultura, fatores de crescimento, quimiocinas, sobrenadante de células tumorais ou as próprias células tumorais (GARRIDO et al., 1995; SHIH et al., 2012).

Para o estudo do desenvolvimento tumoral, avaliado em modelos *in vitro*, ensaios de migração e invasividade são amplamente utilizados. Para tanto, são realizados ensaios bidimensionais como o *wound healing* ou ensaios tridimensionais como a migração por *transwell* sensibilizada com colágeno ou Matrigel. A caracterização do perfil celular tumoral é de suma importância, uma vez que esse é um fator chave para determinar a sobrevida clínica do paciente (KOVAřÍKOVÁ et al., 2014).

Assim, empregando modelos *in vitro* que reproduzem os eventos relacionados à angiogênese e tumorigênese, é possível a caracterização de substâncias com ações antiangiogênicas e antitumorais como alvos farmacológicos de grande interesse no controle do desenvolvimento do câncer.

1.4 CARCINOMA WALKER 256 E CULTURA DE CÉLULAS LLC WRC256

Em 1928, o Dr. George Walker, de Baltimore, observou uma massa tecidual no abdômen de uma rata albina prenhe. Ao analisar a massa tumoral, o Dr. Walker a identificou como sendo uma neoplasia espontânea de ratos originária do tecido mamário (EARLE, 1935). Ainda, este pesquisador demonstrou que a mesma era dividida em duas porções, uma hemorrágica e necrótica e a outra firme e granular, classificando a massa tecidual como carcinoma, o qual foi denominado carcinoma Walker 256 (EARLE, 1935). O próprio Dr. Walker iniciou a manutenção do tumor, implantando-o em mamas de ratas e, desde então, o tumor tem sido mantido por transplantes sucessivos ou em culturas de células *in vitro*. Dando continuidade aos estudos iniciados por Walker, Earle (1935) demonstrou que esse carcinoma era constituído por três zonas distintas, uma cápsula periférica constituída de fibras de colágeno e altamente vascularizada, em seguida, estão as células tumorais em crescimento e, ao centro, uma grande área necrótica. Esse tumor possui a eficácia de quase 100%, por ser bastante agressivo (EARLE, 1935).

O tumor de Walker 256 é capaz de desenvolver-se na forma sólida ou ascítica e possui capacidade de disseminação, tanto por via linfática como hematogênica, dependendo da via de inoculação (CARR et al., 1980; MATTOS et al., 1980). Desta forma, o tumor pode se desenvolver em regiões distintas, como o cérebro (MORIOKA et al., 1992), tecido subcutâneo (MARIA et al., 1994), muscular (SOARES et al., 1994), cavidade peritoneal (ROSA et al., 1993), entre outras. As células deste tumor assemelham-se a leucócitos, fato este caracterizado com marcadores imuno-histoquímicos de macrófagos (SIMPKINS et al., 1991) e comportam-se biologicamente como um linfoma/leucemia-símile (SOARES, 1989).

Esse tipo tumoral pode ser também mantido em cultura celular, uma vez que células da porção em crescimento do tumor quando colocadas em recipientes próprios para cultura apresentam características similares às células obtidas diretamente do tumor (EARLE, 1935) Para estabelecer qual meio de cultura ideal para manter as células provenientes do tumor

Walker 256, Earle (1935) testou salina, soro de rato, caldo de embrião de galinha, clara de ovo e soro de cavalo, sendo este mais eficaz em manter as células por um período mais longo. Ainda, este pesquisador descreveu que, após 133 dias em cultura, as células apresentavam uma arquitetura e organização tecidual típicas e similares àquelas do tumor encontrado pela primeira vez. Assim, foi estabelecida uma nova linhagem celular denominada LLC WRC256.

1.5 AÇÃO DAS PROTEÍNAS S100A8/S100A9 NA PROGRESSÃO TUMORAL

As proteínas S100A8 e S100A9 fazem parte de uma família de proteínas classificadas como S100, assim denominadas por serem solúveis em 100% de sulfato de amônia (ZIMMER, et al., 1995). São proteínas acídicas, de baixo peso molecular e uma das suas principais características é a presença de dois sítios ligantes de cálcio (KLIGMAN; HILT, 1988; ZIMMER et al., 1995; SCHAFER; HEINZMAN, 1996). A função das proteínas S100 é tecido-específica e sua ação tem sido sugerida na regulação homeostática de cálcio intracelular. Estas proteínas têm mostrado funções importantes em processos intracelulares, incluindo progressão do ciclo celular, regulação de eventos de fosforilação, interação membrana-citoesqueleto, transdução de sinal e metabolismo energético (ZIMMER et al., 1995; DONATO, 2001).

No que se refere à estrutura protéica, foi demonstrado que a S100A8 e a S100A9 possuem sítios de ligação para cálcio e zinco (STEINBAKK et al., 1990; SOHNLE; COLLINS-LECH; WIESSNER, 1991), sendo que as duas subunidades podem ser encontradas na forma de complexo denominado de calprotectina. Ainda, estudos mostraram homologia de 60-80% entre S100A8/9 humana, de rato e camundongo (EDGEWORTH et al., 1991).

A expressão da S100A8/A9 é restrita a estágios específicos de diferenciação mielóide, uma vez que essas proteínas são expressas por neutrófilos e monócitos circulantes, mas ausentes em linfócitos e macrófagos teciduais (LAGASSE; CLERC, 1988; ZWADLO et al., 1988; SRIKRISHNA, 2012). Adicionalmente, Yen et al. (1997) relataram também a expressão do complexo S100A8/A9 murino por células endoteliais, sendo a expressão da S100A9 observada após estimulação dessas células com LPS, IL-1 e TNF-α. Os neutrófilos e os monócitos possuem em seu citoplasma altas concentrações das proteínas S100A8 e A9, chegando a proporções de 45% das proteínas totais para os neutrófilos e 1% para monócitos

(EDGEWORTH; FREEMONT; HOGG, 1989). A calprotecnina se liga a receptores como Toll-like 4 (TLR4), RAGE e indutor de metaloproteinase de matriz extracelular em suas células alvo (SHIRLEY et al., 2014). Diversos tipos tumorais e melanócitos normais expressam os receptores TLR4, indicando assim que as proteínas S100A8/A9 agem sobre a regulação dessas células (SHIRLEY et al., 2014; EHRCHEN et al., 2009).

A secreção da S100A8/A9 foi demonstrada por Rammes et al. (1997), os quais descreveram que estas proteínas são secretadas por monócitos após ativação da PKC por uma via dependente de microtúbulos intactos. Essas proteínas interagem com o citoesqueleto através de um mecanismo dependente de cálcio, promovendo polimerização da tubulina e microtubulos (EHRCHEN et al., 2009). Camundongos que não possuem o complexo S100A8/A9 funcional mostram diminuição da migração de granulócitos, bem como no processo de regeneração após injúria (EHRCHEN et al., 2009).

Altos níveis de calprotectina foram detectados no soro de pacientes com artrite reumatóide, sarcoidose e fibrose cística, sugerindo que estas proteínas são secretadas em diferentes condições patológicas (KERKHOFF; KLEMPT; SORG, 1998). Considerando que altas concentrações do complexo S100A8/A9 são encontradas no fluido sinovial, fezes, urina e soro/plasma sanguíneo durante processo inflamatório, sua utilização vem sendo amplamente empregada como marcador laboratorial clínico de inflamação, uma vez que indica a ativação de fagócitos de forma mais sensível que a proteína C reativa e a creatinina sérica (FREEMONT; HOGG; EDGEWORTH, 1989; FOELL et al., 2004).

Dentre suas atividades biológicas, tem sido demonstrado que o complexo inibe o crescimento de células da medula, agindo como um fator regulador negativo do crescimento de células tumorais (YUI; MIKAMI; YAMAZAKI, 1995b). O complexo S100A8/A9 tem sido constantemente associado à malignidade, uma vez que vinte e um genes da família S100 estão agrupados à região 1q21, a qual é frequentemente removida, translocada ou duplicada em diferentes neoplasias (HEINZMAN; FRITZ; SCHÄFER, 2002). Em adição, este complexo protéico induz apoptose de alguns tipos de células tumorais tanto humanas, como murinas, sendo este efeito inibido pela presença de zinco (YUI; YAMAZAKI; MIKAMI, 1995a; YUI et al., 2002; EHRCHEN et al., 2009). Em estudo realizado por Ghavami et al. (2008a) com diferentes tipos de células tumorais demonstrou-se que a morte celular desencadeada pelas proteínas S100A8/A9 é mediada por membros da família Bcl-2 que faz parte da via de morte celular mitocondrial.

Recentemente foi demonstrado, *in vitro*, que uma linhagem de célula de carcinoma humana (KB), que não expressa as proteínas S100A8 e S100A9, após serem transfectadas

com essas proteínas apresentaram uma redução da metaloporteinase 2 (MMP-2), causando assim redução da invasão e migração celular, parâmetros importantes na metástase tumoral. Por outro lado, quando a expressão endógena da S100A8/A9 foi silenciada em células tumorais TR146, um carcinoma bucal, houve maior atividade da MMP-2, resultando no aumento da invasão e migração celular, mostrando que a calprotectina é importante na regulação do processo de metástase (SILVA et al., 2014).

Com relação ainda a atividade inibitória das proteínas S100A8/A9 sobre a progressão tumoral, ensaios realizados *in vitro* demonstraram que o complexo S100A8/A9, em altas concentrações 20–250µg/ml (aproximadamente 1–10µM), inibe o crescimento de diferentes tipos de células tumorais de camundongos e humanas, além de promover a citotoxicidade e apoptose destas células. O complexo S100A8/A9 induz apoptose de células tumorais por meio de dois mecanismos distintos. Um deles está associado ao zinco proveniente das células-alvo dos fagócitos ativados e outro acontece por meio da ligação célula-célula, possivelmente via ativação por ligação a receptores (GHAVAMI et al., 2008b; GHAVAMI et al., 2009).

A atividade apoptótica da S100A8/A9 contra células tumorais, juntamente com as demonstrações de células positivas para essas duas proteínas, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, se acumulam ao longo da margem invasiva de carcinomas, e que fagócitos ativados liberam especificamente S100A8/A9, indicam que os polimorfonucleares são potenciais mediadores de efeitos antitumorais e desempenham um papel importante na resposta antitumoral (GHAVAMI et al., 2009).

Adicionalmente, a metástase mediada por Id1 (inibidor de ligante de DNA 1, responsável por regulação da expressão gênica) para o pulmão de camundongos, em modelo de indução de câncer de mama, é inibida pela proteína S100A9. Ainda, a proteína S100A9 foi responsável por induzir diminuição do fenótipo migratório e invasivo de células tumorais MCF-7, avaliado em ensaio de migração pelo sistema de *transwell* e ensaio de invasão *in vitro* (GUMIREDDY et al., 2014). Interessantemente, foi também observado que a proteína S100A9 é expressa em maior quantidade em células tumorais não invasivas. Corroborando essa informação, demonstrou-se em diversas linhagens celulares e amostras de células primárias de câncer de mama provenientes de pacientes, por RT-PCR, que as células que possuem perfil migratório expressam menos S100A9 do que as células que não promovem metástase (GUMIREDDY et al., 2014).

Com base nas considerações descritas acima, as proteínas S100A8/A9 podem ser um alvo importante na terapia imune de células malignas, já que: 1) S100A8/A9 é um agente natural do organismo e provavelmente não irá acarretar uma resposta imune sobre essas

proteínas; 2) com base nas proteínas S100A8/A9, pequenas moléculas análogas poderiam ser desenvolvidas, as quais poderiam ter a mesma atividade anticâncer e com maior propriedade farmacocinética e estabilidade; 3) o conhecimento da via de morte celular induzida pelas proteínas da família S100 pode fornecer novos alvos para terapias câncer-especificas que são mais efetivas e desencadeiam menos efeitos colaterais; e 4) a terapia baseada nas proteínas S100A8/A9 não é genotóxica, assim poderia prevenir o risco de desenvolvimento de tumor secundário por sobrevivência celular (GHAVAMI et al., 2009).

Em contrapartida aos efeitos descritos acima, as proteínas S100A8/A9, em baixas concentrações (<20µg/mL), promovem proliferação de células tumorais e de células endoteliais por meio de diferentes mecanismos (LI et al., 2012; SRIKRISHNA, 2012). Assim, 100pg/mL e 1ng/mL de S100A8 e S100A9, respectivamente, promovem a migração celular de carcinoma de pulmão e de células B16 em melanoma em câmaras Boyden. Além disso, foi demonstrado que o tratamento de B6F10 em melanoma com essas duas proteínas a 0,2 e 1µg/mL estimula a expressão de metaloproteinases de matriz associadas com metástase tumoral e promove migração quimiotática de células via RAGE-dependente (SRIKRISHNA, 2012). Mais recentemente, experimentos utilizando proteínas recombinantes S100A8 e S100A9 humanas, nas concentrações de 100pg/mL e 1ng/mL respectivamente, mostraram que essas proteínas induzem um aumento da proliferação, migração celular pelo sistema de *transwell* e invasão de melanócitos e células de melanoma via receptor RAGE (SHIRLEY et al., 2014). Ainda, S100A8/A9 aumentam a migração de células de câncer retal, de cólon e pancreático a uma concentração menor do que 2µg/mL (SRIKRISHNA, 2012). A expressão intracelular de S100A8 e S100A9 por tumores é, possivelmente, um fator que contribui para a invasão tumoral (SRIKRISHNA, 2012). Em estudo que sugeriu o complexo S100A8/S100A9 como um possível marcador para invasão celular de câncer de mama humano mediado por H-Ras (oncogene da família Ras), foi demonstrado que as proteínas S100A8/A9 convertem a célula tumoral em um fenótipo migratório, aumentando a expressão de metaloproteinases de matriz (MONN et al., 2008).

Em adição aos efeitos pro-tumorais das S100A8/S100A9, foi demonstrado que essas proteínas são capazes de interferir com a angiogênese, fator determinante para a progressão tumoral. Assim, em um estudo realizado com linhagem de célula endotelial vascular de cordão umbilical humano (HUVEC) foi demonstrado que estas duas proteínas sozinhas ou em combinação, em baixas concentrações, promoveram proliferação, migração celular e formação de estruturas tubo-like em Matrigel (LI et al., 2012). Ainda, quando combinadas, as proteínas S100A8 e S100A9 promovem efeito aditivo, sugerindo que as duas proteínas agem

sinergicamente. Esses dados sugerem que as proteínas S100A8/A9, as quais podem ser provenientes tanto de células do infiltrado inflamatório, quanto de células tumorais, desempenham papel importante na inter-relação entre inflamação, angiogênese e tumorigênese (LI et al., 2012).

Desta forma, a literatura demonstra um efeito dual das proteínas S100A8/S100A9 sobre a progressão tumoral, em que são observadas atividades pró ou antitumoral das mesmas. As discrepâncias demonstradas para o efeito do complexo podem ser devido tanto às suas concentrações extracelulares, quanto às diferentes vias de sinalização envolvidas nestes efeitos. Neste sentido, as proteínas S100A8/A9 podem induzir apoptose de células tumorais, como células de adenocarcinoma gástrico humano e células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 via independente de receptor RAGE. Por outro lado, ao se ligar especificamente a RAGE, essas proteínas induzem aumento da proliferação de alguns tipos tumorais através das vias de sinalização intracelular MAPK e NF-κB (GHAVAMI et al., 2009; SRIKRISHNA, 2012).

1.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO PEPTÍDEO DO C-TERMINAL DA PROTEÍNA S100A9 MURINA (pS100A9m)

Em estudo realizado pelo nosso grupo com a proteína S100A9 isolada, foi demonstrado que essa proteína induz efeito antinociceptivo em animais submetidos ao teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, um modelo de dor inflamatória (GIORGI et al., 1998). Ainda, considerando que a proteína S100A9 é expressa por neutrófilos, foi avaliada a possível correlação entre a antinocicepção e o perfil migratório dessas células para o foco inflamatório em modelo de peritonite induzida por diferentes agentes irritantes. Desta forma, foi demonstrado que durante a peritonite induzida pelo glicogênio, carragenina ou zimosan existe uma correlação entre a migração neutrofílica e a antinocicepção detectada em camundongos, avaliada no modelo de contorções abdominais, sugerindo que o efeito antinociceptivo observado é decorrente possivelmente da ação da proteína S100A9 secretada pelos neutrófilos presentes na cavidade peritoneal dos animais (GIORGI et al., 1998; PAGANO, 2001; PAGANO et al., 2002; PAGANO; MARIANO; GIORGI, 2006).

Com base nas observações sobre o efeito antinociceptivo da proteína S100A9, foi sintetizado um peptídeo idêntico à região C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9m), considerando-se a sequência de aminoácidos descrita por Raftery et al. (1996). Esse peptídeo é composto por 19 aminoácidos correspondentes às posições H92-G110 da região C-terminal da S100A9.

Assim, a fim de caracterizar se este peptídeo tinha atividade antinociceptiva similar à observada com a proteína inteira, foram realizados experimentos utilizando modelos distintos de hiperalgesia inflamatória, em que foi verificado que o pS100A9m induz antinocicepção no modelo de hiperalgesia mecânica induzido por pressão na pata de rato, bem como, no teste das contorções abodominais e de hiperalgesia térmica em camundongos (DALE et al., 2006). Este efeito foi observado quando o peptídeo foi administrado em diferentes concentrações por via intraperitoneal ou por via oral, demonstrando que o C-terminal da proteína S100A9 murina inibe a dor inflamatória (DALE et al., 2006; DALE et al., 2009). Ainda, o pS100A9m, em diferentes concentrações, foi capaz de inibir a dor neuropática experimental em modelo de constrição do nervo ciático em ratos avaliados pelo teste de pressão da pata e pelos filamentos de von Frey, demonstrando que esse peptídeo é capaz de inibir tanto a dor aguda quanto crônica (PACOLLA et al., 2008).

No que diz respeito à função celular, foi observado que o pS100A9m inibe o espraiamento e a fagocitose por células peritoneais aderentes de camundongos, estimuladas ou não com agonistas de PAR1 e PAR2, sugerindo um papel modulatório deste peptídeo sobre a resposta inflamatória (PAGANO et al., 2005, 2009). Além disso, sabendo que as células peritoneais aderentes são constituídas por macrófagos e células B-1, foi demonstrado que o pS100A9m não possui efeito direto sobre macrófagos, mas apenas sobre células B-1, as quais modulam a funcionalidade de macrófagos via interleucina 10 (IL-10) (PAGANO et al., 2014).

Apesar dos trabalhos realizados pelo nosso grupo, enfocando a atividade inibitória do pS100A9m sobre a nocicepção e sobre algumas funções de células inflamatórias, não foram realizados até o momento estudos a respeito do efeito do pS100A9m sobre a progressão tumoral e a angiogênese, fatores cruciais relacionados a neoplasias e que são modulados pela proteína S100A9. Ainda, não se conhece a importância da atividade da porção C-terminal da proteína S100A9 sobre a fisiopatologia da inter-relação entre a inflamação, a tumorigênese e a angiogênese.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de a literatura demonstrar que a proteína S100A9 tem a capacidade de influenciar a resposta inflamatória, a progressão tumoral e a angiogênese, até o momento não foi investigada a atividade do peptídeo do C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9m) sobre o crescimento de células tumorais e a angiogênese, fator preponderante para a progressão e metástase tumoral. Ainda, uma vez que trabalhos realizados pelo nosso grupo demonstraram que o C-terminal da proteína S100A9 murina inibe a nocicepção e algumas funções de células inflamatórias, estudos são necessários para compreender se o pS100A9m também interfere, *in vitro*, com a fisiopatologia da tumorigênese e da angiogênese.

3 OBJETIVOS

Com base nas considerações descritas acima, bem como nos resultados obtidos pelo nosso grupo que demonstram atividade inibitória do peptídeo do C-terminal da S100A9 sobre alguns parâmetros relacionados ao processo inflamatório, o presente projeto visa estabelecer a possível atividade modulatória *in vitro* deste peptídeo sobre eventos envolvidos tanto na progressão tumoral quanto na angiogênese.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliar o efeito do pS100A9m sobre:

1) a proliferação de células endoteliais tímicas (tEnd.1);
2) a adesão das células tEnd.1 a diferentes componentes da matriz extracelular;
3) a migração das células tEnd.1, pelo método do *Wound healing*;
4) a migração das células tEnd.1, por meio do sistema de *transwell*;
5) a formação de tubos em Matrigel, em ensaio 3D utilizando células tEnd.1;
6) a proliferação de células tumorais da linhagem LLC Walker 256 (LLC WRC256);
7) a adesão das células LLC WRC256 a diferentes componentes da matriz extracelular;
8) a migração das células LLC WRC256, pelo método do *Wound healing*.

4 METODOLOGIA

4.1 SÍNTESE DO PEPTÍDEO CORRESPONDENTE AO C-TERMINAL DA PROTEÍNA S100A9 MURINA:

O peptídeo, contendo 19 aminoácidos (His-Glu-Lys-Leu-His-Glu-Asn-Asn-Pro-Arg-Gly-His-Gly-His-Ser-His-Gly-Lys-Gly; H^{92}-G^{110}), com sequência idêntica à porção C-terminal da proteína ligante de cálcio S100A9 murina (pS100A9m), foi sintetizado em fase sólida pela técnica FMOC. A caracterização e purificação desses peptídeos foram realizadas por HPLC e a massa determinada por espectroscopia do tipo MALDI-TOF. A síntese foi realizada no Laboratório de Proteômica Funcional do Instituto Butantan pelo Dr. Robson Lopes de Melo. O peptídeo foi diluído em HCl 0,01N, na concentração de 1mg/mL, e mantidos em freezer -20º C até o momento do uso.

4.2 LINHAGENS CELULARES

4.2.1 Célula endotelial tímica tEnd.1

Para realização dos estudos de proliferação, migração pelos métodos de *wound healing* e *transwell*, adesão celular e ensaio de formação de tubos foi utilizada a linhagem de células endoteliais tímicas (tEnd.1), derivada de endotelioma de timo de camundongo C57BL/6. Essas células foram estabelecidas como endotelial por Williams, Courtneidge e Wagner (1988), e têm sido utilizadas em diferentes trabalhos como modelo experimental *in vitro* (BORASCHI et al., 1991; MENDES-DA-CRUZ et al., 2008; RAMOS, 2008; KATO et al., 2013). Estas células foram fornecidas pela Dra. Ana Maria Moura, do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan.

4.2.2 Células tumorais LLC Walker 256

Foram utilizadas células LLC WRC256, linhagem correspondente ao tumor Walker 256 (HULL, 1953), nos ensaios de proliferação, migração pelo método do *wound healing*, adesão celular e obtenção do sobrenadante empregado no ensaio de migração pelo sistema *transwell*. Estas células foram adquiridas pela Dra. Sandra Sampaio Vessoni, do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan [Células LLC WRC256 – Sigma-Aldrich® 87061101].

4.2.3 Cultivo de células tEnd.1 e LLC WRC256

Amostras de células tEnd.1 e LLC WRC256 são mantidas em nitrogênio líquido ou em freezer -80ºC. Para restabelecimento às condições de cultura, as células foram descongeladas e transferidas para garrafas de 75cm^3 próprias para cultivo, com meio de cultura RPMI 1640 [Gibco®, Grand Island, NY, EUA], contendo soro fetal bovino (SFB) a 10% e L-glutamina a 1%, e acondicionadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por, em média, 48 horas. Após estarem em estado de semiconfluência (80%), foram submetidas ao tratamento com tripsina/EDTA [Invitrogen®] e, posteriormente, utilizadas de acordo com os protocolos experimentais descritos abaixo. Para a realização do ensaio de *transwell*, foi utilizado o meio condicionado obtido de células LLC WRC256 mantidas em cultura por, em média, 48 horas (GARRIDO et al., 1995; SAHA et al., 2010). Esse meio foi congelado em freezer -20ºC até o momento da realização do experimento.

4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para avaliar o efeito do pS100A9m sobre a proliferação de células tEnd.1 e LLC WRC256, 5,0x10^4 células/poço, em placas de 6 poços, foram aderidas por 1 hora. Em seguida as culturas foram incubadas na presença de diferentes concentrações do peptídeo (para tEnd.1: 0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço e para LLC WRC256: 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço) ou apenas com meio de cultura (controle), por mais 1 hora. Após o tratamento, os poços foram

lavados e acrescidos com RPMI 10% de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas. Após esse período de incubação, as células foram desaderidas com tripsina/EDTA e transferidas para microtubos, centrifugadas, coradas com azul de Tripan e contadas em Câmara de Neubauer (HOTCHKISS et al., 2002; KATO et al., 2013). A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com Azul de Tripan.

4.4 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

Placas contendo 96 poços foram sensibilizadas com diferentes componentes de matriz extracelular (colágeno tipo I, de cauda de rato-10µg/poço [Gibco®], laminina-10µg/poço [Sigma®] e fibronectina-3µg/poço [Gibco®]), em PBS por 16 horas a 4ºC. As placas foram incubadas com 1% de BSA em PBS, a 37ºC por 1 hora para bloquear sítios inespecíficos de ligação. As células tEnd.1 ou LLC WRC256 ($1,0x10^5$/poço) pré-tratadas com o pS100A9m por 1 hora a 37ºC foram adicionadas às placas e posteriormente incubadas a 37ºC por mais 1 hora. As células que não aderiram foram removidas dos poços por meio de duas lavagens consecutivas com PBS. As células aderidas foram incubadas com 30µL de MTT (5mg/mL), dissolvido em PBS, por 3 horas e, em seguida, foram adicionados 100µl de SDS 10%, dissolvido em PBS (contendo 0,01M de HCl). As placas foram mantidas na estufa a 37ºC por 18 horas. Após esse período, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 595nm em leitor de ELISA [Multiskan EX, Labsystem] (LEAVESLEY et al., 1992). Os resultados estão expressos em número de células aderidas, calculado por meio de curvas padrão constituídas, partindo-se das suspensões de células nas concentrações de 10^6 células/mL, utilizando número de células correspondentes a 65, 50, 35, 20, 10, 5 e 2,5 µL dessa suspensão, incluídas na mesma placa teste, imediatamente antes da adição de MTT.

Para as células endoteliais tímicas, o peptídeo da S100A9m foi usado nas concentrações de 0,585; 1,17; 2,35; 4,7µM/poço para os ensaios com o colágeno tipo I e com a fibronectina e na concentração de 2,35µM/poço para a laminina. Já para as células tumorais, o pS100A9m foi utilizado nas concentrações de 0,2925; 0,585; 1,17; 2,35; 4,7; 9,4 e 18,8µM/poço para os ensaios com o colágeno tipo I e com a laminina e nas concentrações de 1,17; 2,35 e 4,7µM/poço para a fibronectina.

4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO DO *WOUND HEALING*

O ensaio *wound healing* é usado para avaliar o movimento de células no campo vazio criado por uma interrupção na monocamada de cultura de células (DENKER e BARBER, 2002). Para tanto, foram plaqueadas $1x10^6$ células endoteliais tímicas tEnd.1 ou células tumorais LLC WRC256 na presença de meio RPMI 10% por 2 horas em placa de 24 poços contendo lamínulas de vidro pré-sensibilizadas com colágeno tipo I em PBS por 1 hora a 37ºC. Após a aderência, o meio foi retirado e na monocamada de células foram feitas interrupções, com uma ponteira de 200µl estéril, com o objetivo de criar uma área livre de células. Em seguida, as células foram incubadas na presença ou ausência do pS100A9m em diferentes concentrações (para tEnd.1: 0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço e para LLC WRC256: 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço), por 1 hora. Então, o meio de cultura foi substituído por RPMI 1% de soro fetal bovino. Essa concentração de soro fetal bovino impede que as células se proliferem, porém preserva a viabilidade celular. As placas deixadas em estufa 37ºC e 5% CO_2 por, aproximadamente, 24 horas. Após esse período, as células foram coradas pelo método de Rosenfeld (1947) e utilizando microscópio de luz (Olympus BX 510) foram fotografados cinco campos aleatórios por lamínula e as células migradas contadas (LIANG; PARK; GUAN, 2007; KROENING; GOPPELT-STRUEBE, 2010; van der MEER et al., 2010; KATO et al., 2013).

4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS tEnd.1 PELO SISTEMA *TRANSWELL*

A migração de células endoteliais tEnd.1 foi avaliada pelo sistema de *transwell*, empregando membranas de policarbonato com 6,5mm de diâmetro, e poros de 8,0µm [Costar®]. Essas membranas foram colocadas em poços contendo 1ml de meio de cultura 10% de soro fetal bovino por 15 minutos em estufa de CO_2, para hidratar os poros e facilitar a migração celular. Para este experimento, foram utilizadas $5x10^4$ células tEnd.1 por poço, as quais foram incubadas ou não com o pS100A9m na concentração de 2,35µM/poço por 1 hora. Para a realização do ensaio, em uma placa contendo 24 poços foram adicionados 600µl/poço de meio RPMI 10% ou 600µl/poço de meio condicionado obtido da cultura de células tumorais LLC WRC256. Posteriormente, sobre o meio, foi colocado o *transwell*, e, em

seguida, sobre a face superior foram colocados 200µl de meio RPMI 2% (para formar um gradiente de concentração), contendo $5x10^4$ células tEnd.1, tratadas ou não com o pS100A9 como descrito acima. O tempo de migração foi de 5 horas em estufa com 5% de CO_2, a 37°C (van der MEER et al., 2010; SAHA et al., 2010; KATO et al., 2013; WANG et al., 2014). Após este período, o *transwell* foi retirado do poço, as células migradas foram coradas pelo método de Rosenfeld (1947) e, com o auxílio de um bisturi, as membranas foram retiradas, colocadas em uma lâmina, cobertas com uma lamínula de vidro e vedadas com esmalte. Em seguida, utilizando microscópio de luz (Nikon Eclipse 80i) foram fotografados seis campos aleatórios por membrana e as células migradas contadas utilizando o software ImageJ®. Os resultados estão expressos como a média do número de células migradas obtidas dos seis campos quantificados de um total de cinco membranas por tratamento.

4.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE TUBOS COM CÉLULAS tEnd.1

Placas de 96 poços foram polimerizadas com 60µl de Matrigel por 30min, em seguida, $2,5x10^4$ células tEnd.1 foram incubadas por até 6h em dois protocolos distintos. Em um dos protocolos, as células foram pré-tratadas ou não por 1h com o pS100A9m (2,35 ou 4,7µM/poço) em RPMI a 2% de soro fetal bovino. Em seguida, as células foram centrifugadas por 20seg e ressupensas apenas em RPMI a 2% de SFB para retirar o tratamento e adicionadas à placa. Em outro experimento, o pS100A9m permaneceu por todo o período da formação dos tubos. As formações tubulares foram fotografados em 4 campos distintos por poço em microscopia de luz (Nikon Eclipse TS100) e contadas (ARNAOUTOVA; KLEINMAN, 2010; DECICCO-SKINNER et al., 2013; WANG et al., 2013).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média ± e.p.m. (erro padrão da média) e analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey-Kramer (INSTAT – GraphPad Software), comparando-se os valores obtidos entre os grupos. Os gráficos foram confeccionados

utilizando o programa GraphPad Prism vs 5.01. As diferenças foram consideradas significativas para o nível de $p<0,05$ (5%).

5 RESULTADOS

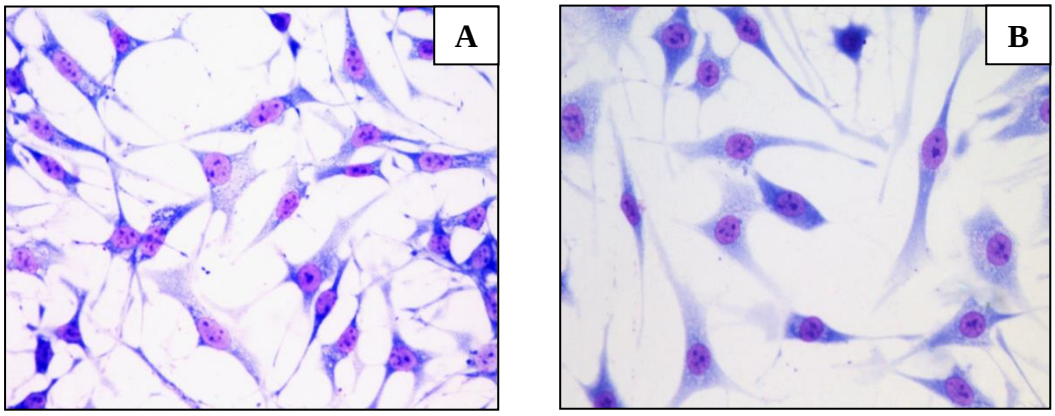
Experimentos utilizando células endoteliais tímicas tEnd.1:

5.1 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS tEnd.1 EM CULTURA

A **figura 2A** demonstra a cultura de células endoteliais da linhagem tEnd.1, após 24 horas de cultura. Após este período de cultivo, as células apresentaram a morfologia característica deste tipo celular, mantendo-se em monocamada, com aderências célula-célula e projeções da lamelipódia e filopódia típicas de uma célula endotelial. A **figura 2B** é representativa do tratamento das células endoteliais com o pS100A9m, por 1 hora, em que é observada diminuição do contato célula-célula e das protrusões citoplasmáticas após 24 horas em cultura.

A viabilidade celular, tanto do controle, quanto das células incubadas em diferentes concentrações do peptídeo (avaliada pelo teste de exclusão por azul de Tripan 1%) sempre foi acima de 98% (*dados não mostrados*).

Figura 2 - Células endoteliais da linhagem tEnd.1 em cultura



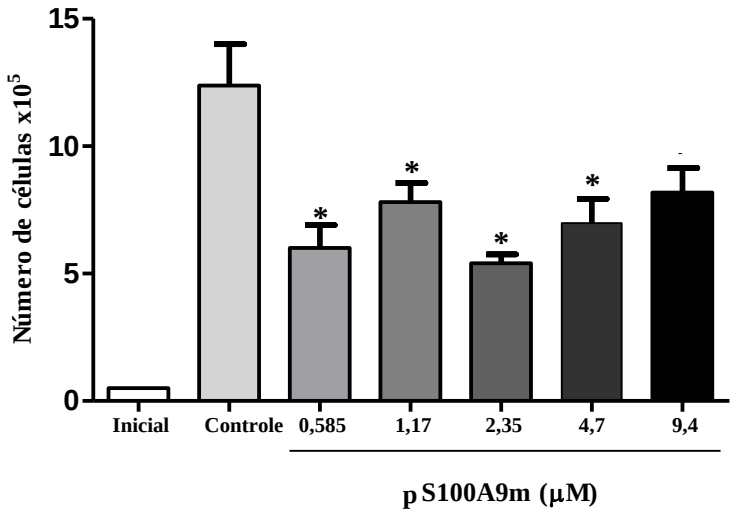
Fonte: MORAES, N. F., 2013.

Legenda: Fotomicrografia de células endoteliais tímicas (tEnd.1) coradas pelo método de Rosenfeld. **Figura 2A)** grupo controle e **2B)** após o pré-tratamento com pS100A9m (9,4µM, por 1 hora). O registro fotográfico foi realizado por câmera digital Leica DFC 420 acoplada ao microscópio Olympus BX 51, utilizando o software Image-Pro Plus 5.1.

5.2 EFEITO DO pS100A9m SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS tEnd.1

Quando as células tEnd.1 foram incubadas com o peptídeo da S100A9m, as concentrações de 0,585; 1,17; 2,35; 4,7µM/poço inibiram significativamente a proliferação celular, quando comparadas ao grupo controle, tratado apenas com meio de cultura (**Figura 3**). As porcentagens de inibição foram 51%, 36%, 56% e 43%, respectivamente. A concentração de 9,4µM não interferiu com a proliferação das células tEnd.1. Apesar de a concentração de 2,35µM do peptídeo ter acarretado em um efeito inibitório mais acentuado, não foi observada diferença estatisticamente significativa na inibição entre as concentrações utilizadas. (**Figura 3**).

Figura 3 - Efeito do pS100A9m sobre a proliferação de células endoteliais tEnd.1



Notas: As células endoteliais tímicas ($5{,}0x10^4$/poço) foram plaqueadas em placas de 6 poços e incubadas com diferentes concentrações do peptídeo (0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço) ou apenas com meio de cultura por 24 horas, a 37ºC em estufa de CO2. Após esse período, as células foram tripsinizadas e transferidas para microtubos, coradas com Azul de Tripan e contadas em Câmara de Neubauer. Foram analisadas 3 amostras por concentração. Os resultados são representativos de 2 ensaios distintos. *$p<0{,}05$ em relação ao grupo controle.

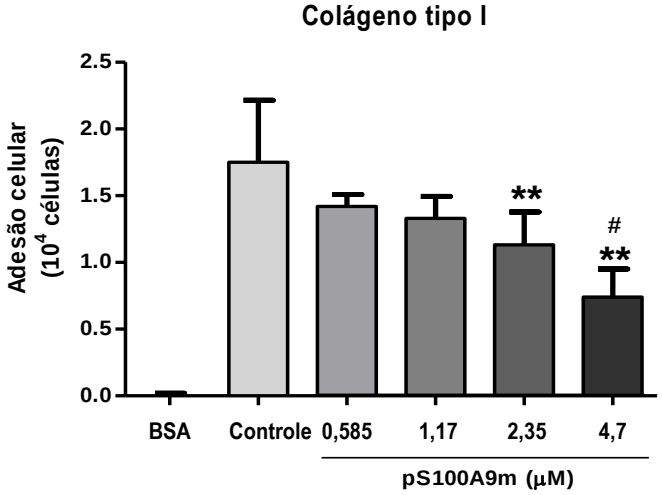
5.3 EFEITO DO pS100A9m SOBRE A ADESÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS TÍMICAS (tEnd.1) EM DIFERENTES LIGANTES DA MATRIZ EXTRACELULAR

A fim de investigar se o pS100A9m tem capacidade de interferir com a adesão da célula endotelial em diferentes ligantes naturais, foram utilizadas as concentrações de 0,585; 1,17; 2,35; 4,7µM/poço do peptídeo para a adesão ao colágeno tipo I e a fribronectina. Para a laminina, foi utilizada apenas a concentração de 2,35 µM/poço do pS100A9m.

Conforme demonstrado nas **figuras 4, 5 e 6**, as células endoteliais foram responsivas aos diferentes componentes de matriz, quando comparado ao grupo controle (negativo), composto por poços sensibilizados com BSA 1%.

Em relação à adesão das células endoteliais ao colágeno tipo I (10µg/mL), foi demonstrado que apenas as concentrações de 2,35 e 4,7µM/poço do pS100A9m inibiram significativamente essa função, sendo suas porcentagens de inibição 36% e 54%, respectivamente, quando comparada ao grupo controle (**Figura 4**). A concentração de 4,7µM/poço, a qual foi estatisticamente diferente da concentração de 2,35µM/poço, foi a mais efetiva em inibir a adesão das tEnd.1 a esse componente de matriz extracelular.

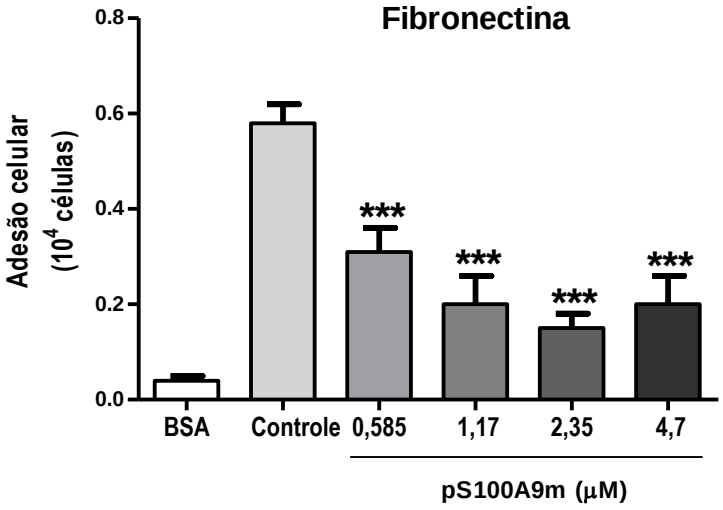
Figura 4 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células endoteliais tEnd.1 ao Colágeno tipo I



Notas: Células endoteliais tímicas ($1,0x10^5$) foram previamente incubadas, por 1h, com o pS100A9m nas concentrações 0,585; 1,17; 2,35; 4,7µM/poço ou apenas meio de cultura, foram adicionadas a placas de 96 poços pré-sensibilizadas com colágeno tipo I (componente de matriz extracelular-10µg/poço) ou com BSA 1% por mais 1h. As células aderidas foram incubadas com MTT por 3 horas e, após esse período, com SDS por 18 horas. Em seguida, foi feita a leitura espectrofotométrica a 595nm em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystem). ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle. #$p<0,01$ por comparação com as demais concentrações do pS100A9m.

Já, em relação à adesão à fibronectina (3µg/mL), o peptídeo inibiu a adesão das células endoteliais nas concentrações de 0,585µM/poço (46%), 1,17µM/poço (65%), 2,35µM/poço (74%) ou 4,7µM/poço (65%), em relação ao grupo controle (**Figura 5**). Entretanto, não há diferença estatisticamente significativa do efeito inibitório entre as concentrações utilizadas.

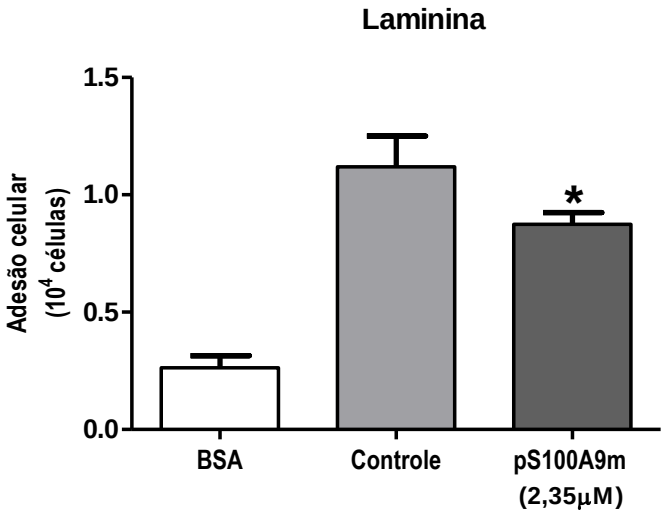
Figura 5 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células endoteliais tEnd.1 à Fibronectina



Notas: Células endoteliais tímicas ($1,0x10^5$) foram previamente incubadas, por 1h, com o pS100A9m nas concentrações 0,585; 1,17; 2,35; 4,7µM/poço ou apenas meio de cultura, foram adicionadas a placas de 96 poços pré-sensibilizadas com fibronectina (componente de matriz extracelular-3µg/poço) ou com BSA 1% por mais 1h. As células aderidas foram incubadas com MTT por 3 horas e, após esse período, com SDS por 18 horas. Em seguida, foi feita a leitura espectrofotométrica a 595nm em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystem). ***$p<0,001$ em relação ao grupo controle.

Outro componente de matriz extracelular avaliado foi a laminina (10µg/mL). Para a realização deste ensaio foi utilizada a concentração de 2,35µM, que apesar de não ser significativamente diferente das outras concentrações utilizadas, tende a uma atividade mais efetiva no ensaio de proliferação e adesão a fibronectina. A **figura 6** demonstra que a concentração de 2,35µM/poço do pS100A9m também inibiu a adesão das células endoteliais em 22%, quando comparado ao grupo controle.

Figura 6 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células endoteliais tEnd.1 à Laminina



Notas: Células endoteliais tímicas ($1,0x10^5$) foram previamente incubadas, por 1h, com o pS100A9m na concentração de 2,35µM/poço ou apenas meio de cultura, foram adicionadas a placas de 96 poços pré-sensibilizadas com laminina (componente de matriz extracelular-10µg/poço) ou com BSA 1% por mais 1h. As células aderidas foram incubadas com MTT por 3 horas e, após esse período, com SDS por 18 horas. Em seguida, foi feita a leitura espectrofotométrica a 595nm em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystem). *$p<0,05$ em relação ao grupo controle.

5.4 EFEITO DO pS100A9m NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS tEnd.1

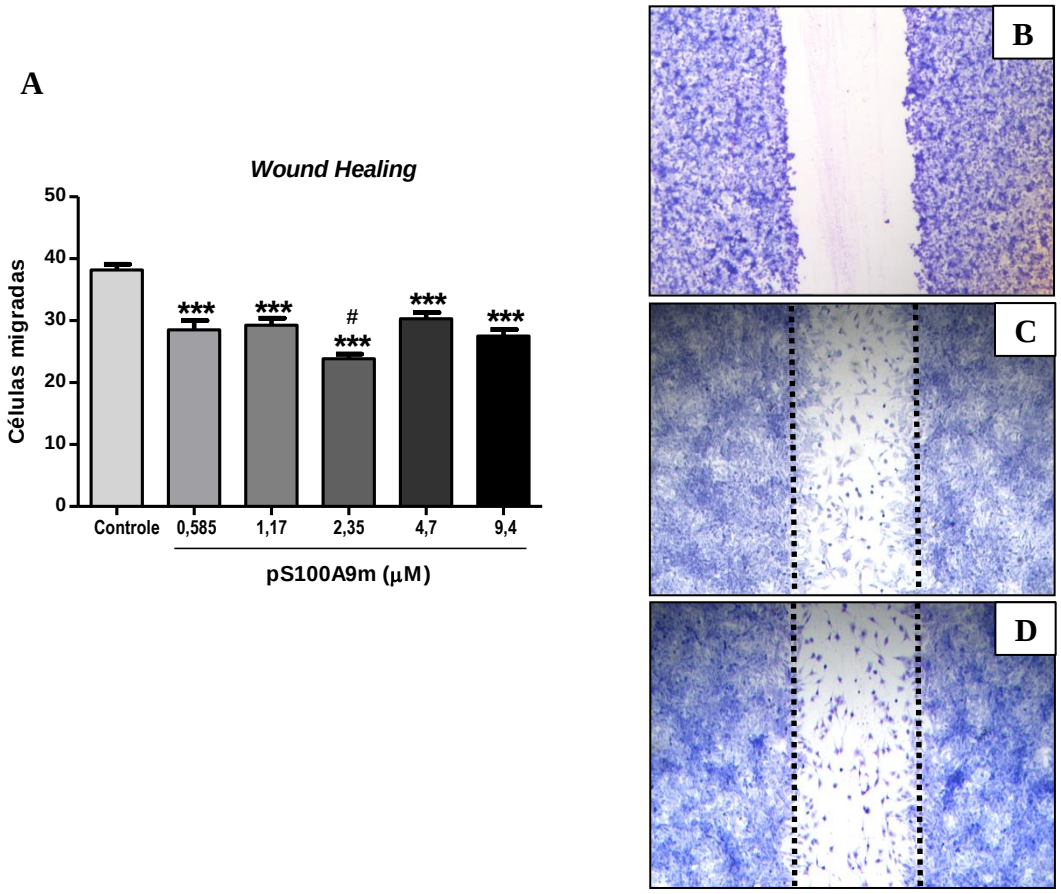
5.4.1 Migração pelo método do *Wound healing*

Neste ensaio, o *wound healing* foi utilizado para avaliar o movimento das células endoteliais no campo vazio criado por uma interrupção na monocamada celular.

Conforme demonstrado na **figura 7A,** foi observada ação inibitória do pS100A9m sobre a migração das células endoteliais nas concentrações de 0,585µM/poço (25%); 1,17µM/poço (23%); 2,35µM/poço (37%); 4,7µM/poço (21%) ou 9,4µM/poço (28%), quando comparado com o controle. A concentração de 2,35µM/poço induziu efeito inibitório estatisticamente diferente das outras concentrações do pS100A9m avaliadas.

As **figuras 7B, 7C e 7D** são fotomicrografias representativas das culturas celulares utilizadas para avaliar a migração de células tEnd.1 pelo método do *wound healing*. A **figura 7B** corresponde ao tempo 0, período em que a monocamada foi interrompida. A **figura 7C** corresponde ao grupo controle, células incubadas apenas com meio de cultura, em que foi observada a migração das células endoteliais tímicas para o campo vazio 24 horas após a interrupção da monocamada. A **figura 7D** representa o grupo tratado com o peptídeo da S100A9m por 1 hora após a interrupção da monocamada. Após 24 horas deste procedimento, foi observada uma inibição da migração das células endoteliais para o campo vazio, em comparação com grupo controle (representado na **Figura 7C**).

Figura 7 - Efeito do pS100A9m sobre a migração de células endoteliais tEnd.1 pelo método do *Wound healing*



Notas: Células endoteliais tímicas ($1{,}0x10^6$ por poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro pré-sensibilizadas com colágeno tipo I, por 1 hora, em seguida foram feitas interrupções na monocamada de células com uma ponteira de 200µl e incubadas, por 1 hora, com diferentes concentrações do peptídeo (0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço) ou apenas com meio de cultura. As células foram então incubadas por 24 horas com RPMI 1% de soro fetal bovino, a 37ºC em estufa de CO_2. Após esse período, as células foram coradas e lâminas montadas com Entellan®. Foram contados 5 campos aleatórios em 6 amostras por concentração.

Fonte: MORAES, N. F., 2013.

Legenda: Figura 7A) Os resultados são representativos de 2 ensaios distintos. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. #p<0,05em relação as demais concentrações do pS100A9m. O efeito do peptídeo sobre a migração das células tEnd.1 avaliado pelo método do ***wound healing*** está representado em: **7B**) monocamada interrompida no tempo 0; **7C**) após 24 horas de incubação com meio de cultura (controle) e **7D**) após o pré-tratamento com pS100A9m (2,35µM, por 1 hora). Fotomicrografias obtidas nos tempos 0 hora e 24 horas no aumento de 5x. O registro fotográfico foi realizado por câmera digital Leica DFC 420 acoplada ao microscópio Olympus BX 51, utilizando o software Image-Pro Plus 5.1.

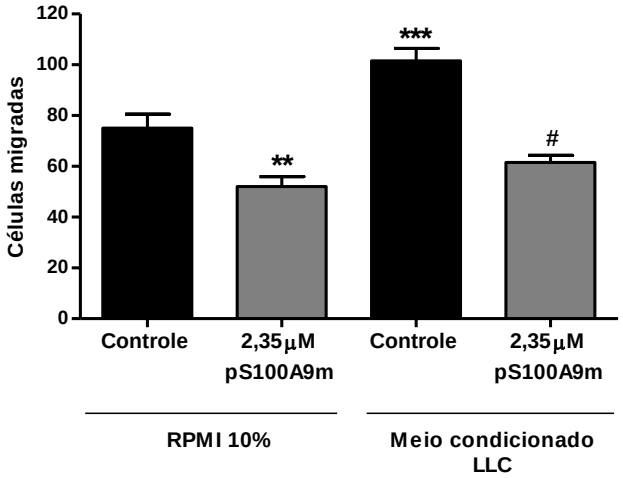
5.4.2 Efeito do pS100A9m sobre a migração de células endoteliais tEnd.1 pelo sistema *transwell*

Células tEnd.1 foram tratadas por uma hora com o pS100A9m na concentração de 2,35µM, antes de serem adicionadas ao sistema de *transwell* e o tempo de migração utilizado nos ensaios foi de 5 horas, tanto para o meio RPMI 10%, quanto para o meio condicionado obtido das células LLC WRC256.

Os dados obtidos demonstraram que quando as células tEnd.1 foram tratadas com o pS100A9m, a migração celular foi inibida frente aos dois meios de cultura utilizados (**Figura 8**). A porcentagem de inibição induzida pelo pS100A9m frente ao meio RPMI 10% foi de 26% quando comparado ao grupo controle, tratado apenas com meio de cultura a 2% (**Figura 8**). Em adição, após o tratamento com o pS100A9m, foi detectada inibição significativa (37%) da migração celular das tEnd.1 para o meio condicionado de células LLC WRC256 (**Figura 8**). Ainda, o meio condicionado de células LLC WRC256 induziu uma migração significativamente maior das células tEnd.1 (34%) quando comparado ao grupo em que as tEnd.1 estavam na presença de meio RPMI 10%, demonstrando que as células tumorais liberam fatores quimioatratantes para as células endoteliais (**Figura 8**).

As **figuras 9** e **10** são fotomicrografias representativas desse ensaio. A **figura 9** representa e ensaio de migração das células tEnd.1 para o meio RPMI 10% em que é observado que além da migração ser inibida, houve também diminuição das projeções da lamelipódia e filopódia e ligação célula-célula, como observado nas **figuras 9D, 9E** e **9F**, em comparação com o grupo controle, células tratadas apenas com meio de cultura a 2% (**Figuras 9A, 9B e 9C**). Com relação ao experimento realizado com o meio condicionado obtido das células tumorais LLC WRC256 (**Figura 10**), foi observado que as células tEnd.1 também migraram em direção ao meio condicionado e, semelhante ao obtido com o meio RPMI 10%, e que o pS100A9m também inibiu a migração e ligação célula-célula das tEnd.1 (**Figuras 10D, 10E** e **10F**), em relação ao grupo controle, células tratadas apenas com meio de cultura a 2% (**Figuras 10A, 10B e 10C**).

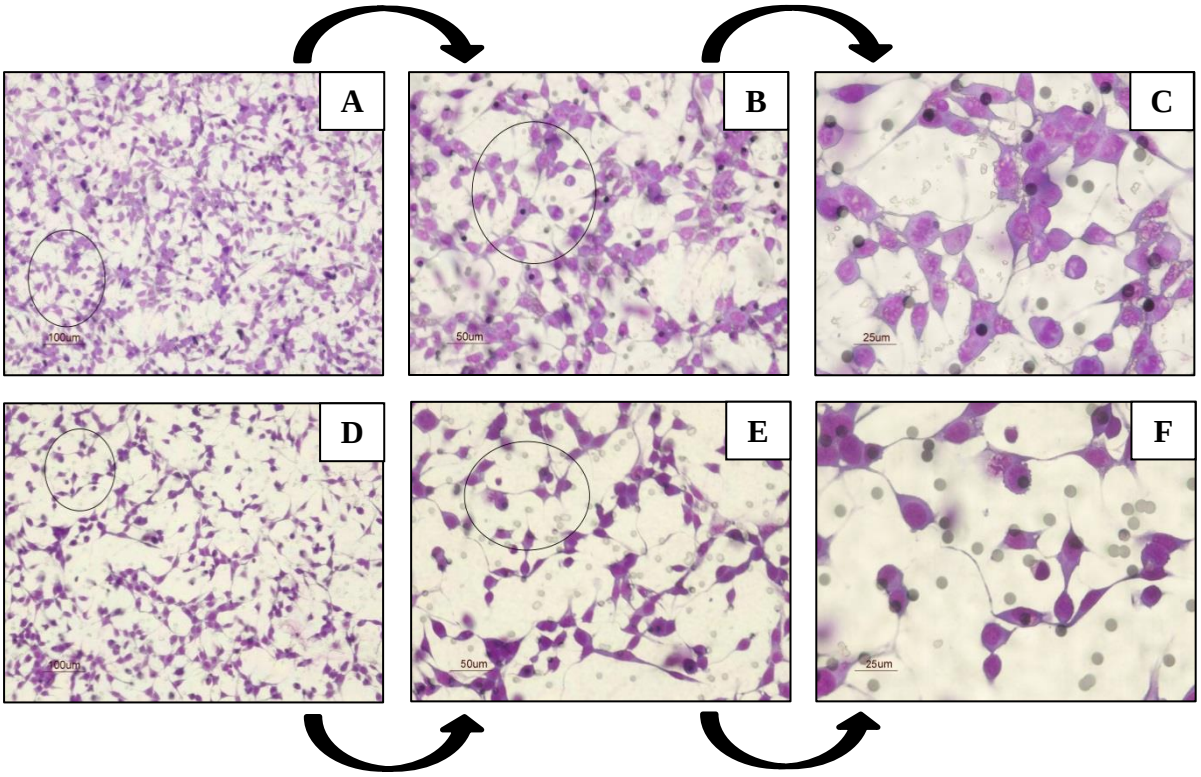
Figura 8 - Efeito do pS100A9m sobre a migração de células endoteliais tEnd.1 pelo sistema do *transwell*



Notas: Em uma placa de 24 poços, foram adicionados 600µl de meio RPMI 10% ou 600µl de meio condicionado de células tumorais LLC WRC256. Em seguida, no compartimento superior do *transwell* foi adicionado $5x10^4$ células tEnd.1 por poço incubadas ou não com o pS100A9m, na concentração de 2,35µM/poço, por 1 hora. O tempo de migração foi de 5 horas em estufa com 5% de CO_2, a 37°C. Após este período, o *transwell* foi retirado do poço, as células migradas foram coradas pelo método de Rosenfeld e, com o auxílio de um bisturi, as membranas foram retiradas, colocadas em uma lâmina, cobertas com uma lamínula de vidro e vedadas com esmalte. Em seguida, foram fotografados seis campos aleatórios por membrana e as células migradas contadas utilizando o software ImageJ®. Esse resultado é representativo de dois ensaios distintos. **$p<0,01$ em relação ao grupo controle com meio RPMI 10%; ***$p<0,001$ em relação ao grupo controle com meio RPMI 10% e #$p<0,001$ em relação ao grupo controle com meio condicionado de células LLC WRC256.

Ensaio de migração de células tEnd.1 em sistema *transwell* com meio RPMI 10%

Figura 9 - Ensaio de migração celular pelo sistema de *transwell* com células tEnd.1 e meio RPMI



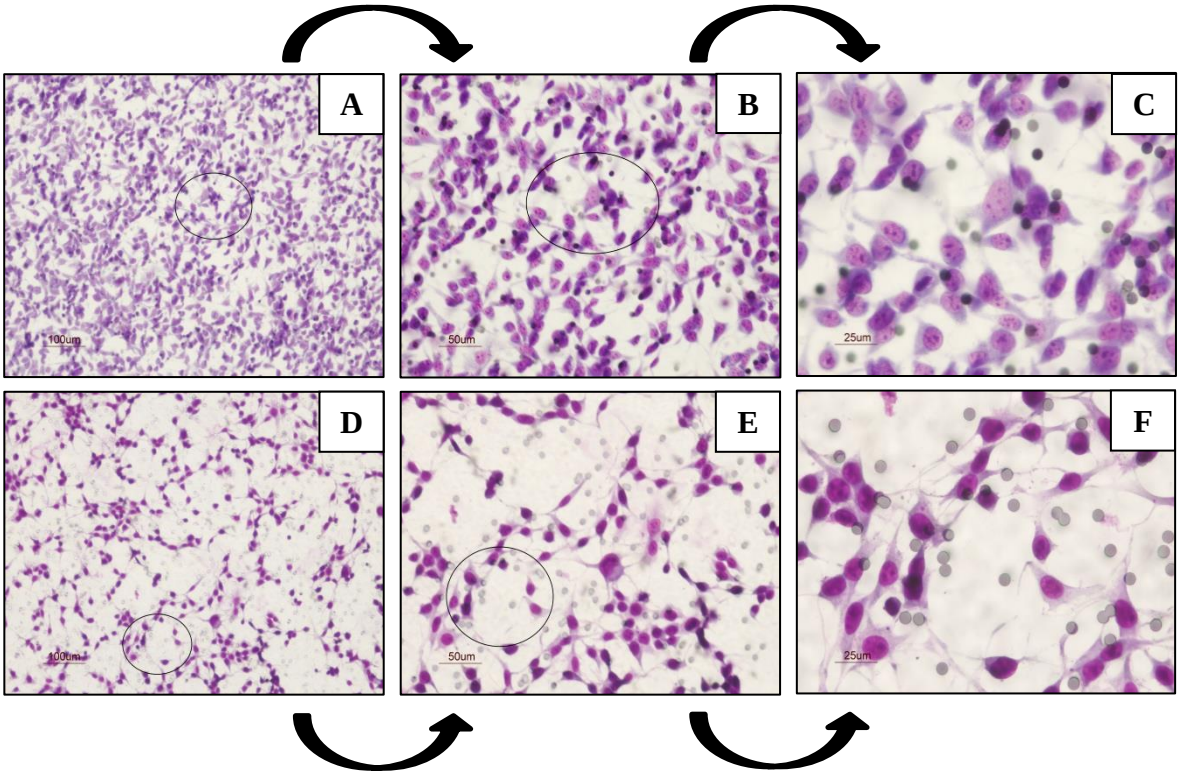
Fonte: MORAES, N. F., 2015.

Notas: Em uma placa de 24 poços, foram adicionados 600µl de meio RPMI 10%. Em seguida, no compartimento superior do *transwell* foi adicionado $5x10^4$ células tEnd.1 por poço incubadas ou não com o pS100A9m, na concentração de 2,35µM/poço, por 1 hora. O tempo de migração foi de 5 horas em estufa com 5% de CO_2, a 37°C. Após este período, o *transwell* foi retirado do poço, as células migradas foram coradas pelo método de Rosenfeld e, com o auxílio de um bisturi, as membranas foram retiradas, colocadas em uma lâmina, cobertas com uma lamínula de vidro e vedadas com esmalte. Foram fotografados seis campos aleatórios por membrana e as células migradas contadas utilizando o software ImageJ®.

Legenda: Figura 9A) fotomicrografia representativa do grupo controle, tEnd.1 incubadas apenas com meio RPMI 2%, no aumento de 10x.; **9B)** fotomicrografia representativa do grupo controle no aumento de 20x.; **9C)** fotomicrografia representativa do grupo controle no aumento de 40x.; **9D)** fotomicrografia representativa das células tEnd.1 tratadas com o pS100A9m na concentração de 2,35µM por 1 hora, no aumento de 10x; **9E)** fotomicrografia representativa das células tEnd.1 tratadas com o pS100A9m no aumento de 20x e **9F)** fotomicrografia representativa das células tEnd.1 tratadas com o pS100A9m no aumento de 40x. O registro fotográfico foi realizado por câmera digital DXM1 200C acoplada ao microscópio Nikon Eclipse 80i, utilizando o software Nikon ACT-10.

Ensaio de migração de células tEnd.1 em sistema *transwell* com meio condicionado de células LLC WRC256

Figura 10 - Ensaio de migração celular pelo sistema de *transwell* com células tEnd.1 e meio condicionado de células LLC WRC256



Fonte: MORAES, N. F., 2015.

Notas: Em uma placa de 24 poços foram adicionados 600µl de meio condicionado de células tumorais LLC WRC256. Em seguida, no compartimento superior do *transwell* foi adicionado $5x10^4$ células tEnd.1 por poço incubadas ou não com o pS100A9m, na concentração de 2,35µM/poço, por 1 hora. O tempo de migração foi de 5 horas em estufa com 5% de CO_2, a 37°C. Após este período, o *transwell* foi retirado do poço, as células migradas foram coradas pelo método de Rosenfeld e, com o auxílio de um bisturi, as membranas foram retiradas, colocadas em uma lâmina, cobertas com uma lamínula de vidro e vedadas com esmalte. Foram fotografados seis campos aleatórios por membrana e as células migradas contadas utilizando o software ImageJ®.

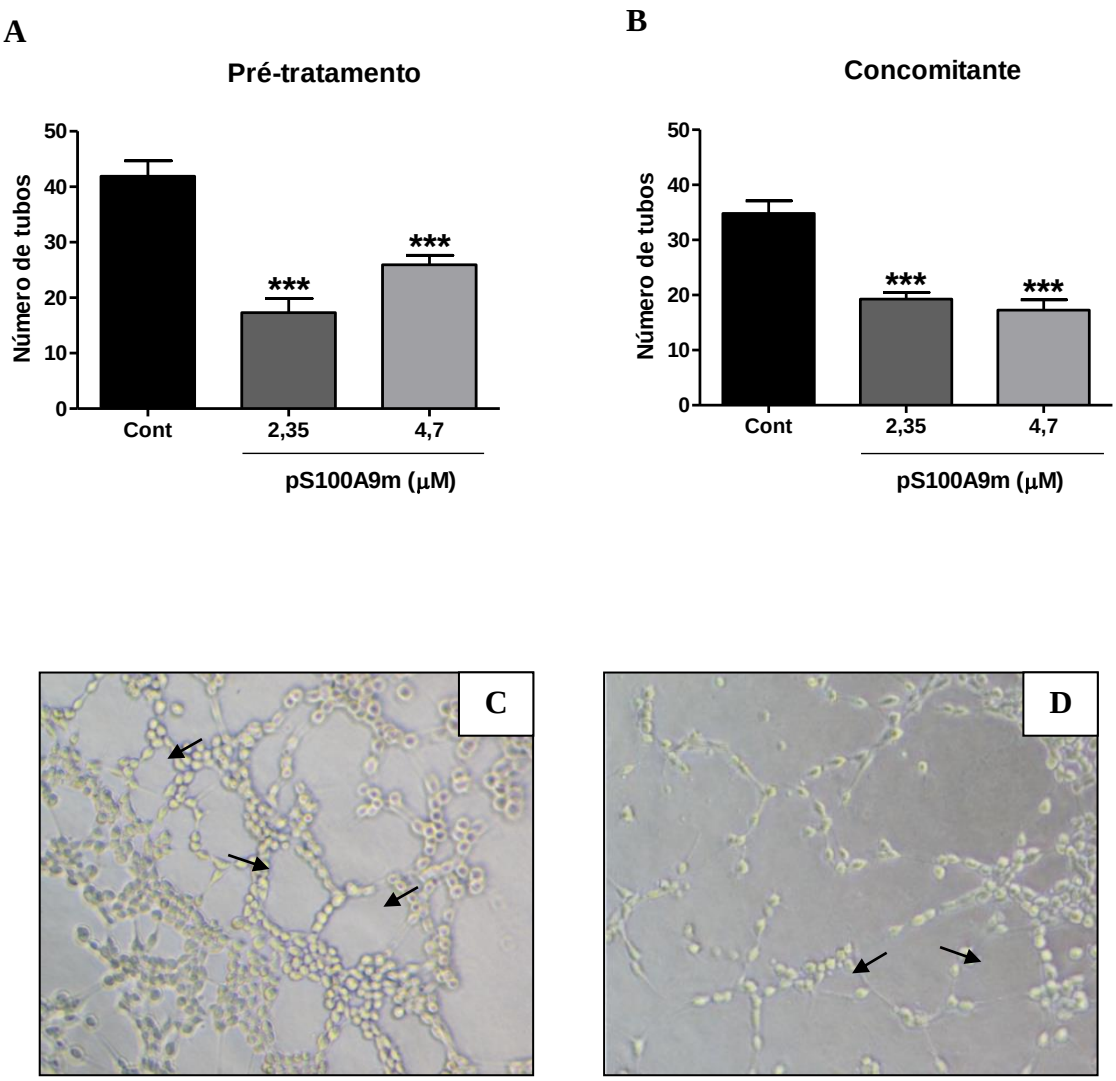
Legenda: Figura 10A) fotomicrografia representativa do grupo controle, tEnd.1 incubadas apenas com meio RPMI 2%, no aumento de 10x.; **10B)** fotomicrografia representativa do grupo controle no aumento de 20x.; **10C)** fotomicrografia representativa do grupo controle no aumento de 40x.; **10D)** fotomicrografia representativa das células tEnd.1 tratadas com o pS100A9m na concentração de 2,35µM por 1 hora, no aumento de 10x; **10E)** fotomicrografia representativa das células tEnd.1 tratadas com o pS100A9m no aumento de 20x e **10F)** fotomicrografia representativa das células tEnd.1 tratadas com o pS100A9m no aumento de 40x. Para a captura das imagens, foi utilizado o software Nikon ACT-10 for DXM1 200C acoplado ao microscópio Nikon Eclipse 80i.

5.5 EFEITO DO pS100A9m SOBRE A DE FORMAÇÃO DE TUBOS COM CÉLULAS ENDOTELIAIS tEnd.1

O pré-tratamento das células endoteliais tímicas com o pS100A9m, nas concentrações de 2,35 ou 4,7µM/poço, inibiu a formação de tubos observada em ensaio 3D em Matrigel, quando comparado com o grupo controle, células tEnd.1, tratadas apenas com meio de cultura (**Figura 11A**). Resultado similar foi obtido quando o peptídeo foi incubado concomitante às células tEnd.1 durante todo o período de formação de tubos em Matrigel (**Figura 11B**). Contudo, a concentração de 4,7µM/poço induziu um efeito mais pronunciado quando deixada por todo o período de tratamento, quando comparado com o grupo em que as células endoteliais tEnd.1 foram pré-tratadas por 1 hora com o pS100A9m na mesma concentração, demonstrando que o peptídeo, quando utilizado em maior concentração por um tempo mais prolongado, tem uma ação inibitória mais eficaz sobre a formação de tubos.

As **figuras 11C** e **11D** são fotomicrografias representativas dos vasos formados em estrutura 3D. A **figura 11C** representa o grupo controle, tratado apenas com meio de cultura, em que é observado um grande número de formações tubulares. A **figura 11D** representa o grupo em que as tEnd.1 foram pré-tratadas com o pS100A9m (2,35µM/poço), demonstrando redução das estruturas tubulares.

Figura 11 - Efeito do pS100A9m sobre a formação de tubos pelas células endoteliais tEnd.1



Fonte: MORAES, N. F., 2014.

Legenda: Figura 11A) Células endoteliais tímicas ($2,5x10^4$) foram pré-tratadas por 1 hora com o pS100A9m nas concentrações de 2,35 ou 4,7µM/poço. Em seguida, as tEnd.1 foram adicionadas ao Matrigel para a formação de tubos por um período de no máximo 6hs. **Figura 11B)** representam os dados obtidos quando o pS100A9m foi incubado concomitante as tEnd.1 durante todo o período de formação de tubos. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. **Figura 11C)** fotomicrografia representativa das formações tubulares do grupo controle. **Figura 11D)** fotomicrografia obtida de vasos formados em estrutura 3D de células endoteliais tímicas pré-tratadas com 2,35µM/poço do pS100A9m. Foram fotografados 4 campos distintos por poço em microscopia de luz e as formações de tubo foram contadas manualmente. O registro fotográfico foi realizado por câmera digital DS-Fi2 acoplada ao microscópio Nikon Eclipse TS100, utilizando o software Nis-Elements D (FAPESP 00/11624-5).

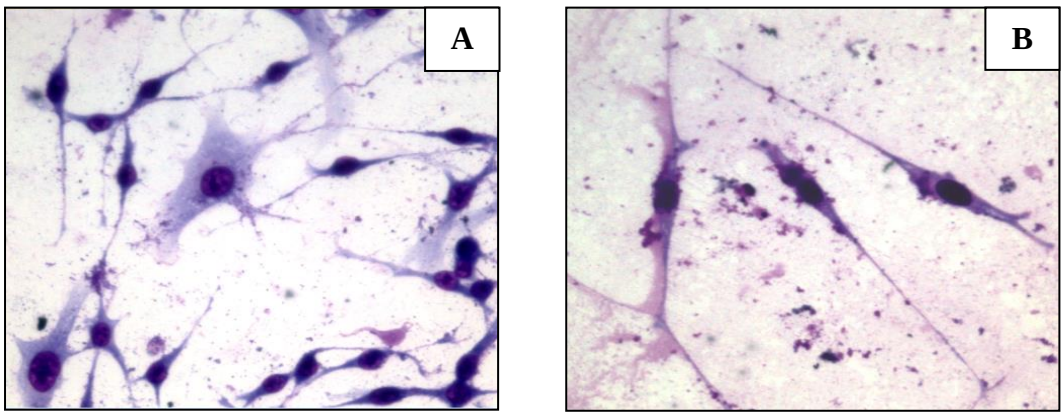
Experimentos utilizando células tumorais LLC WRC256:

5.6 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS LLC WRC256 EM CULTURA

A **figura 12A** demonstra a cultura de células tumorais da linhagem LLC Walker 256 após 24 horas de cultura, em que se observa a morfologia característica deste tipo celular. Segundo Hull (1953), as células LLC WRC256, quando estabelecidas em cultura, possuem uma morfologia semelhante à célula endotelial. Conforme demonstrado na **figura 12A**, as células LLC WRC256 se mantiveram com aderências célula-célula com projeções da lamelipódia (projeção do citoesqueleto na parte dianteira da célula, importante para a migração da célula) e filopódia (projeção do citoesqueleto na parte posterior da célula, responsável pelo controle do desprendimento do corpo celular, durante a migração), típicas de célula tumoral com morfologia tipo epitelial. A **figura 12B** é representativa do tratamento das células tumorais LLC WRC256 com o pS100A9m, em que é observada diminuição do contato célula-célula, acompanhada das projeções do citoesqueleto tipo filopódia.

A viabilidade celular, tanto do controle, quanto das células incubadas com diferentes concentrações do peptídeo (avaliada pelo teste de exclusão por azul de Tripan 1%) sempre foi acima de 98% (*dados não mostrados*).

Figura 12 - Células tumorais da linhagem LLC Walker 256 em cultura



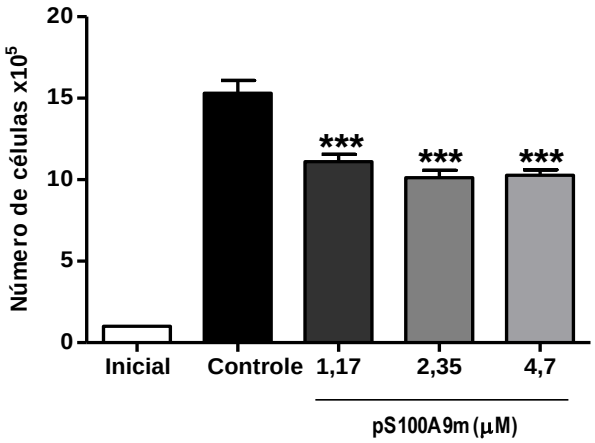
Fonte: MORAES, N. F., 2014.

Legenda: Fotomicrografia de células tumorais LLC WRC256 coradas pelo método de Rosenfeld. **Figura 12A)** grupo controle e **12B)** representativa do pré-tratamento com pS100A9m (1,17µM, por 1 hora). Aumento de 40X. O registro fotográfico foi realizado por câmera digital Leica DFC 420 acoplada ao microscópio Olympus BX 51, utilizando o software Image-Pro Plus 5.1.

5.7 EFEITO DO pS100A9m SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS LLC WRC256

A fim de avaliar o efeito do pS100A9m sobre a proliferação das LLC WCR256, foram utilizadas as três principais concentrações que apresentaram melhor atividade inibitória nos ensaios realizados com a linhagem de células endoteliais tEnd.1. Sendo assim, quando as células LLC WRC256 foram incubadas com as concentrações de 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço do pS100A9m, foi observado que todas as concentrações utilizadas inibiram significativamente a proliferação dessas células em relação ao grupo controle, tratado apenas com meio de cultura (**Figura 13**). As porcentagens de inibição foram de 27,5%, 34% e 33%, respectivamente. A inibição da proliferação não foi decorrente da perda de viabilidade celular.

Figura 13 - Efeito do pS100A9m sobre a proliferação celular de células LLC WRC256



Notas: Foram plaqueadas $5{,}0x10^4$ células LLC WRC256 por poço em placas de 6 poços e incubadas com diferentes concentrações do peptídeo (1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço) ou apenas com meio de cultura por 24 horas, a 37ºC em estufa de CO_2. Após esse período, as células foram tripsinizadas e transferidas para microtubos, coradas com Azul de Tripan e contadas em Câmara de Neubauer. Foram analisadas 3 amostras por concentração. Os resultados são representativos de 2 ensaios distintos. ***$p<0{,}001$ em relação ao grupo controle.

5.8 EFEITO DO pS100A9m SOBRE A ADESÃO DE CÉLULAS TUMORAIS LLC WRC256 EM DIFERENTES LIGANTES DA MATRIZ EXTRACELULAR

A fim de investigar se o pS100A9m tem capacidade de interferir com a adesão da célula tumoral LLC WRC256 a diferentes ligantes naturais da matriz extracelular, essas células foram incubadas com as concentrações de 0,2925; 0,585; 1,17; 2,35; 4,7; 9,4; 18,8µM/poço do peptídeo para o ensaio de adesão ao colágeno tipo I e à laminina. Essas concentrações foram escolhidas para verificar se existe um efeito concentração-dependente, bem como detectar em qual concentração o efeito inibitório não é mais observado. Uma vez que não houve diferença significativa entre as concentrações do peptídeo utilizadas sobre os outros componentes de matriz extracelular, para o estudo de adesão com a fibronectina foram utilizadas apenas as concentrações de 1,17; 2,35 e 4,7µM/poço do pS100A9m.

Conforme demonstrado nas **figuras 14, 15 e 16**, as células tumorais foram responsivas aos diferentes componentes de matriz extracelular, quando comparado ao grupo controle (negativo), composto por poços sensibilizados com BSA 1%.

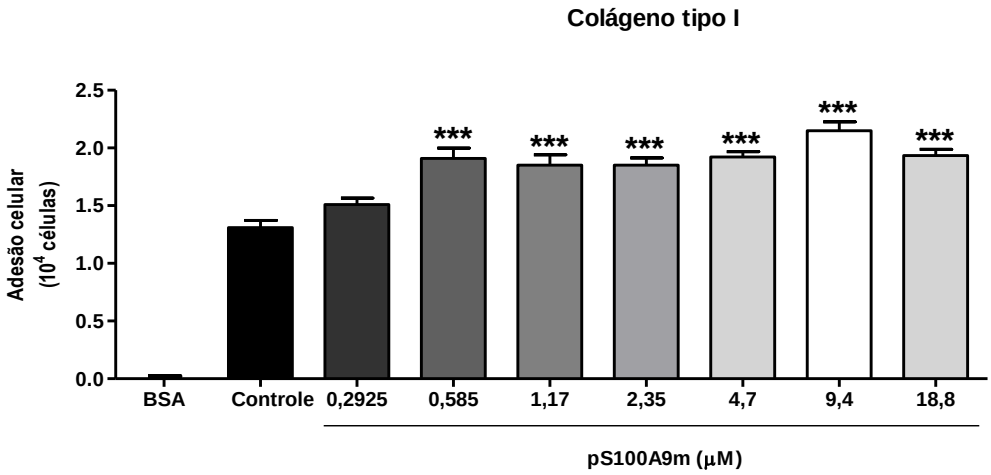
Em relação à adesão das LLC WRC256 ao colágeno tipo I (10µg/mL), foi demonstrado que apenas a concentração de 0,2925µM/poço do pS100A9m não interferiu com a adesão celular. As demais concentrações aumentaram significativamente a adesividade dessas células, sendo as porcentagens de aumento de 46%; 41%; 41%; 46%; 63% e 48% para as concentrações de 0,585; 1,17; 2,35; 4,7; 9,4 e 18,8µM/poço do peptídeo, respectivamente, quando comparada ao grupo controle, tratado apenas com meio de cultura. Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa desse aumento entre as concentrações do pS100A9m utilizadas (**Figura 14**).

Ainda, quando o peptídeo foi avaliado no ensaio de adesão das células tEnd.1 sobre a fibronectina (3µg/mL), também foi observado aumento da adesividade dessas células a este componente de matriz, nas proporções de 102%, 95% e 140% para as concentrações de 1,17, 2,35 e 4,7µM/poço do peptídeo, respectivamente, quando comparado com o grupo controle, tratado apenas com meio de cultura. O maior efeito foi observado com a concentração de 4,7µM/poço do peptídeo, contudo ela não foi significativamente diferente das outras concentrações avaliadas (**Figura 15**).

Contudo, diferente do que foi observado com o colágeno tipo I e a fibronectina, os resultados obtidos com a laminina (10µg/mL) demonstraram que o peptídeo inibiu a adesão das células endoteliais nas concentrações de 0,2925µM/poço (42%), 0,585µM/poço (42%),

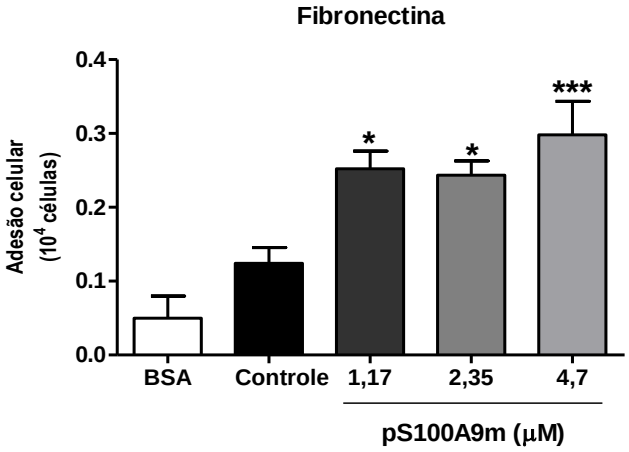
1,17µM/poço (49%), 2,35µM/poço (55%), 4,7µM/poço (78%), 9,4µM/poço (65%) e 18,8µM/poço (58%), em relação ao grupo controle, tratado apenas com meio de cultura. Apesar da concentração de 4,7µM/poço do peptídeo induzir efeito inibitório mais expressivo, não há diferença estatisticamente significativa entre as concentrações utilizadas (**Figura 16**).

Figura 14 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células LLC WRC256 ao Colágeno tipo I



Notas: Células LLC WRC256 ($1{,}0x10^5$ por poço) previamente incubadas, por 1h, com o pS100A9m nas concentrações 0,2925; 0,585; 1,17; 2,35; 4,7; 9,4; 18,8µM/poço ou apenas meio de cultura, foram adicionadas a placas de 96 poços pré-sensibilizadas com colágeno tipo I (componente de matriz extracelular-10µg/poço) ou com BSA 1% por mais 1h. As células aderidas foram incubadas com MTT por 3 horas e, após esse período, com SDS por 18 horas. Em seguida, foi feita a leitura espectrofotométrica a 595nm em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystem). ***$p<0{,}001$ em relação ao grupo controle.

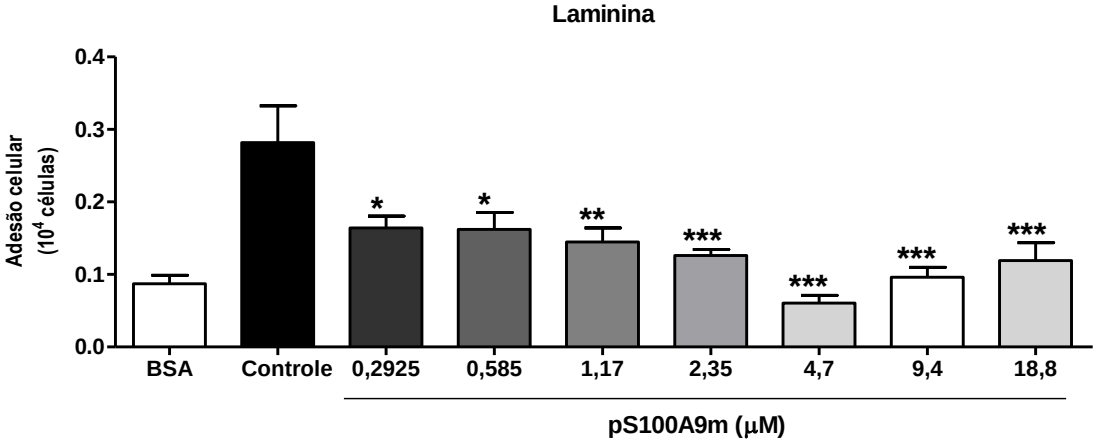
Figura 15 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células LLC WRC256 à Fibronectina



Notas: Células LLC WRC256 ($1{,}0x10^5$ por poço) previamente incubadas, por 1h, com o pS100A9m nas concentrações 1,17; 2,35; 4,7µM/poço ou apenas meio de cultura, foram adicionadas a placas de 96 poços pré-sensibilizadas com fibronectina (componente de matriz extracelular-3µg/poço) ou com BSA 1% por mais 1h. As células aderidas foram incubadas com MTT por 3 horas e, após esse período, com SDS por 18 horas. Em seguida, foi feita a leitura espectrofotométrica a 595nm em leitor de ELISA

(Multiskan EX, Labsystem). *p<0,05 em relação ao grupo controle; ***p<0,001 em relação ao grupo controle.

Figura 16 - Efeito do pS100A9m sobre a adesão de células LLC WRC256 à Laminina



Notas: Células LLC WRC256 ($1,0x10^5$ por poço) previamente incubadas, por 1h, com o pS100A9m nas concentrações 0,2925; 0,585; 1,17; 2,35; 4,7; 9,4; 18,8μM/poço ou apenas meio de cultura, foram adicionadas a placas de 96 poços pré-sensibilizadas com laminina (componente de matriz extracelular-10μg/poço) ou com BSA 1% por mais 1h. As células aderidas foram incubadas com MTT por 3 horas e, após esse período, com SDS por 18 horas. Em seguida, foi feita a leitura espectrofotométrica a 595nm em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystem). *p<0.05 em relação ao grupo controle; **p<0,01 em relação ao grupo controle; e ***p<0,001 em relação ao grupo controle.

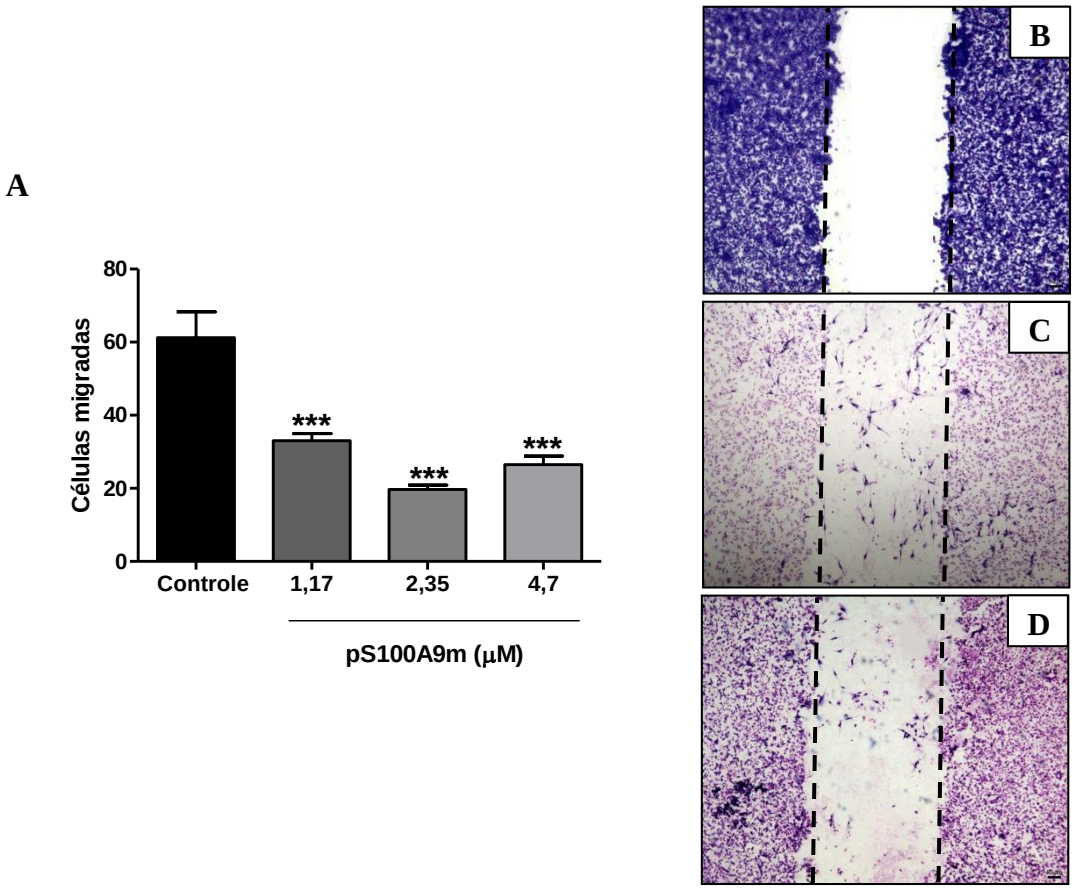
5.9 EFEITO DO pS100A9m NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS LLC WRC256 PELO MÉTODO DO *WOUND HEALING*

Neste ensaio, o *wound healing* foi utilizado para avaliar o movimento das células LLC WRC256, tratadas ou não com diferentes concentrações do pS100A9m, no campo vazio criado por uma interrupção na monocamada celular.

Conforme demonstrado na **figura 17A,** foi observada que o pS100A9m tem ação inibitória sobre a migração das células LLC WRC256, nas três concentrações utilizadas, quando comparado com o controle, tratado apenas com meio de cultura. As porcentagens de inibição foram de 46% (1,17µM); 68% (2,35µM) e 56% (4,7µM).

As **figuras 17B**, **17C** e **17D** são fotomicrografias representativas das culturas celulares utilizadas para avaliar a migração das células LLC WRC256 pelo método do *wound healing*. A **figura 17B** corresponde ao tempo 0, período em que a monocamada foi interrompida. A **figura 17C** corresponde ao grupo controle, células incubadas apenas com meio de cultura, em que foi observada a migração das células tumorais para o campo vazio 24 horas após a interrupção da monocamada. A **figura 17D** representa o grupo tratado com o peptídeo da S100A9m por 1 hora após a interrupção da monocamada.

Figura 17 - Efeito do pS100A9m sobre a migração de células LLC WRC256 pelo método do *Wound healing*



Fonte: MORAES, N. F., 2014.

Notas: Foram plaqueadas $1{,}0x10^6$ células LLC WRC256 por poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro pré-sensibilizadas com colágeno tipo I, por 2 horas, em seguida foram feitas interrupções na monocamada de células com uma ponteira de 200µl e incubadas, por 1 hora, com diferentes concentrações do peptídeo (1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço) ou apenas com meio de cultura. As células foram então incubadas por 24 horas com RPMI 2% de soro fetal bovino, a 37ºC em estufa de CO_2. Após esse período, as células foram coradas e lâminas montadas com Entellan®. Foram contados 5 campos aleatórios em 15 amostras por concentração.

Legenda: Figura 17A) Os resultados são representativos de 2 ensaios distintos. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. O efeito do peptídeo sobre a migração da LLC WRC256 avaliado pelo método do *wound healing* está representado em: **17B)** monocamada interrompida no tempo 0; **17C)** após 24 horas de incubação com meio de cultura (controle) e **17D)** após o pré-tratamento com pS100A9m (2,35µM, por 1 hora). Fotomicrografias obtidas nos tempos 0 hora e 24 horas no aumento de 5x. O registro fotográfico foi realizado por câmera digital Leica DFC 420 acoplada ao microscópio Olympus BX 51, utilizando o software Image-Pro Plus 5.1.

6 DISCUSSÃO:

Conforme mencionado na Introdução, a progressão tumoral depende da sobrevida, crescimento, proliferação e migração da célula tumoral para os tecidos adjacentes (RIDLEY, 2004). Ainda, a expansão tumoral só é possível por conta da angiogênese para que as células tumorais possam obter a quantidade necessária de nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento fundamentais para a sobrevida das células tumorais (BAZAA et al., 2010).

As proteínas S100A8/A9 têm sido apontadas pela literatura como capazes de modular a angiogênese. Nesse sentido, foi demonstrado que essas proteínas, quando sozinhas ou complexadas e em baixas concentrações, promoveram proliferação, migração celular e formação de estruturas tubo-like em Matrigel de HUVEC (LI et al., 2012). Em contrapartida, quando em altas concentrações, esse complexo inibe o crescimento de diversos tipos de células tumorais de camundongo e humana (GHAVAMI et al., 2009).

Em adição, em estudos realizados pelo nosso grupo, foi demonstrado que tanto a proteína S100A9 humana quanto um peptídeo sintético idêntico a porção C-terminal da proteína S100A9 murina (pS100A9m) possuem efeitos antinociceptivo e imunorregulatório (GIORGI et al., 1998; PAGANO et al., 2005; 2009; 2014; DALE et al., 2006; PACOLLA et al., 2008). Entretanto, até o momento não havia sido estudado o efeito do pS100A9m sobre a angiogênese e a tumorigênese.

Assim, no presente estudo foi investigado, *in vitro*, o efeito do pS100A9m sobre os eventos fundamentais envolvidos com a angiogênese e o desenvolvimento tumoral.

Primeiramente, foi avaliado o efeito do pS100A9m sobre a função de células endoteliais. Para tanto, foi utilizada a linhagem das células endoteliais tímicas (tEnd.1), derivadas de endotelioma de timo de camundongo C57BL/6. O primeiro ensaio funcional realizado foi o de proliferação, determinado por contagem total de células após tripsinização, em microscopia de luz, conforme descrito por Hotchkiss et al. (2002). Os resultados demonstraram que o pS100A9m inibiu a proliferação dessas células, em todas as concentrações avaliadas, em magnitude similar. É importante ressaltar que esta atividade inibitória não foi decorrente da perda de viabilidade, avaliada pelo teste de exclusão por azul de tripan, em todos os ensaios realizados (*dados não mostrados*).

Adicionalmente, conforme representado nas fotomicrografias, as células tEnd.1 apresentaram em cultura o comportamento peculiar descrito para esta célula, apresentando-se em monocamada, com aderências célula-célula e projeções da lamelipódia e filopódia típicas

de uma célula endotelial (BUSSOLINO et al., 1991). Entretanto, quando tratadas por 1 hora na presença do pS100A9m e mantidas por 24 horas em cultura, as células tEnd.1 apresentaram significativa diminuição de interações célula-célula, projeções da lamelipódia e filopódia, quando comparadas às células controles, incubadas apenas na presença de meio de cultura.

O efeito inibitório acarretado pelas diferentes concentrações do pS100A9m difere ao efeito observado em outros estudos utilizando a proteína S100A9 (LI et al., 2012), em que é demonstrado que a proteína S100A9, quando adicionada às células HUVEC promove proliferação dessas células em concentrações menores do que 10µg/poço**.** Diferentemente desse estudo, as concentrações aqui empregadas são superiores a 10µg/poço (0,585; 1,17; 2,35; 4,7 e 9,4µM, que correspondem a 12; 24; 49; 99 e 119µg, respectivamente). Ainda, é importante ressaltar que no presente trabalho foi avaliada a atividade de um peptídeo que corresponde a uma pequena porção da sequência da S100A9. Em adição, é importante salientar que a linhagem tEnd.1 apresenta alta capacidade proliferativa, característica de células endoteliais associadas ao processo angiogênico tumoral, diferentemente daquele tipo celular empregado por Li et al. (2012). Desta forma, estas discrepâncias poderiam esclarecer, pelo menos em parte, a diferença entre os resultados aqui apresentados e aqueles encontrados na literatura.

A interação de células endoteliais com seu microambiente, particularmente com os componentes da MEC, é fundamental para o processo de angiogênese (INGBER, 1992). Eventos tais como a proliferação celular é dependente, em parte, do grau de adesão entre célula e proteínas da MEC (KALLURI, 2003). Neste sentido, as integrinas desempenham importante participação na interação entre o ligante e proteínas de matriz, uma vez que são moléculas-chave no processo de adesão da célula, tanto às proteínas de superfície da MEC, quanto aos receptores de sinalização, influenciando a proliferação celular, migração e sobrevida da célula (TUCKER, 2002). Dentre essas moléculas, o colágeno, fibronectina e laminina estão envolvidos com a sobrevivência de células endoteliais, mediando os eventos de adesão, proliferação, migração e, consequentemente, formação de tubos (SOTTILE, 2004).

Em continuidade ao estudo da ação do pS100A9m sobre eventos envolvidos com a angiogênese, foi avaliado o efeito do pS100A9m sobre a adesão das células endoteliais a diferentes componentes da MEC, sendo eles: colágeno tipo I, fibronectina e laminina. Os dados obtidos evidenciaram que as células endoteliais tEnd.1 apresentaram excelente adesividade aos componentes de MEC utilizados. O peptídeo foi capaz de inibir significativamente a adesão das células endoteliais ao colágeno tipo I nas concentrações de

2,35 e 4,7µM/poço, quando comparado aos seus respectivos controles. Quanto à fibronectina, o pS100A9m inibiu a adesão das tEnd.1 em todas as concentrações utilizadas, na mesma intensidade. Baseados nestes resultados, foi avaliada a ação do pS100A9m, na concentração de 2,35µM/poço sobre a adesão das células tEnd.1 à laminina. Novamente, foi observado significativo efeito inibitório do peptídeo. É importante salientar que, durante a angiogênese, componentes da membrana basal, tais como colágeno tipo IV, em conjunto com a laminina, a principal proteína adesiva da membrana basal, estabilizam os novos vasos formados. Já, os componentes intersticiais, especialmente o colágeno fibrilar (tipo I), promovem rápido e invasivo crescimento da célula endotelial (NISHIUCHI et al., 2006; FRANCIS; URIEL; BREY, 2008). A fibronectina, também uma das principais proteínas da MEC (FRANCIS; URIEL; BREY, 2008), desempenha importante função na sinalização da cascata da angiogênese, regulando a sobrevida, diferenciação e proliferação das células, eventos esses que se encontram intensificados dentro e em torno de tumores sólidos (FRANCIS; URIEL; BREY, 2008). Portanto, os dados aqui apresentados evidenciam que o pS100A9m inibe, também, este evento crucial para a angiogênese.

Outro evento envolvido na angiogênese é a migração celular. Para que haja o crescimento da massa tumoral e metástase, células endoteliais e neoplásicas necessitam migrar e invadir tecidos adjacentes (HOOD; CHERESH, 2002). A mobilidade celular depende de a célula identificar, fixar-se e ocorrer uma mudança conformacional em seu citoesqueleto em resposta a componentes específicos da MEC (LEAVESLEY et al., 1993).

Assim, em continuidade à avaliação do efeito do pS100A9m sobre os eventos envolvidos na angiogênese, *in vitro*, foram realizados dois ensaios distintos e complementares de migração celular: o método do *wound healing*, utilizado para avaliar o movimento celular no campo vazio e o sistema do *transwell*, que possibilita avaliar a migração direcional das células endoteliais, por diferença de gradiente de concentração de diferentes quimioatratantes (CORNING, 2010). Os resultados evidenciaram a ação inibitória do pS100A9m, em todas as concentrações utilizadas, sobre a migração pelo método do *wound healing*. Ainda, a concentração que apresentou, percentualmente, a atividade inibitória mais pronunciada foi a de 2,35µM/poço.

No ensaio de migração, utilizando o sistema de *transwell*, foi avaliada a ação do pS100A9m sobre a migração das células tEnd.1, em resposta ao estímulo tumoral, utilizando para isso, o meio condicionado de células de carcinoma mamário da linhagem LLC WRC256. Como controle desse ensaio, utilizou-se o meio de cultura RPMI a uma concentração de 10% de SFB, correspondente ao meio de cultura de cultivo das células tumorais LLC WRC256. Os

resultados demonstraram que o meio condicionado foi capaz de induzir migração significativamente maior quando comparado apenas ao meio de cultura com 10% de SFB. Quando as células tEnd.1 foram tratadas previamente com o pS100A9, foi observado, mais uma vez, o efeito inibitório deste peptídeo sobre a migração, sendo este efeito mais acentuado frente ao meio condicionado proveniente das células LLC WRC256. Estudos sobre a caracterização dos mediadores secretados pelas células tumorais LLC WRC256 são escassos. Entretanto, a literatura demonstra que células de diferentes tumores mamários secretam quimiocinas com potencial angiogênico (SINGH; SADANANDAM; SINGH, 2007; SINGH et al., 2013). Portanto, é plausível supor que no meio condicionado obtido de cultura de células LLC WRC256 são liberadas citocinas e quimiocinas que participam tanto de processos inflamatórios, quanto tumorais, como por exemplo, CXCL8, CXCL12, IL-6, TGF-β, COX-2, ROS e TNF-α (SCHETTER; HEEGAARD; HARRIS, 2010, para revisão). Considerando ainda o potencial inflamatório destes mediadores, podemos postular que a atividade anti-inflamatória descrita para o pS100A9m (PAGANO et al., 2005, 2009, 2014) pode contribuir, pelo menos em parte, com esta ação inibitória observada frente ao estimulo tumoral.

Finalmente, para investigar a importância do efeito inibitório do peptídeo sobre os eventos de adesão, proliferação e migração foi avaliada a ação do pS100A9m sobre a formação de estruturas tipo capilar em matriz tridimensional, ou seja, sistema biomimético ao *in vivo*. Para este ensaio foi utilizado o Matrigel, uma membrana basal reconstituída, que pode propiciar condições similares ao observado em microambiente tumoral, uma vez que é proveniente do sarcoma de murinos. Em adição, esta matriz permite rápida formação das estruturas tubulares em sistema 3D, as quais são facilmente quantificáveis (ARNAOUTOVA et al., 2009; BAZZA et al., 2010). Os resultados mostraram que tanto o pré-tratamento (por 1 hora), quanto o tratamento concomitante das células endoteliais com o pS100A9m, acarretaram significativa diminuição das estruturas tubulares formadas. Ainda, a concentração de 4,7µM/poço induziu efeito inibitório mais pronunciado quando o peptídeo permaneceu por todo período do ensaio, quando comparado às células endoteliais previamente tratadas com o pS100A9m, na mesma concentração, demonstrando que o peptídeo, quando utilizado em maior concentração e por tempo mais prolongado, apresenta ação inibitória mais eficaz sobre a formação de tubos. Os dados obtidos no ensaio de formação de tubos confirmam que o pS100A9m é capaz de interferir com a neovascularização.

Em conjunto, os resultados apresentados com as células endoteliais tímicas tEnd.1 mostraram que o peptídeo da porção C-terminal da proteína S100A9 murina, nas

concentrações aqui utilizadas, inibem, *in vitro*, os eventos envolvidos com a angiogênese e, consequentemente, um possível fator modulatório do crescimento tumoral.

Em continuidade aos objetivos propostos, foi avaliada a atividade do pS100A9m sobre a função de células tumorais. Para tanto, foram utilizadas células tumorais de carcinoma Walker 256 de mama de rata (LLC WRC256) (EARLE, 1935). Com esta linhagem foram realizados os ensaios de proliferação, adesão e migração, estabelecidos no estudo sobre a angiogênese. Ainda, o peptídeo foi incubado nas concentrações que apresentaram maior ação inibitória sobre as funções das células endoteliais.

O crescimento tumoral depende da sobrevida e proliferação das células para que ocorra a migração e, consequente, expansão do tumor para os tecidos adjacentes (RIDLEY et al., 2003). Essas etapas levam ao rearranjo do citoesqueleto, com alterações na morfologia celular, regulando a migração e a invasão da célula tumoral.

Assim, inicialmente foram realizados os ensaios de proliferação. Os resultados demonstraram que o pS100A9m, em todas as concentrações testadas, inibiu a capacidade proliferativa das células tumorais LLC WRC256. Ainda, as fotomicrografias apresentadas mostraram que o peptídeo inibiu as projeções de lamelipódia e filopódia do citoesqueleto e, consequentemente o contato célula-célula. Novamente, este efeito inibitório não foi decorrente da perda da viabilidade celular (*dados não mostrados*).

Como ressaltado anteriormente, as células tumorais se ligam a MEC por meio de receptores como as integrinas, que são capazes de regular a motilidade da lamelipódia e filopódia. Portanto, para avaliar a atividade do pS100A9m sobre a adesão das células tumorais da linhagem LLC WRC256, foram utilizados os diferentes componentes da matriz extracelular: colágeno tipo I, fibronectina e laminina.

Os dados obtidos demonstraram que o pS100A9m aumentou a aderência das células tumorais ao colágeno tipo I e fibronectina, em todas as concentrações avaliadas. Entretanto, as mesmas concentrações do peptídeo induziram significativa ação inibitória da adesão das células tumorais à laminina. Outros estudos demonstraram que algumas substâncias podem inibir a proliferação e migração de células tumorais, e, simultaneamente induzir aumento da adesão dessas células a componentes da MEC, tais como fibronectina, vitronectina e colágenos tipo I e IV (REN; ZHANG, 2011). Estas ações distintas dependem do tipo de integrina e de componentes da MEC envolvidos nessas interações (ENGBRING; KLEINMAN, 2003). Portanto, é importante considerar que o aumento da adesão das células LLC WRC256 à fibronectina e ao colágeno pode ser decorrente da ativação da sinalização de integrinas ligantes desses componentes de matriz. Estudos sobre a expressão da integrina $\alpha_2\beta_3$

(VARNER; CHERESH, 1996), principal ligante das células tumorais mamárias a estes componentes, bem como a expressão de $\alpha_3\beta_1$, principal integrina ligante de laminina (CHEN et al., 2014), poderiam contribuir para a compreensão da seletividade da ação inibitória do pS100A9m sobre a célula tumoral.

É interessante ressaltar que, a laminina, principal proteína adesiva da membrana basal que constitui a primeira e maior barreira encontrada pelas células tumorais durante a invasão, é essencial na estabilização dos novos vasos formados (NISHIUCHI et al., 2006). Portanto, esta proteína tem sido associada a um fenótipo maligno mais agressivo das células tumorais, levando ao aumento da proliferação de células tumorais tipo epitelial, sendo que esse efeito depende especificamente da ligação entre o receptor integrina e a cadeia da laminina, a qual esse receptor se liga (ENGBRING; KLEINMAN, 2003). Baseados nesses fatos, podemos sugerir que o pS100A9m interfere com a ligação de células tumorais ao ligante mais crucial para a invasão e migração dessas células.

De fato, o ensaio de migração, avaliado pelo método do *wound healing*, demonstrou que o pS100A9m, em todas as concentrações utilizadas, inibiu significativamente a capacidade migratória das células tumorais, sendo que a concentração de 2,35µM/poço apresentou, novamente, efeito mais pronunciado.

Em estudo *in vitro*, realizado com células de carcinoma cervical, foi demonstrado que o complexo S100A8/A9 inibe a migração dessas células em ensaio de *wound healing* (QIN et al., 2010), corroborando os resultados aqui apresentados. Em adição, Qin e colaboradores (2010) demonstraram que após o tratamento das células tumorais com a calprotectina, foi detectada uma diminuição na metaloproteinase-2 (MMP-2), importante para a degradação da MEC, migração e invasividade das células tumorais. Sendo assim, é plausível especular que o pS100A9m pode exercer algum efeito sobre a expressão de MMPs. Ainda, podemos sugerir a porção C-terminal da proteína S100A9 murina pode ser crucial na interação da célula tumoral com a MEC, durante a migração celular. As ações do pS100A9m sobre mecanismos moleculares, bem como sobre mediadores envolvidos com as funções celulares aqui avaliadas serão investigadas brevemente.

Em conjunto, os dados obtidos *in vitro* demostraram, pela primeira vez, que o pS100A9m inibe, diretamente, a adesão, proliferação e migração tanto de célula endotelial, quanto de célula tumoral, evidenciando o potencial antiangiogênico e antitumoral deste peptídeo.

Esses achados nos levam às seguintes questões: 1) essas ações inibitórias poderiam ser observadas *in vivo* e de maneira sinérgica? 2) e poderiam ser acompanhadas pela atividade imunomodulatória descrita para pS100A9m (PAGANO et al., 2005, 2009, 2014)?

Sem dúvida, os dados obtidos durante o desenvolvimento do presente projeto abrem novas perspectivas investigativas, o que pode favorecer tanto a caracterização dos mecanismos envolvidos nas atividades do peptídeo, como pode evidenciar sua importância como uma nova ferramenta para o estudo da angiogênese e progressão tumoral, além de apresentar potencial para uma possível aplicação terapêutica nestes processos.

7 RESUMO DOS RESULTADOS:

A avaliação do efeito do peptídeo do C-terminal da S100A9 murina sobre os parâmetros envolvidos com a angiogênese e com a progressão tumoral demonstra que o pS100A9m:

1) inibe a proliferação de células endoteliais tímicas (tEnd.1);
2) inibe a adesão das células tEnd.1 à diferentes componentes da matriz extracelular (colágeno tipo I, fibronectina e laminina);
3) inibe a migração das células tEnd.1 pelo método do *wound healing*;
4) inibe a migração das células tEnd.1por meio do sistema de *transwell*;
5) inibe a formação de tubos em Matrigel em ensaio 3D utilizando células tEnd.1;
6) inibe a proliferação de células tumorais da linhagem LLC Walker 256 (LLC WRC256);
7) aumenta a adesão das células LLC WRC256 aos componentes da matriz extracelular colágeno tipo I e à fibronectina;
8) inibe a adesão das células LLC WRC256 ao componentes da matriz extracelular laminina; e
9) inibe a migração das células LLC WRC256 pelo método do *wound healing*.

8 CONCLUSÕES:

Os dados aqui demonstrados permitem concluir que o pS100A9m inibe, *in vitro*, eventos envolvidos na angiogênese e progressão tumoral, evidenciando o potencial antiangiogênico e antitumoral deste peptídeo.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, S.; KOEHL, G. E.; HIRSCHBERG, M.; GEISSLER, E. K.; FRIEDL, P. Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model. **Histochem Cell Biol**, v. 130, n. 6, p. 1147-1154., 2008.

ARNAOUTOVA, I.; GEORGE, J.; KLEINMAN, H. K.; BENTON, G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. **Angio**, v. 12:, p. 267–274, 2009.

ARNAOUTOVA, I.; KLEINMAN, H. K. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. **Nat Prot**, v. 5, n. 4, p. 628-635, 2010.

BAZAA, A.; PASQUIER, E.; DEFILLES, C.; LIMAM, I.; KESSENTINI-ZOUARI, R.; KALLECH-ZIRI, O.; EL BATTARI, A.; BRAGUER, D.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N.; LUIS, J. MVL-PLA2, a snake venom phospholipase A2, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10124, 2010.

BLANCHOIN, L.; BOUJEMAA-PATERSKI, R.; SYKES, C.; PLASTINO, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. **Physio Reviews**, v. 94, n. 1, p. 235-263, 2014.

BORASCHI, D.; RAMBALDI, A.; SICA, A.; GHIARA, P.; COLOTTA, F.; WANG, J. M.; DE ROSSI, M.; ZOIA, C.; REMUZZI, G.; BUSSOLINO, F. Endothelial cells express the interleukin-1 receptor type 1. **Blood**, p. 78, n. 5, p. 1262-1267, 1991.

BUSSOLINO, F.; DE ROSSI, M.; SICA, A.; COLOTTA, F.; WANG, J. M.; BOCCHIETTO, E.; PADURA, I. M.; BOSIA, A.; DEJANA, E.; MANTOVANI, A. Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. **J Immunol.**, v. 147, n. 7, p. 2122-2129, 1991.

CALFA, C. I.; ROSENBLATT, J. D.; CHO, H. M.; WEBSTER, K.; SHIN, S.U. Antibodies and antibody-fusion proteins as anti-angiogenic, anti-tumor agents. **Update on Can Therap**, p. 1:159-173, 2006.

CAMPBELL, N.; KELLENBERGER, L.; GREENAWAY, J.; MOOREHEAD, R. A.; LINNERTH-PETRIK, N. M.; PETRIK, J. Extracellular Matrix Proteins and Tumor Angiogenesis. **J Onco**, p. 1-13, 2010.

CAO, Y. Tumor angiogenesis in therapy. **Biomed & Pharmaco**, p. 59, p. S340-S343, 2005.

CARMELIET, P.; JAIN, R. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nat**, v. 407, p. 249-257, 2000.

CARR, J.; CARR, I.; DREHER, B.; BETTS, K. Lymphatic metastasis: invasion of lymphatic vessels and efflux of tumour cells in the afferent popliteal lymph as seen in the Walker rat carcinoma. **J Pathol**, v. 132, p. 287-305, 1980.

CHEN, C.; CHANG, C. C.; LAI, H. S.; JENG, Y.M.; CHEN, C. I.; CHANG, K. J.;LEE, P. H.; LEE, H. Connective tissue growth factor inhibits gastric cancer peritoneal metastasis by blocking integrin a3b1-dependent adhesion. **Gas Can**, v. 18, n. 3, p. 504-515, 2015.

CORNING, INCORPORATED. Transwell Permeable Supports Selection an Use Guide, USA. **Corning Incorporated**, 2010. Disponivel em: <http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/transwell_guide.pdf>. Acesso em: 05 Junho 2015.

CUENOD, C.; FOURNIER, L.; BALVAY, D.; GUINEBRETIÈRE, J. M. Tumor angiogenesis: pathophysiology and implications for contrast-enhanced MR1 and CT assessment. **Abdom Imaging**, v. 31, p. 188-193, 2006.

DALE, C.; PAGANO, R. L.; PACCOLA, C. C.; PINOTTI-GUIRAO, T.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; GIORGI, R. Effect of the C-terminus of murine S100A9 protein on experimental nociception. **Pep**, v. 27, n. 11, p. 2794-2802, 2006.

DALE, C. S.; ALTIER, C.; CENAC, N.; GIORGI, R.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; ZAMPONI, G. W.; VERGNOLLE, N. Analgesic properties of S100A9 C-terminal domain: a mechanism dependent on calcium channel inhibition. **Fund & Clin Pharma**, v. 4, p. 427–438, 2009.

DASS, C.; TRAN, T.; CHOONG, P. Angiogenesis inhibitors and the need for anti-angiogenic therapeutics. **J Dent Res**, v. 86, n. 10, p. 927-936, 2007.

DECICCO-SKINNER, K. L.; HENRY, G. H.; CATAISSON, C.; TABIB, T.; GWILLIAM, J. C.; WATSON, N. J.; BULLWINKLE, E. M.; FALKENBURG, L.; O'NEILL, R. C.; MORIN, A.; WIEST, J. S. Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. **J Vis Exp.**, v. 91, n. e51312, p. 1-8, 2013.

DENKER, S. P.; BARBER, D. L. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. **J Cell Biol**, v. 159, n. 6, p. 1087–1096, 2002.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 33, p. 637-668, 2001.

EARLE, W. A study of the walker rat mammary carcinoma. **American J Can**, v. 24, p. 556-612, 1935.

EDGEWORTH, J.; GORMAN, M.; BENNETT, R.; FREEMONT, P.; HOGG, N. Identification of p 8, 14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. **J Biol Chem**, v. 266, p. 7706-7713, 1991.

EDGEWORTH, J.; FREEMONT, P.; HOGG, N. Ionomycin-regulated phosphorylation of the myeloid calcium-binding protein p14. **Nat**, v. 342, p. 189-192, 1989.

EELEN, G.; de ZEEU, W. P.; SIMONS, M.; CARMELIET, P. Endothelial Cell Metabolism in Normal and Diseased Vasculature. **Circ Res**, p. 1231-1244, 2015.

EHRCHEN, J.; SUNDERKÖTTER, C.; FOELL, D.; VOGL, T.; ROTH, J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist. **J Leukoc Biol**, p. 557-566, 2009.

EHRMANN, R. L.; GEY, G. O. The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail Collagen. **J Nat Can Inst**, v. 16, n. 6, p. 1375-1403, 1956.

ELSDALE, T.; BARD, J. Collagen substrata for studies on cell behavior. **J Cell Biol.**, v. 54, n. 3, p. 626–637, 1972.

ENGBRING, J.; KLEINMAN, H. The basement membrane matrix in malignancy. **J Pathol**, v. 200, n. 4, p. 465-470, 2003.

FOELL, D.; FROSCH, M.; SORG, C.; ROTH, J. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. **Clin Chim Acta**, v. 344, n. 1-2, p. 37-51, 2004.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat Med**, v. 1, p. 27-31, 1995.

FOLKMAN, J. Angiogenesis an organizing principle for drug discovery? **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, p. 273-286, 2007.

FORM, D.; PRATT, B.; MADRI, J. Endothelial cell proliferation during angiogenesis. **Lab Invest**, v. 55, p. 521-530, 1986.

FRAGA, A.; RIBEIRO, R.; PRÍNCIPE, P.; LOPES, C.; MEDEIROS, R. Hypoxia and Prostate Cancer Aggressiveness: A Tale With Many Endings. **Clin Genitourin Can**, p. 1-7, 2015.

FRANCIS, M.; URIEL, S.; BREY, E. Endothelial cell-matrix interactions in Neovascularization. **Tis Engin**, v. 114, p. 19-32, 2008.

FREEMONT, P.; HOGG, N.; EDGEWORTH, J. Sequence identity. **Nat**, v. 339, n. 6225, p. 516, 1989.

GARRIDO, T.; RIESE, H. H.; ARACIL, M.; PÉREZ-ARANDA, A. Endothelial cell differentiation into capillary-like structures in response to tumour cell conditioned medium: a modified chemotaxis chamber assay. **Brit J Can**, v. 71, p. 770-775, 1995.

GHAVAMI, S.; KERKHOFF, C.; CHAZIN, W. J.; KADKHODA, K.; XIAO, W.; ZUSE, A.; HASHEMI, M.; ESHRAGHI, M.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; KLONISCH, T.; LOS, M. S100A8/9 induces cell death via a novel, RAGE-independent pathway that involves selective release of Smac/DIABLO and Omi/HtrA2. **Bioch et Biophy Acta**, v. 1783, p. 297–311, 2008a.

GHAVAMI, S.; RASHEDI, I.; DATTILO, B. M.; ESHRAGHI, M.; CHAZIN, W. J.; HASHEMI, M.; WESSELBORG, S.; KERKHOFF, C.; LOS, M. S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 6, p. 1484-1492, 2008b.

GHAVAMI, S.; CHITAYAT, S.; HASHEMI, M.; ESHRAGHI, M.; CHAZIN, W. J.; HALAYKO, A. J.; KERKHOFF, C. S100A8/A9: A Janus-faced molecule in cancer therapy and tumorgenesis. **Europ J Pharma**, v. 625, p. 73–83, 2009.

GIORGI, R.; PAGANO, R. L.; DIAS, M. A.; AGUIAR-PASSETI, T.; SORG, C.; MARIANO, M. Antinociceptive effect of the calcium-binding protein MRP-14 and the role played by neutrophils on the control of inflammatory pain. **J Leukoc Biol**, v. 64, p. 214-220, 1998.

GUMIREDDY, K.; LI, A.; KOSSENKOV, A. V.; CAI, K. Q.; LIU, Q.; YAN, J.; XU, H.; SHOWE, L.; ZHANG, L.; HUANG, Q. ID1 Promotes Breast Cancer Metastasis by S100A9. **Mol Cancer Res**, v. 12, n. 9, p. 1334-1343, 2014.

HANNUN, Y. A. Signal transduction in cancer. In: Cancer Medicine. 3ª. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 48-65.

HEINZMAN, C.; FRITZ, G.; SCHÄFER, B. S100 proteins: structure, functions and pathology. **Med**, v. 7, p. d1356-68, 2002.

HERBRAND, U.; AHMADIAN, M. p190-RhoGAP as an integral component of the Tiam1/Rac1-induced downregulation of Rho. **Biol Chem.** , v. 387, n. 3, p. 311-317, 2006.

HOOD, J.; CHERESH, D. Role of integrins in cell invasion and migration. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 2, p. 91-100, 2002.

HORWITZ, R.; WEBB, D. Cell migration. **Curr Biol.**, v. 13, n. 19, p. 756-759, 2003.

HOTCHKISS, K. A.; ASHTON, A. W.; MAHMOOD, R.; RUSSELL, R. G.; SPARANO, J. A.; SCHWARTZ, E. L. Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. **Mol Cancer Ther**, v. 1, n. 13, p. 1191-200, 2002.

HULL, R. N. Establishing Long-Term Cultures of Mammalian Normal, Solid Tumor, and Ascites Tumor Cells on Glass. **Science**, v. 117, p. 223-5, 1953.

HYNES, R. The dynamic dialogue between cells and matrices: implications of fibronectin's elasticity. **Proc Natl Acad Sci USA.** , v. 96, n. 6, p. 2588-2590, 1999.

HYNES, R. Structural biology. Changing partners. **Scien.**, v. 300, n. 5620, p. 755-756, 2003.

INGBER, D. Extracellular matrix as a solid-state regulator in angiogenesis: identification of new targets for anti-cancer therapy. **Semin Cancer Biol**, v. 3, n. 2, p. 57-63, 1992.

JAFFE, E. Cell biology of endothelial cells. **Hum pathol**, v. 18, p. 234-239, 1987.

KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 6, p. 422-433, 2003.

KASHIDA, H.; KUDO, S.-E. Early colorectal cancer: concept, diagnosis, and management. **Int J Clin Oncol**, v. 11:, p. 1–8, 2006.

KATO, E. E.; PIMENTA, L. A.; PEREIRA, J. F.; ALMEIDA, M. E. S.; SANTOS, M. F.; SAMPAIO, S. C. **Crotoxin, a toxin from rattlesnake venom, inhibits endothelial cells function stimulated by tumor cell conditioned medium: in vitro assay**. XII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular/VIII International Symposium on Extracellular Matrix. Armação dos Búzios - Rio de Janeiro: [s.n.]. 2013. p. 44.

KERKHOFF, C.; KLEMPT, M.; SORG, C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). **Biochim Biophys Acta**, v. 1448, p. 200-211, 1998.

KLIGMAN, D.; HILT, D. The S100 protein family. **Trends Biochem Sci**, v. 13, p. 437-443, 1988.

KONDO, S.; SHUKUNAMI, C.; MORIOKA, Y.; MATSUMOTO, N.; TAKAHASHI, R.; OH, J.; ATSUMI, T.; UMEZAWA, A.; KUDO, A.; KITAYAMA, H.; HIRAKI, Y.; NODA, M. Dual effects of the membrane-anchored MMP regulator RECK on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. **J Cell Sci**, v. 120, n. 5, p. 849-857, 2007.

KOVAřÍKOVÁ, P.; MICHALOVA, E.; KNOPFOVÁ, L.; BOUCHAL, P. Methods for studying tumor cell migration and invasiveness. **Klin Onkol**, v. 27, p. 22-7, 2014.

KROENING, S.; GOPPELT-STRUEBE, M. Analysis of Matrix-Dependent Cell Migration with a Barrier Migratio Assay. **Sci Sign**, v. 3, n. 126, p. 1-10, 2010.

LAGASSE, E.; CLERC, R. Cloning and expression of two human genes enconding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation. **Mol Cell Biol**, v. 8, p. 2402-2410, 1988.

LÄMMERMANN, T.; BADER, B. L.; MONKLEY, S. J.; WORBS, T.; WEDLICH-SÖLDNER, R.; HIRSCH, K.; KELLER, M.; FÖRSTER, R.; CRITCHLEY, D. R.; FÄSSLER, R.; SIXT, M. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. **Nat**, v. 453, n. 7191, p. 51-55, 2008.

LEAVESLEY, D. I.; FERGUSON, G. D.; WAYNER, E. A.; CHERESH, D. A. Requirement of the Integrin/ 3 Subunit for Carcinoma Cell Spreading or Migration on Vitronectin and Fibrinogen. **J Cell Biol**, v. 117, n. 5, p. 1101-1107, 1992.

LEAVESLEY, D. I.; SCHWARTZ, M. A.; ROSENFELD, M.; CHERESH, D. A. Integrin/ 1- and/ 3-mediated Endothelial Cell Migration Integrin/ 1- and/ 3-mediated Endothelial Cell Migration. **J Cell Biol**, v. 121, p. 163-170, 1993.

LI, C.; LI, S.; JIA, C.; YANG, L.; SONG, Z.; WANG, Y. Low concentration of S100A9/A9 promotes angiogenesis-related activity of vascular endothelial cells: bridges among inflammation angiogenesis, and tumorigeneses? **Media Inflamm**, p. ID: 248574, 2012.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Prot**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

MARIA, D. A.; PAGLIARINI, R. C.; MISTRONE, R. J.; POZZI, D. H.; ZYNGIER, S. Mononuclear cell cytotoxicity in rats with Walker 256 tumor. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, p. 1343-1346, 1994.

MARINKOVIC, G.; HEEMSKERK, N.; VAN BUUL, J. D.; de WAARD, V. The Ins and Outs of Small GTPase Rac1 in the Vasculature. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 354, p. 91–102, 2015.

MATTOS, M.; VIEIRA, E.; SILVA, C. R. Walker 256 carcinoma sarcoma: pathology microscopic and ultrastructural features of the circulant cells. **Cienc Cult**, v. 32, p. 849-857, 1980.

MEIERJOHANN, S. Hypoxia-independent drivers of melanoma angiogenesis. **Front in Onco**, v. 5, n. 102, p. 1-7, 2015.

MENDES-DA-CRUZ, D. A.; SMANIOTTO, S.; KELLER, A. C.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Multivectorial abnormal cell migration in NOD mouse thymus. **J Immunol**, v. 180, p. 4639-4647, 2008.

MONN, A.; YONG, H. Y.; SONG, J. I.; CUKOVIC, D.; SALAGRAMA, S.; KAPLAN, D.; PUTT, D.; KIM, H.; DOMBKOWSKI, A.; KIM, H. R. Global gene expression profiling unveils S100A8/A9 as candidate markers in H-Ras-mediated human epithelial cell invasion. **Mol Can Res**, v. 6, p. 1544, 2008.

MONTESANO, S.; ORCI, L.; VASSALLI, P. In vitro rapid organization of Endothelial Cells into Capillary-like networks in promoted by Collagen Matrices. **J Cell Biol**, v. 97, p. 1648-1652, 1983.

MORGAN, D. Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. **Methods Mol Med**, v. 2, p. 101-109, 1996.

MORIOKA, T.; BABA, T.; BLACK, K. L.; STREIT, W. J. Inflammatory cell infiltrates vary in experimental primary and metastatic brain tumors. **Neurosur**, v.30, p. 891-896, 1992.

NISHIUCHI, R.; TAKAGI, J.; HAYASHI, M.; IDO, H.; YAGI, Y.; SANZEN, N.; TSUJI, T.; YAMADA, M.; SEKIGUCHI, K. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. **Matrix Biol**, v. 25, n. 3, p. 189-197, 2006.

NOBES, C.; HALL, A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. **J Cell Biol.**, v. 144, n. 6, p. 1235-1244, 1999.

NTAYI, C.; LORIMIER, S.; BERTHIER-VERGNES, O.; HORNEBECK, W.; BERNARD, P. Cumulative Influence of Matrix Metalloproteinase-1 and -2 in the Migration of Melanoma Cells within Three-Dimensional Type I Collagen Lattices. **Exp Cell Res**, v. 270, p. 110–118, 2001.

OVERALL, C.; LÓPEZ-OTÍN, C. Strategies For Mmp Inhibition In Cancer:Innovations For The Post-Trial Era. **Nat Rev Can**, v. 2, p. 657-672, 2002.

PACOLLA, C. C.; GUTIERREZ, V. P.; LONGO, I.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; GIORGI, R. Antinociceptive effect of C-terminus of murine S100A9 protein on experimental neuropathic pain. **Pep**, v. 29, n. 10, p. 1806-1814, 2008.

PAGANO, R. **Participação da proteína ligante de cálcio MRP-14 no controle da dor inflamatória em peritonite neutrofílica induzida por carragenina ou zimosan em camundongos. (Dissertação de Mestrado)**. FMVZ, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil: [s.n.]. 2001.

PAGANO, R. L.; DIAS, M. A.; DALE, C. S.; GIORGI, R. Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carragenin-induced antinociception in mice. **Med Inflamm**, v. 11, p. 203-2010, 2002.

PAGANO, R. L.; SAMPAIO, S. C.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; GIORGI, R. The C-terminus of murine S100A9 inhibits spreading and phagocytic activity of adherent peritoneal cells. **Inflamm Res**, v. 54, p. 204-210, 2005.

PAGANO, R.; MARIANO, M.; GIORGI, R. Neutrophilic cell-free exudate induces antinociception mediated by the protein S100A9. **Med Inflamm**, v. 2006, n. 4, p. 1-6, 2006.

PAGANO, R. L.; SAMPAIO, S. C.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; GIORGI, R. Involviment of proteinase-activated receptors 1 and 2 in spreading and phagocytosis by murine adherent peritoneal cells: Modulation by the C-terminus of S100A9 protein. **Europ J Pharmac**, v. 628, p. 240-246, 2009.

PAGANO, R. L.; MORAES, N. F.; de LORENZO, B. H.; COCCUZZO SAMPAIO, S.; MARIANO, M.; GIORGI, R. Inhibition of Macrophage Functions by the C-Terminus of Murine S100A9 Is Dependent on B-1 Cells. **Med Inflamm**, p. 1-10, 2014.

PEICHEV, M.; NAIYER, A. J.; PEREIRA, D.; ZHU, Z.; LANE, W. J.; WILLIAMS, M.; OZ, M. C.; HICKLIN, D. J.; WITTE, L.; MOORE, M. A.; RAFII, S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. **Blood**, v. 95, n. 3, p. 952-958, 2000.

PELLIKAINEN, J. M.; ROPPONEN, K. M.; KATAJA, V. V.; KELLOKOSKI, J. K.; ESKELINEN, M. J.; KOSMA, V. M. Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in Breast Cancer with a Special Reference to Activator Protein-2, HER2, and Prognosis. **Clin Can Res**, v. 10, p. 7621–7628 , 2004.

PEPLOW, P. V. Influence of growth factors and cytokines on angiogenic function of endothelial progenitor cells: a review of in vitro human studies. **Grow Fac**, v. 32, n. 3–4, p. 83–116, 2014.

QIN, F.; SONG, Y.; LI, Z.; ZHAO, L.; ZHANG, Y.; GENG, L. S100A8/A9 Induces Apoptosis and Inhibits Metastasis of CasKi Human Cervical Cancer Cells. **Pathol Oncol Res**, v, 16, p. 353–360, 2010.

RAFTERY, M. J.; HARRISON, C. A.; ALEWOOD, P.; JONES, A.; GECZY, C. L. Isolation of the murine S100 protein MRP14 (14 kDa migration-inhibitory-factor-related protein) from

activated spleen cells: characterization of post-translational modifications and zinc binding. **Biochm J**, v. 316, n. Pt 1, p. 285-293, 1996.

RAJESH, E.; SANKARI, L. S.; MALATHI, L.; KRUPAA, J. R. Naturally occurring products in cancer therapy. **J Pharm Bio Sci.**, v. 7, n. Suppl 1, p. S181–S183, 2015.

RAMMES, A.; ROTH, J.; GOEBELER, M.; KLEMPT, M.; HARTMANN, M.; SORG, C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. **J Biol Chem**, v. 272, p. 9496-9502, 1997.

RAMOS, F. **Efeitos do hormônio do crescimento sobre as células endoteliais tímicas (Dissertação de Mestrado)**. Universidade Federal do Alagoas, Brasil: [s.n.]. 2008.

REN, J.; ZHANG, L. Effects of ovarian cancer G protein coupled receptor 1 on the proliferation, migration, and adhesion of human ovarian cancer cells. **Chin Med J**, v. 124, n. 9, p. 1327-1332, 2011.

RIDLEY, A. J. Pulling back to move forward. **Cell Press**, v. 116, p. 357-358, 2004,.

RIDLEY, A. J.; SCHWARTZ, M. A.; BURRIDGE, K.; FIRTEL, R. A.; GINSBERG, M. H.; BORISY, G.; PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R. Cell migration: integrating signals from front to back. **Sci**, v. 302, n. 5651, p. 1704-1709, 2003.

RIENTO, K.; RIDLEY, A. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 4, n. 6, p. 446-56, 2003.

ROBBINS; COTRAN. Neoplasia. In: ROBBINS; COTRAN **Bases Patológicas das Doenças - Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 281-356.

ROSA, L. F.; GUIMARAES, A. R.; SAFI, D. A.; CURI, R.; WILLIAMS, J. F. Effects of various dietary fatty acids on enzyme activities of carbohydrate and glutamine metabolism and the metabolic response of lymphocytes and macrophages during WALKER-256 ascites cell tumour growth in rats. **Biochem Mol Biol Int**, v. 29, p. 33-45, 1993.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 329-334., 1947.

SAHA, A.; LEE, Y. C.; ZHANG, Z.; CHANDRA, G.; SU, S. B.; MUKHERJEE, A. B. Lack of an Endogenous Anti-inflammatory Protein in Mice Enhances Colonization of B16F10 Melanoma Cells in the Lungs. **J Biol Chem**, p. 10822–10831, 2010.

SANDER, E.; COLLARD, J. Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. **Eur J Cancer.**, v. 35, n.14, p. 1905-1911, 1999.

SCHAFER, B.; HEINZMAN, C. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. **Trends Biochem Sci**, v. 21, p. 134-140, 1996.

SCHETTER, A. J.; HEEGAARD, N. H. H.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogen**, v. 31, n. 1, p. 37–49, 2010.

SHIH, Y. T.; WANG, M. C.; PENG, H. H.; CHEN, T. F.; CHEN, L.; CHANG, J. Y.; CHIU, J. J. Modulation of chemotactic and pro-inflammatory activities of endothelial progenitor cells by hepatocellular carcinoma. **Cell Sign**, v. 24, p. 779–793, 2012.

SHIRLEY, S. H.; von MALTZAN, K.; ROBBINS, P. O.; KUSEWITT, D. F. Melanocyte and Melanoma Cell Activation by Calprotectin. **J Skin Can**, p. 1-5, 2014.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; SOFFER, D.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nat.**, v. 359, n. 6398, p. 843-845, 1992.

SILVA, E. J.; ARGYRIS, P. P.; ZOU, X.; ROSS, K. F.; HERZBERG, M. C. S100A8/A9 regulates MMP-2 expression and invasion and migration by carcinoma cells. **Int J Biochem**, p. 279–287, 2014.

SIMPKINS, H.; LEHMAN, J. M.; MAZURKIEWICZ, J. E.; DAVIS, B. H. A morphological and phenotypic analysis of Walker 256 cells. **Can Res**, v. 51, p. 1334-1338, 1991.

SINGH, A. K.; ARYA, R. K.; TRIVEDI, A. K.; SANYAL, S.; BARAL, R.; DORMOND, O.; BRISCOE, D. M.; DATTA, D. Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. **Cyto & Grow Fac Rev**, v. 24, p. 41–49, 2013.

SINGH, S.; SADANANDAM, A.; SINGH, R. K. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. **Can Metast Rev** , v. 26, p. 453–467, 2007.

SOARES, F. A.; **Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto**. [S.l.]: [s.n.]. 1989.

SOARES, F. A.; SHAUGHNESSY, S. G.; MACLARKEY, W. R.; ORR, F. W. Quantification and morphologic demonstration of reactive oxygen species produced by Walker 256 tumor cell in vitro and during metastasis in vivo. **Lb Invest**, p. 71: 480-489, 1994.

SOHNLE, P.; COLLINS-LECH, C.; WIESSNER, J. The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. **J Infect Dis**, v. 164, p. 137-142, 1991.

SOTTILE, J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. **Biochim et Biophy Acta**, p. 13-22, 2004.

SRIKRISHNA, G. S100A9 and S100A9: New insights into their role in malignancy. **J Inn Imm**, v. 4, p. 31-40, 2012.

STEINBAKK, M.; NAESS-ANDRESEN, C. F.; LINGAAS, E.; DALE, I.; BRANDTZAEG, P.; FAGERHOL, M. K. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. **Lancet**, v. 336, p. 763-765, 1990.

TUCKER, G. Inhibitors of integrins. **Curr Opin Pharmacol**, v. 2, n. 4, p. 394-402, 2002.

TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. **Biochimie** , v. 87 , p. 287–297, 2005.

van der MEER, A. D.; VERMEUL, K.; POOT, A. A.; FEIJEN, J.; VERMES, I. A microfluidic wound-healing assay for quantifying endothelial cell migration. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 298, p. H719–H725, 2010.

VARNER, J.; CHERESH, D. Integrins and cancer. **Curr Opin Cell Biol**, v. 8, n. 5, p. 724-730., 1996.

WANG, X.; ZHAO, X.; WANG, K.; WU, L.; DUAN, T. Interaction of monocytes/macrophages with ovarian cancer cells promotes angiogenesis in vitro. **Can Sci**, v. 104, n. 4, p. 516-523, 2013.

WANG, X. G.; MENG, Q.; QI, F. M.; YANG, Q. F. Blocking TGF-β inhibits breast cancer cell invasiveness via ERK/S100A4 signal. **Europ Rev for Med and Pharmaco Sci**, v. 18, p. 3844-3853, 2014.

WEIS, S.; CHERESH, D.αv integrins in angiogenmesis and cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med**, p. doi. 10.1101, 2011.

WILLIAMS, R.; COURTNEIDGE, S.; WAGNER, E. Embryonic lethalities and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. **Cell Press**, v. 52, n. 1, p. 121–131, 1988.

WOLF, K.; MÜLLER, R.; BORGMANN, S.; BRÖCKER, E. B.; FRIEDL, P. Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. **Blood**, v. 102, n. 9, p. 3262-3269, 2003.

WOLF, K.; ALEXANDER, S.; SCHACHT, V.; COUSSENS, L. M.; von ANDRIAN, U. H.; van RHEENEN, J.; DERYUGINA, E.; FRIEDL, P. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 20, n. 8, p. 931–941, 2009.

WU, X.; CHEN, H.; GAO, Q.; BAI, J.; WANG, X.; ZHOU, J.; QIU, S.; XU, Y.; SHI, Y.; WANG, X.; ZHOU, J.; FAN, J. Downregulation of JWA Promotes Tumor Invasion and Predicts Poor Prognosis in Human Hepatocellular Carcinoma. **Mol Carcino**, v. 53, p.325–336, 2014.

YADAV, L.; PURI, N.; RASTOGI, V.; SATPUTE, P.; AHMAD, R.; KAUR, G. Matrix Metalloproteinases and Cancer - Roles in Threat and Therapy. **Asian Pac J Can Preven**, v. 15, n. 3, p. 1085-1091, 2014.

YEN, T.; HARRISON, C. A.; DEVERY, J. M.; LEONG, S.; IISMAA, S. E.; YOSHIMURA, T.; GECZY, C. L. Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli. **Blood**, v. 90, p. 4812-4821, 1997.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G.; LEHEMBRE, F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 12, p. 535-541, 2007.

YOON, S. O.; PARK, S. J.; YUN, C. H.; CHUNG, A. S. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. **J Biochem and Mol Biol**, v. 36, p. 128-137, 2003.

YUI, S.; NAKATANI, Y.; HUNTER, M. J.; CHAZIN, W. J.; YAMAZAKI, M. Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP8 and MRP14) from target cells in its apoptosis-inducing activity. **Med Inflamm**, v. 11, p. 165-172, 2002.

YUI, S.; MIKAMI, M.; YAMAZAKI, M. Purification and characterization of the cytotoxic factor in rat peritoneal exudate cells: its identification as the calcuim binding protein complex, calprotectin. **J Leukoc Biol**, v. 58, p. 307-316, 1995b.

YUI, S.; YAMAZAKI, M.; MIKAMI, M. Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. **J Leukoc Biol**, v. 58, p. 650-658, 1995a.

ZIMMER, D. B.; CORNWALL, E. H.; LANDAR, A.; SONG, W. The S100 protein family: history, function, and expression. **Brain Res Bull**, v. 37, p. 417-429, 1995.

ZWADLO, G.; BRÜGGEN, J.; GERHARDS, G.; SCHLEGEL, R.; SORG, C. Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissue. **Clin Exp Immunol**, v. 72, p. 510-515, 1988.