

TACIANE BARBOSA HENRIQUES

O PAPEL DE CXCR2 EM CÉLULAS PAN-
QUIMIORRESISTENTES DE CÂNCER DE OVÁRIO
Seroso de Alto Grau

Defesa de tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo/RENORBIO, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, na área de concentração Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Batista Azevedo Rangel

VITÓRIA

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

H518p Henriques, Taciane Barbosa, 1989-
O papel de CXCR2 em células pan-quimiorresistentes de
câncer de ovário seroso de alto grau / Taciane Barbosa
Henriques. - 2020.
116 f. : il.

Orientadora: Leticia Batista Azevedo Rangel.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Câncer. 2. Quimioterapia. 3. Resistência à drogas. 4.
Tumores de ovário. I. Rangel, Leticia Batista Azevedo. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 61

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

REGISTRO DE JULGAMENTO DA TESE DO(A) CANDIDATO(A) AO GRAU DE DOUTOR(A) PELO PPGBIOTEC/RENORBIO.

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada "O PAPEL DE CXCR2 EM CÉLULAS PAN-RESISTENTES DE CÂNCER DE OVÁRIO SEROSO DE ALTO GRAU" elaborada por TACIANE BARBOSA HENRIQUES, candidata ao Grau de Doutora em Biotecnologia, recomendou, após apresentação da Tese, realizada no dia 02 de julho de 2020, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

Aprovada

Reprovada

Os membros da Comissão deverão indicar a natureza de sua decisão através de sua assinatura na coluna apropriada que segue:

Aprovada	Reprovada
Marco Cesar Cunegundes Guimarães	-----
Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves	-----
Paulo Cilas Morais Lyra Junior	-----
Etel Rodrigues Pereira Gimba	-----
Leticia Batista Azevedo Rangel	-----



Assinado digitalmente por: Paulo Cilas Morais Lyra Junior
Razão: Professor responsável pelo documento
Localização: FAEMA - Ariquemes/RO
O tempo: 02-08-2020 18:39:08

Campus Universitário Maruípe – Av. Maruípe, 1468 – Maruípe, Vitória – ES | 29047-185 |
Tel. e Fax: (27) 3335-9501 | <http://www.biotecnologia.ufes.br/> | renorbios@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por LETICIA BATISTA AZEVEDO RANGEL - SIAPE 1278597
Departamento de Ciências Farmacêuticas - DCFA/CCS
Em 06/07/2020 às 11:20

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/36488?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por MARCO CESAR CUNEGUNDES GUIMARAES - SIAPE 2622289
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 17/07/2020 às 22:12

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/40644?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por JULIANA BARBOSA COITINHO GONCALVES - SIAPE 2077211
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 19/07/2020 às 12:05

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/40700?tipoArquivo=O>

À meu pai, José Antonio (in Memoriam), a tua presença
sempre continuará no meio de nós e jamais o tempo fará
esquecer você.

À minha mãe, Maurem, pelo apoio incondicional em todos
os momentos difíceis que enfrentamos.
Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus primeiramente, por me dar forças todos os dias para seguir em frente, principalmente no momento mais difícil da minha vida, me guiando no caminho de luz e fé.

À minha família, pelo amor incondicional, por toda ajuda física e mental, sem vocês nada disso faria sentido, vocês são o bem mais precioso que eu tenho, em especial a minha mãezinha, que passou por tantas dificuldades e se manteve forte ao meu lado sempre.

À minha orientadora, Leticia, pela mãe/mulher guerreira que é, por cuidar e lutar por nós, pelas risadas e cafés (que foram muitos), pelos conselhos, confiança, orientação e grande contribuição para minha formação profissional.

À meus amigos do LBCMCH, quantas risadas, momentos e experimentos, vocês tornaram a trajetória mais leve e prazerosa. Em especial, à Diandra, Nayara e Isabela, que tornaram a amizade para além do trabalho, ter vocês por perto mesmo longe na distância, tornou o caminho menos árduo, obrigada pelos encontros, conversas, conselhos e acima de tudo pela amizade que permanecerá para sempre.

À meus amigos da cidade natal (Rio Claro), velhos e novos, por terem me recebido de braços abertos no momento que precisei de conforto e atenção. Vocês são a loucura mais sensata na minha vida, né?

Agradeço a UFES e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO).

Aos membros da banca examinadora por aceitarem prontamente o nosso convite.

Agradeço a Dra. Raquel Almeida, por me receber em seu laboratório durante meu doutorado sanduíche, por todo suporte, orientação e dedicação.

À meus novos amigos de Portugal, por todo carinho, amizade e ajuda durante os 7 meses de doutorado que estive lá. Vocês tornaram a vida sozinha em outro país simples e divertida. A saudade está grande e em breve estaremos unidos.

Agradeço ao Instituto de Investigação e Inovação em saúde (I3s) e o Instituto de patologia e imunologia molecular da universidade do Porto, pela recepção e suporte ao longo do doutorado sanduíche.

Agradeço a Dra. Etel Gimba, do Instituto Nacional do Câncer, pela parceria e colaboração ao longo do trabalho.

Agradeço ao Criobanco, por disponibilizar o seu espaço e infra-estrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por conceder as bolsas de doutorado e de doutorado sanduíche.

*Tenho a impressão de ter sido uma
criança brincando a beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma
pedrinha mais lisa ou uma concha mais
bonita que as outras, enquanto o
imenso oceano da verdade continua
misterioso diante de meus olhos.*

Isaac Newton

RESUMO

O câncer de ovário (CAOV) representa o oitavo câncer mais incidente entre as mulheres, sendo, a quinta causa de morte por câncer no universo feminino. Apesar da resposta satisfatória inicial à terapia baseada em platina/taxanos, a quimiorresistência ainda representa uma das maiores limitações no tratamento do câncer. Deste modo, diversos estudos têm voltado sua atenção para melhor compreensão dos mecanismos que levam à resistência a droga, a fim de aprimorar as estratégias terapêuticas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes bem como a taxa de sobrevivida. Dados conduzidos por nosso grupo demonstraram que quimiocinas superexpressas secretadas no meio condicionado, como CXCL2 e CXCL8, provavelmente desempenham um papel crucial na quimiorresistência de células de câncer de ovário epitelial seroso de alto grau (CAOV). O presente estudo focou no papel de CXCR2 e seus ligantes, CXCL2 e CXCL8, nas células de CAOV. Nesse contexto, apontamos para a importância da modulação da expressão de CXCR2 na aquisição de fenótipos quimiorresistentes no CAOV. Nosso modelo de estudo foi baseado em duas linhagens de CAOV seroso de alto grau, denominada A2780 quimiossensível, e sua derivada pan-resistente, ACRP, com IC50 para Cisplatina de 7,3 μ M para A2780 e 26,56 μ M para ACRP, ($p < 0,001$). Realizamos inicialmente a expressão de CXCR2 por imunofluorescência e vimos uma expressão anômala nuclear de CXCR2. O silenciamento de CXCR2 foi realizado por RNA de interferência e validado por Real Time PCR e teve sua expressão diminuída em 2,5 vezes para ACRP e 1,8 vezes para A2780. Os efeitos de CXCR2 por siRNA e por um inibidor de CXCR2, SB225002, foram investigados, mostrando uma diminuição na proliferação de 3,5 vezes para ACRP e 2,0 vezes para A2780 e na viabilidade celular houve uma menor viabilidade na linhagem ACRP silenciada (80%) em relação a A2780 (50%), ainda, esse experimento mostrou que o silenciamento de CXCR2 aumentou a eficácia de cisplatina, mais evidente na ACRP. O modelo de membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM) foi utilizado para avaliar o perfil angiogênico e tumorigênico. Houve decréscimo do crescimento tumoral nas células ACRP em 4 vezes, quando silenciadas. O silenciamento do CXCR2 sugeriu reduzir as vias de sinalização envolvidas na progressão do câncer, como PI3K/AKT (0,5 vezes, $p = 0,09$) e MAPK/ERK (0,3 vezes, $p = 0,7$), bem como diminuir as proteínas associadas ao TEM, como SLUG em 0,9 vezes ($p = 0,022$) e SNAIL em 1,1 vezes ($p = 0,005$). Por método de Kaplan-Meier demonstramos que a superexpressão do CXCR2 está associada ao pior prognóstico e sobrevivida em estágios mais avançados da doença ($p = 0,035$). Em conjunto, nossos resultados apresentam uma estratégia inovadora para combater o CAOV seroso de alto grau quimiorresistente, silenciando CXCR2 anormalmente expresso.

Palavras-chave: Câncer de ovário, CXCR2, Quimioterapia, Microambiente tumoral

ABSTRACT

Ovarian cancer (CAOV) represents the eighth most common cancer among women, being the fifth leading cause of cancer death in the female universe. Despite the initial satisfactory response to platinum/taxane based therapy, chemoresistance still represents one of the major limitations in cancer treatment. Thus, several studies have turned their attention to better understanding the mechanisms that lead to drug resistance, in order to improve therapeutic strategies and improve patients' quality of life as well as survival rate. Data conducted by our group showed that overexpressed chemokines secreted in the conditioned medium, such as CXCL2, IL-6 and IL-8, probably play a crucial role in the chemoresistance of epithelial ovarian cancer (COE) cells. This project has focused on the role of CXCR2 and its CXCL2 and CXCL8 ligands. In this context, we point to the importance of modulating CXCR2 expression in the acquisition of chemoresistant phenotypes in CAOV. Our study model was based on two high grade CAOV cells lines, called chemosensitive A2780, and its pan-resistant derivative, ACRP, with IC₅₀ for Cisplatin of 7.3 μ M for A2780 and 26.56 μ M for ACRP ($p < 0.001$). Initially, we performed the expression of CXCR2 by immunofluorescence and discovered an anomalous nuclear expression of CXCR2. CXCR2 silencing was performed by interference RNA and validated by the Real Time PCR technique and its expression decreased by 2.5 fold to ACRP and 1.8 fold to A2780. The effects of CXCR2 knockdown by siRNA and a CXCR2 inhibitor, SB225002, were investigated, showing a decrease in proliferation of 3.5 fold to ACRP and 2.0 fold to A2780. In the cell viability there was less viability in the silenced ACRP cells (80%) compared to A2780 (50%), yet, this experiment showed that silencing CXCR2 increased the effectiveness of cisplatin, most evident in ACRP. The chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) model was used to evaluate the angiogenic and tumorigenic profile. There was a decrease in tumor growth in ACRP cells by 4 fold, when silenced. CXCR2 silencing suggested reducing the signaling pathways involved in cancer progression, such as PI3K/AKT (0.5 fold, $p = 0.09$) and MAPK/ERK (0.3 fold, $p = 0.7$), as well as how to decrease TEM-associated proteins, such as SLUG by 0.9 fold ($p = 0.022$) and SNAIL by 1.1 fold ($p = 0.005$). The Kaplan-Meier method also demonstrated that CXCR2 overexpression is associated with worse prognosis and survival in later stages of the disease ($p = 0.035$). Taken together, our findings present an innovative strategy for combating pan-chemoresistant high-grade serous CAOV by silencing abnormally expressed CXCR2.

Key words: Ovarian cancer, CXCR2, Chemotherapy, Tumor microenvironment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação histológica do CAOVS	23
Figura 2: Mecanismos de resistência às drogas.	28
Figura 3: Identificação de novos alvos superexpressos em CAOVS.....	33
Figura 4: Mecanismos envolvidos na transdução de sinal de CXCR2.	35
Figura 5: Geração de células pan-resistentes (ACRP) de câncer de ovário seroso de alto grau a partir de sua linhagem parental sensível (A2780).	51
Figura 6: Geração de células pan-resistentes (ACRP) de câncer de ovário seroso de alto grau a partir de sua linhagem parental sensível (A2780).....	52
Figura 7: A Análise da expressão de mRNA por qRT-PCR nas linhagens A2780 e ACRP	55
Figura 8: Análise da expressão de mRNA por qRT-PCR nas linhagens A2780 e ACRP	56
Figura 9: Análise da expressão de mRNA por qRT-PCR na linhagem ACRP para CXCL2 e CXCL8.....	58
Figura 10: Análise da expressão de CXCR2 com silenciamento gênico de CXCR2 nas linhagens A2780 e ACRP por imunofluorescência	60
Figura 11: Correlação da superexpressão de CXCR2 com a pior taxa de sobrevivência global para pacientes com CAOVS seroso de alto grau.	63
Figura 12: Superexpressão de CXCL2 e CXCL8 não correlaciona com a pior taxa de sobrevivência global para pacientes com CAOVS seroso de alto grau	64
Figura 13: Análise da proliferação celular com inibidor SB225002 e silenciamento gênico de CXCR2 por imunofluorescência nas linhagens A2780 e ACRP.....	66
Figura 14: Avaliação da função de CXCR2 na viabilidade celular através de ensaio de formação de colônia com inibidor SB225002 e silenciamento gênico nas linhagens A2780 e ACRP.....	69
Figura 15: Avaliação do papel de CXCR2 no crescimento tumoral por ensaio CAM nas linhagens A2780 e ACRP	72
Figura 16: Avaliação do papel de CXCR2 na angiogênese por ensaio CAM nas linhagens A2780 e ACRP com silenciamento gênico de CXCR2.....	73
Figura 17: Imagem da CAM sem tumor na A2780 (esquerda) e com tumor na ACRP (direita).	73

Figura 18: Imagens de invasão das linhagens celulares A2780 e ACRP com controle negativo e silenciadas para CXCR2.....	76
Figura 19: Análise da expressão proteica de marcadores de TEM com silenciamento gênico e inibidor SB225002 de CXCR2 nas linhagens A2780 e ACRP	79
Figura 20: Análise da expressão de proteínas associadas as vias de sinalização de PI3K/AKT/mTOR e MEK/ERK com silenciamento gênico e inibidor SB225002 de CXCR2 nas linhagens A2780 e ACRP	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estadiamento FIGO de CAOV.....	24
Tabela 2: Concentrações dos quimioterápicos utilizados de acordo com a linhagem celular de CAOV e o tempo de tratamento para o cálculo da IC ₅₀	40
Tabela 3: Primers de RNA de interferência de CXCR2 utilizados no silenciamento gênico.....	41
Tabela 4: Condições experimentais utilizadas nas nas amostras para análise de expressão gênica por qPCR.....	42
Tabela 5: Condições experimentais utilizadas para a síntese de cDNA.....	43
Tabela 6: Primers utilizados na análise da expressão gênica por qPCR	43
Tabela 7: Descrição dos anticorpos primários utilizados na análise da expressão proteica.	45
Tabela 8: Valor das IC ₅₀ estimadas nas linhagens A2780 e ACRP.	50
Tabela 9: Informações clínicas para o CAOV do banco de dados do TCGA	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH - Aldeído desidrogenase

AKT - Proteína cinase B

BRAF - Serina/treonina cinase pertencente à família B-Raf

BRDU – Bromodesoxiuridina

BSA – Soro bovino de albumina

BRCA1/2 - Oncogene do câncer de mama 1/2

CAOV - Câncer de ovário

CAM – Modelo de membrana corioalantóica de embrião de galinha

CA-125 - Antígeno do câncer 125

cDNA – DNA complementar

CD44 - Antígeno CD44

CD24 – Antígeno CD24

CDDP- Cisplatina

COE – Carcinoma ovariano epitelial

CTT - Célula tronco tumoral

CXCL-2/6/8 - Quimiocina de motivo C-X-C Ligante 2/6/8

CXCR2 – Receptor transmembranar de quimiocinas

DOXO - Doxorrubicina

DMSO- Dimetilsulfóxido

EO – Epitélio ovariano

EpCAM – Papel na auto-renovação

ERK1/ERK2 - Cinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares

FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HCL – Ácido Clorídrico

IL - Interleucina

KRAS- Oncogene homólogo ao oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten

MAPK - Proteína cinase ativada por agentes mitogênicos

MDR –Resistência a múltiplas drogas

mRNA - RNA mensageiro

mTOR - Serina/treonina cinase alvo de rapamicina em mamífero

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NFkB- Fator Nuclear Kappa B
PARP - Poli ADP-ribose polimerase 1
PBS - Tampão salino- fosfato
PI3K- Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase
PTEN - Gene homólogo à tensina e fosfatase
PTX - Paclitaxel
p53 - Oncogene 53
qPCR - PCR em tempo real
siRNA – Silenciamento gênico por RNA de interferência
SNAIL - Repressor transcricional 1 da família Snail
SLUG -Repressor transcricional 2 da família Snail
STAT3 - Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TCGA- Atlas genômico do câncer
TBS - Solução salina tamponada com Tris
TBS -T- Solução salina tamponada com Tris acrescido Tween 20
TEM - Transição epitélio-mesênquimal
VCM – Viabilidade celular metabólica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE OVÁRIO	21
2.2 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CAO V	21
2.3 DIAGNÓSTICO	24
2.4 TRATAMENTO.....	26
2.5 MECANISMO DE RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA.....	27
2.6 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL	28
2.7 MICROAMBIENTE TUMORAL.....	30
2.8 PONTENCIAIS ALVOS ENVOLVIDOS NA PROGRESSÃO DO CAO V ...	32
2.9 RECEPTOR DA FAMÍLIA DE QUIMIOCINAS CXC – CXCR2	33
3 OBJETIVO GERAL	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 LINHAGENS CELULARES	39
4.2 INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA.....	40
4.3 ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA	40
4.4 SILENCIAMENTO GÊNICO	41
4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (QRT-PCR) .	42
4.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	44
4.7 WESTERN BLOT	44

4.8 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA	45
4.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO	46
4.10 ENSAIO DE INVASÃO, CRESCIMENTO E ANGIOGÊNESE DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DO OVO DA GALINHA (CAM)	47
4.11 TÉCNICA DE COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA (HE)	48
4.12 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA	48
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 COMPARAÇÃO DA RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ENTRE AS LINHAGENS DE CAO V	50
5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CXCL2, CXCL8 E CXCR2 EM TIPO SELVAGEM E SILENCIADO DE CXCR2 EM LINHAGENS CELULARES DE CAO V	54
5.3 EFEITO DO SILENCIAMENTO DE CXCR2 EM LINHAGENS CELULARES DO CAO V POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	59
5.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SUPEREXPRESSÃO DE CXCR2 EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM CAO V	61
5.5 EFEITO DA INIBIÇÃO E SILENCIAMENTO DE CXCR2 NA PROLIFERAÇÃO EM LINHAGENS CELULARES DE CAO V	65
5.6 EFEITO DA INIBIÇÃO E SILENCIAMENTO DE CXCR2 NA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DA FORMAÇÃO DE COLÔNIA EM LINHAGENS CELULARES DE CAO V	67
5.7 ESTUDO <i>IN VIVO</i> DO PAPEL DE CXCR2 NO TAMANHO TUMORAL E ANGIOGÊNESE DE LINHAGENS CELULARES DO CAO V	71
5.8 EFEITO DO SILENCIAMENTO DE CXCR2 NA INVASÃO DE LINHAGENS CELULARES DO CAO V NA CAM.....	75

5.9 EFEITO DA INIBIÇÃO E SILENCIAMENTO DE CXCR2 EM LINHAGENS CELULARES DO CAO V EM MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL.....	78
5.10 EFEITO DA INIBIÇÃO E SILENCIAMENTO DE CXCR2 EM LINHAGENS CELULARES DO CAO V NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/MTOR E MEK/ERK	81
6. CONCLUSÃO	86
7. PERSPECTIVAS.....	87
8. REFERÊNCIAS.....	88
ANEXO I.....	98

INTRODUÇÃO

O câncer de ovário (CAOV) representa o oitavo tipo de câncer mais incidente entre as mulheres, sendo, paradoxalmente, a principal causa de morte por câncer no universo feminino (ACS, 2019). A incidência de CAOV aumenta com a idade, sendo, 63 anos a idade média ao diagnóstico (MORGAN et al., 2011; PAES et al., 2011; ACS, 2013). Desde 2010, o CAOV passou a ser considerado doença prioritária no Brasil, sendo, em 21 de maio de 2012, publicada a Portaria No. 458 do Ministério da Saúde, regulamentando e aprovando diretrizes diagnósticas e terapêuticas da neoplasia maligna epitelial de ovário. O cenário epidemiológico dramático do CAOV se deve, ao menos parcialmente, ao fato de que cerca de 90% das pacientes são diagnosticadas em estádios avançados da doença, circunstância em que há comprometimento peritoneal e metástases à distância. O diagnóstico ineficiente e tardio do CAOV pode ser explicado, pelo menos em parte, pela ausência de sinais e sintomas patognomônicos em suas fases iniciais (ROSSING et al., 2010; Revisado por MORGAN et al., 2011), bem como pela inespecificidade e ineficiência de técnicas para a detecção precoce da doença.

Os carcinomas ovarianos epiteliais (COEs) correspondem a aproximadamente 90% de todas as neoplasias malignas ovarianas (Revisado por ROMERO; BAST, 2012). Os COEs são tradicionalmente classificados de acordo com o tipo de diferenciação do componente epitelial, exibindo quatro principais subtipos: seroso, células claras, mucinoso e endometrióide. Os tumores serosos correspondem a cerca de 70%, os endometrióides 10%, os mucinosos 10% e os de células claras a menos de 10% de todos os casos de COEs diagnosticados (Revisado por JELOVAC; ARMSTRONG, 2011; BEREK; CRUM; FRIEDLANDER, 2012). Cumpre salientar que os COEs constituem um grupo de neoplasias heterogêneas, as quais foram inicialmente consideradas como sendo originadas a partir do epitélio ovariano (EO). Entretanto, foi verificado que há inúmeras semelhanças entre células cancerosas ovarianas e células epiteliais de sítios extraovarianos. Os COEs são subclassificados em tumores do tipo I e do tipo II (VANG, SHIH E KURMAN, 2009). Em suma, tumores do tipo I são comumente de baixo grau, apresentam alta frequência de mutações na via de Ras, geralmente não têm mutações tanto em p53, quanto em BRCA, apresentam cariótipo relativamente normal e pouco respondem à terapia baseada em derivados de cisplatina (CDDP).

Por outro lado, COEs do tipo II são tipicamente tumores invasivos do tipo *de novo*, logo, são de alto grau, apresentam Ras selvagem, disfunção de BRCA e mutações em *p53*, têm alterações no número de cópias do DNA e são, usualmente, responsivos aos derivados de platina (Revisado por BOWTELL, 2010).

Em contraponto à sua heterogeneidade, o tratamento padrão contra CAO V inclui cirurgia citorrredutora, seguida de quimioterapia baseada em derivados de platina (cisplatina e carboplatina) e taxanos (paclitaxel e docetaxel) (Revisado por CRISTEA et al., 2010). Apesar do sucesso inicial do tratamento, cerca de 70% das pacientes apresentam recidiva de doença quimiorresistente (PAES et al., 2011; Revisado por LEDERMANN et al., 2013). A elevada incidência de CAO V com resistência constitutiva ou adquirida à CDDP impacta negativamente a saúde pública, visto que se relaciona a casos agressivos e potencialmente letais (Revisado por LEDERMANN et al., 2013; PAES et al., 2011; SHERMAN-BAUST et al., 2003), ressaltando a urgência em se determinar novos marcadores e novas estratégias terapêuticas para o CAO V (BEREK; CRUM; FRIEDLANDER, 2012; Revisado por LADISLAU et al., 2013).

Com o intuito de sobrepor as limitações diagnósticas e terapêuticas do câncer de ovário, pesquisadores têm se dedicado à descoberta de novos alvos para a doença. Nesse contexto, terapias alternativas vêm sendo exploradas como estratégias de combate à doença e o nosso trabalho, seguindo nessa direção, aponta para a importância da modulação da expressão de CXCR2 nos fenótipos quimiorresistentes, proliferação, invasão e crescimento tumoral no câncer de ovário.

Quimiocinas da família CXC, como CXCL8 e CXCL2, já foram associadas à quimiorresistência e à metástase do câncer de mama por meio da promoção da migração de células mielóides para o tumor (ACHARYYA et al., 2012). Sabe-se, entretanto, que tanto CXCL8 quanto CXCL2, exercem sua função ao se ligar no receptor CXCR2, cuja expressão está relacionada ao potencial metastático, à modulação da angiogênese e à resistência em outros tipos de câncer como, melanoma (GABELLINI et al., 2009), cólon (OHRI et al., 2010) e pulmão (REILAND et al., 1999) (SHARMA et al., 2013, NANNURU KC, 2011). CXCR2 é expresso em uma variedade de células tumorais, incluindo mama, melanoma,

pâncreas e ovário, sendo esses cânceres com alta capacidade de formar metástase. Muitos estudos têm mostrado o papel dos receptores de quimiocinas em suportar a proliferação, adesão, migração e invasão, que poderia levar à regulação da metástase (NANNURU KC,2011).

Diante do exposto e visto o papel fundamental de CXCR2 em fenótipos sabidamente associados ao câncer, o presente trabalho buscou avaliar o papel de CXCR2 e seus ligantes no câncer de ovário, utilizando o silenciamento gênico desse receptor e um inibidor não peptídico antagonista de CXCR2, envolvido em doenças inflamatórias como, artrite reumatoide e colite ulcerativa (CHAKRABARTI e PATEL, 2005)

Os dados deste trabalho são promissores e poderão contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na progressão do CAO, explorando novas possibilidades de estratégias terapêuticas contra a doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE OVÁRIO

O carcinoma ovariano é considerado a principal causa de morte do que qualquer outro câncer no sistema reprodutivo feminino. Segundo dados da Sociedade Americana do Câncer, para o ano de 2020, são estimados 21.750 novos casos de CAO e 13.940 óbitos nos Estados Unidos. O risco de uma mulher desenvolver câncer de ovário durante sua vida é cerca de 1 em 78, sendo mais comum em mulheres afro-americanas e com prevalência em mulheres acima dos 60 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

No Brasil, dados de 2018 do Instituto Nacional do Câncer mostraram que o CAO ocupou a oitava posição dentre os principais tipos de câncer que acometem as mulheres com 6.150 novos casos. O Espírito Santo apresenta taxa de incidência de 5,61 por 100 mil habitantes, sendo que, considerando apenas Vitória, essa taxa sobe para 9,52, no ano de 2018 (Instituto nacional do câncer, 2019).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, publicados em 2008, estima-se um crescimento em torno de 16,2% da população idosa em 50 anos. Assim, à medida que a população envelhece, aumenta-se o número total de casos dessa neoplasia, o que reflete economicamente nos sistemas de saúde público e privado (MAGALHÃES, 2013). Diante dos dados apresentados, em 2010 o CAO passou a ser considerado doença prioritária no Brasil, sendo aprovado e regulamentado pelo Ministério da Saúde diretrizes diagnósticas e terapêuticas utilizadas no tratamento desta neoplasia.

2.2 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CAO

Acreditava-se anteriormente que o câncer de ovário iniciava somente nos ovários, mas, estudos sugerem que muitos tumores podem iniciar em células distantes e na tuba de falópio (CALLAHAN *et al.*, 2007; PIEK *et al.*, 2001).

O CAO é formado por um grupo de doenças com diferenças morfológicas e etiológicas que compartilham a mesma localização, sendo então uma doença heterogênea. Dados moleculares e patológicos mostraram que muitos tumores dos diferentes subtipos histológicos compartilham de poucas similaridades

moleculares e podem ser derivados de tecidos não ovarianos ((MCCLUGGAGE, 2011; PRAT, 2014; VAUGHAN *et al.*, 2011)).

Os ovários são compostos principalmente por 3 tipos de células e cada uma delas pode desenvolver diferentes tipos de tumores. Tumores epiteliais iniciam através de células que cobrem a superfície do ovário e na tuba de falópio, tumores de células germinativas começam de células que produzem os óvulos e tumores de estroma têm origem em células que produzem os hormônios femininos, estrogênio e progesterona.

Os tumores epiteliais são os mais comuns e podem ser benignos, malignos ou *bordeline*. Os carcinomas malignos acometem cerca de 90% dos casos de câncer de ovário, possuindo muitas características que são usadas para classificá-los em diferentes tipos. O tipo seroso é o mais comum e pode ser dividido ainda em seroso de baixo grau (5%) e seroso de alto grau (70%). Existem ainda os tipos mucinoso (10%), endometrióide (10%) e de células claras (-10%) (FIGURA 1) (LEE *et al.*, 2003, PRAT, 2014, ACS,2018).

O carcinoma seroso de alto grau pode ter origem na superfície do ovário e na tuba de falópio, já no seroso de baixo grau, as células são derivadas do ovário (BOWTELL, 2010). Os mucinosos, no entanto, ocorrem como metástases no ovário e frequentemente possuem como origem o cólon, o apêndice ou o estômago (LEE & YOUNG, 2003; ZAINO *et al.*, 2011). Por outro lado, o carcinoma endometrióide e de células claras podem vir da endometriose (VAUGHAN *et al.*, 2011)

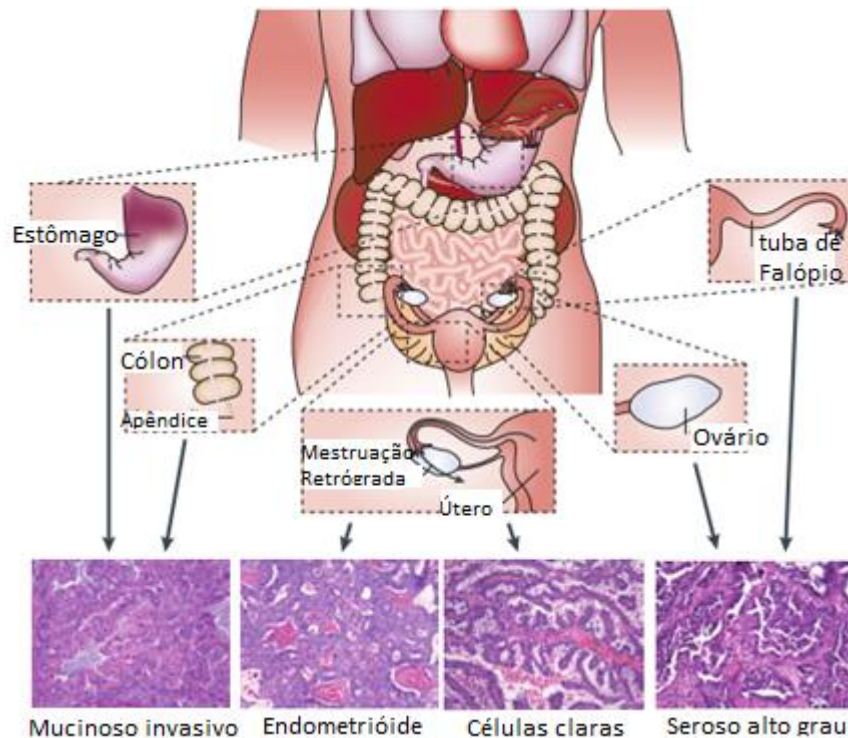


FIGURA 1: Classificação histológica do CAO

Imagens histológicas cortesia R. Drapkin, Dana-Farber, Cancer Institute, EUA, e C. Crum, Brigham e Women Hospital, EUA. Adaptado VAUGHAN *et al.*, 2011.

Para além dessas classificações, o CAO pode ser dividido ainda em dois grandes grupos: tumores do tipo I e tumores do tipo II. Os tumores do tipo I englobam os carcinomas seroso de baixo grau, células claras, mucinoso e endometrióide que tendem a crescer lentamente e são tumores que não respondem bem à quimioterapia, sendo associados com alterações moleculares distintas, raramente encontradas em tumores tipo II, como mutações em serina/treonina cinase da família B-raf (BRAF), oncogene homólogo ao oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten (KRAS) e gene homólogo à tensina e fosfatase (PTEN). Já os tumores do tipo II, correspondem aos carcinomas seroso de alto grau e carcinomas indiferenciados que possuem crescimento rápido e tendem a responder melhor à quimioterapia, apresentando homogeneidade molecular e morfológica, com cerca de 98% de mutações no oncogene 53 (TP53) (KURMAN, 2013).

2.3 DIAGNÓSTICO

A detecção precoce do câncer de ovário é de grande importância para a taxa de cura das pacientes. No entanto, a maioria dos casos são detectados em estadios avançados (MCCLUGGAGE, 2011; SOSLOW, 2008).

O estadiamento do CAOv segue diretrizes estabelecidas pela FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia) que foi revisada em 2018 devido à classificação do CAOv como uma doença heterogênea (PRAT, 2014) (TABELA 1).

Apesar dos métodos de rastreio para mulheres sem sintomas iniciais não serem eficazes, o conhecimento de alguns desses sintomas como dor pélvica ou abdominal, urgência ou frequência urinária, inchaço e saciedade precoce, pode ajudar a identificar a doença em fase precoce (GOFF *et al.*, 2007). A especificidade é de 90% para pacientes com mais de 50 anos, e 86,7% para pacientes com menos de 50 anos. Dessa forma, a presença desses sintomas deve ser considerada no diagnóstico diferencial de CAOv (JELOVAC; ARMSTRONG, 2011).

Tabela 1: Estadiamento FIGO. Adaptado, ACS, 2018.

Estadiamento FIGO	Características
I	Doença confinada no ovário ou tuba de falópio
IA	Tumor limitado em 1 ovário (cápsula intacta) ou tuba de falópio, sem ascites
IB	Tumor em ambos os ovários (cápsula intacta) ou tuba de falópio, sem ascites
IC	Estádio IA ou IB adicionado de ascites, cápsula rompida, tumor na superfície do ovário
II	Tumor com metástase na pélvis
IIA	Tumor espalhou ou invadiu o útero, tuba de falópio ou ovários
IIB	Tumor na superfície externa ou cresceu em outro órgão pélvico como bexiga

IIIA1	Há câncer peritoneal primário (T1) e pode ter se espalhado ou crescido em órgãos próximos na pelve (T2). Ele se espalhou para os linfonodos retroperitoneais (pélvicos e / ou para-aórticos) apenas.
IIIA2	Câncer cresceu em órgãos fora da pelve, pequenos tumores encontrados no abdômen
IIIB	Tumores grandes a olho nu <2cm, pode ou não ter se espalhado para gânglios linfáticos
IIIC	Tumores grandes a olho nu <2cm, pode estar no exterior do baço e fígado e pode ou não ter se espalhado para gânglios linfáticos
IVA	Espalhamento no fluido ao redor dos pulmões
IVB	Espalhamento para interior do baço, fígado, nódulos linfáticos, em tecidos fora da cavidade peritoneal como pulmão e ossos.

Atualmente, existem diversos estudos em desenvolvimento testando novas formas de detecção para o CAO, através da proteômica e uso de novas técnicas de imagem como ressonância magnética funcional. Recentemente, foi desenvolvido um teste denominado OVA1, o qual tem a capacidade de medir 5 tipos de proteína no sangue determinando se o tumor é de baixo risco ou alto risco (ACS, 2018).

Mas, por enquanto, ainda temos o diagnóstico de CAO se iniciando com detecção de uma massa anexial durante exame pélvico, sendo a ultrassonografia o teste de rastreio não invasivo mais utilizado. A cirurgia depende do grau de malignidade da massa pélvica associado a fatores como a idade da paciente, o início da menopausa, o histórico familiar, o nível de CA-125 e a uni- ou bilateralidade do tumor (CANNISTRA, 2004). Embora recomendada clinicamente, a dosagem de CA-125 ainda é duvidosa, visto que esse marcador pode estar elevado tanto em condições não-malignas como endometriose e em casos de inflamação pélvica, bem como em doenças malignas, incluindo tumores do endométrio e do pâncreas (BAST *et al.*, 1983).

2.4 TRATAMENTO

Com relação à abordagem terapêutica para o CAO, o tratamento pode ser dividido em terapia local (cirurgia) e terapia sistêmica. A cirurgia é curativa para a maioria dos casos de tumores detectados em estadiamento I e II, tendo uma taxa de sobrevida de cinco anos em torno de 90% (HENNESSY *et al.*, 2009).

A terapia sistêmica, a qual a escolha é influenciada pelas características tumorais e características do paciente, engloba três modalidades: a quimioterapia, hormonioterapia e a terapia alvo ou direcionada (ASC, 2018). O tratamento de primeira escolha para quimioterapia é baseado em derivados de platina e taxanos com resposta inicial superior a 80%, porém essas pacientes sofrem recidiva do tumor e apresentam sobrevida média de apenas 18 meses (MODUGNO; EDWARDS, 2012). O tratamento padrão para estadiamento avançado é citorredução cirúrgica (histerectomia abdominal total, salpingo-ooforectomia bilateral, linfadenectomia pélvica e paraaórtica) seguida de quimioterapia. Essas pacientes com estadiamento avançado apresentam sobrevida de cinco anos somente, entre 10- 30% (HENNESSY *et al.*, 2009; PAES *et al.*, 2011).

O agente alquilante cisplatina (cis-diaminodicloroplatina(II)) (CDDP) foi introduzido para o CAO em 1973 (OMURA *et al.*, 1986). O mecanismo de ação dos derivados de platina consiste na ativação intracelular e posterior ligação covalente com o sulco maior no DNA formando adutos, por meio de ligações intra e intercadeias, induzindo alterações estruturais no DNA, ocorrendo a ativação de diversas vias de transdução de sinal como, vias de reparo de DNA, ciclo celular e apoptose (KELLAND, 2007).

Em 1990, o tratamento de CAO mudou com a descoberta dos taxanos. O PTX é um éster alcalóide complexo que interfere na formação dos microtúbulos durante a mitose resultando em parada do ciclo celular. Estudos mostraram que o PTX é ativo no tratamento do CAO recorrente, incluindo os casos de câncer progressivo durante ou alguns meses após o tratamento à base de CDDP (THIGPEN *et al.*, 1994; TRIMBLE *et al.*, 1993). Com isso, pacientes que apresentam resistência à CDDP se beneficiam da combinação de carboplatina e PTX no tratamento dessa doença.

Drogas bloqueadoras de hormônios são utilizadas hoje com o intuito de combater o câncer de ovário, como por exemplo, o Tamoxifeno e os inibidores de aromatase, utilizados, por exemplo, para câncer de mama e câncer de próstata, porém, esse tipo de tratamento raramente é utilizado para tratar o tipo epitelial.

A terapia alvo por sua vez, se baseia no uso de drogas ou outros tipos de substâncias que identificam e atacam células cancerosas, causando pouco dano às células normais. Esse tipo de tratamento ataca o funcionamento interno das células, mudando a maneira como uma célula cancerosa cresce, se divide ou interage com outras células. Alguns exemplos são os inibidores de PARP que bloqueiam o reparo ao DNA, Bevacizumab, que são inibidores da angiogênese e Olaparib, normalmente usado após tentativas ineficazes de quimioterapias em estádios avançado do câncer.

2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA

Apesar do CAO V ser um dos tumores sólidos mais sensíveis à terapia padrão, a maioria das pacientes em estadió avançado apresenta recidiva e desenvolve quimiorresistência ao tratamento (JAPAN SOCIETY OF GYNECOLOGIC ONCOLOGY, 2010)

A resposta à terapia varia entre os pacientes que, ou respondem de forma completa, ou parcial, de forma transiente ou não respondem. Os fatores que favorecem o fenótipo de resistência incluem diminuição do influxo e aumento do metabolismo de drogas, alterações da via de morte celular, aumento do reparo do DNA, alterações nos *checkpoints* que ocorrem durante o ciclo celular, alterações nas vias de sinalização intracelular e transição epitélio-mesenquimal (TEM), que tem recebido atenção crescente pelo seu papel na resistência à drogas (LAGE, 2008; GILLET & GOTTESMAN 2010; BOWEN DU, et al., 2016) (FIGURA 2). A quimiorresistência também vem sendo atribuída a subpopulações de células tronco tumorais, envolvidas na iniciação, progressão e recidiva tumoral (DAS & LAW, 2018).

Vale ressaltar ainda que o microambiente tumoral está intrinsicamente relacionado à quimiorresistência, uma vez que ocorre interação funcional entre as células tumorais e células adjacentes através dos fatores secretados, os quais

apresentam um papel essencial na iniciação e progressão tumoral (DAS & LAW, 2018).

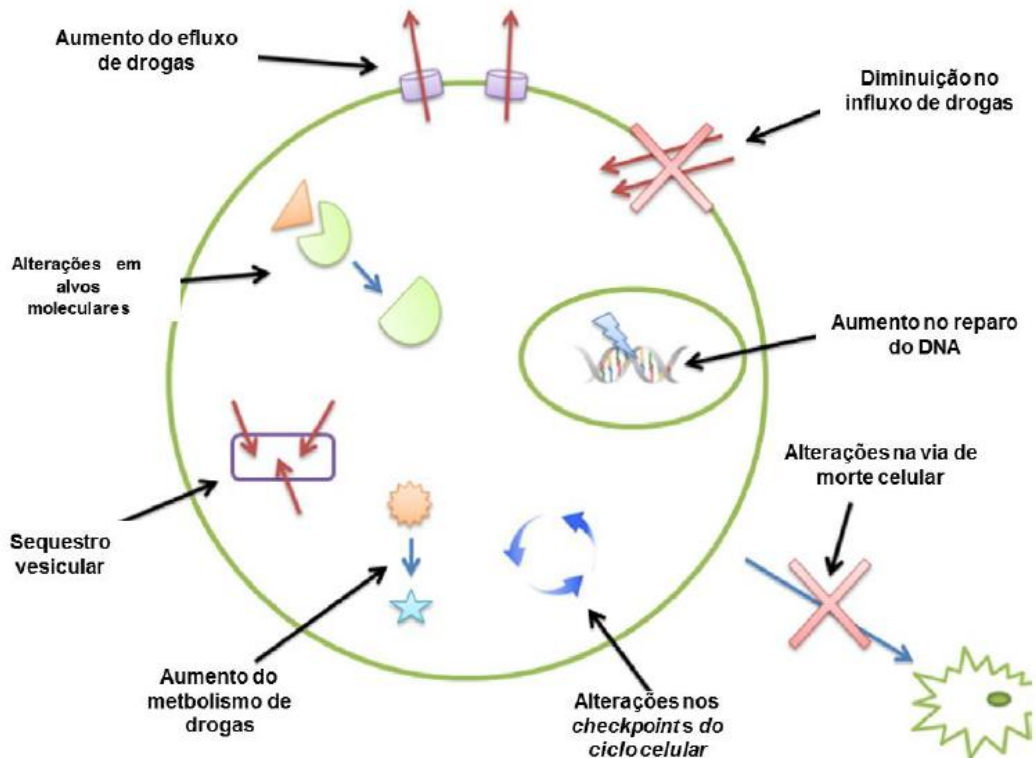


FIGURA 2: Mecanismos de resistência às drogas.

Células neoplásicas podem evadir ao tratamento com quimioterápicos, através do aumento do efluxo de drogas, diminuição do influxo de drogas, aumento nos mecanismos de reparo do DNA, alterações na via de morte celular, alterações nos *checkpoints* do ciclo celular, aumento do sequestro vesicular ou aumento do metabolismo de drogas. (Adaptado de GONG *et al.*, 2012).

2.6 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL

A transição epitélio-mesenquimal (TEM) é um processo no qual as células perdem adesão célula-célula, perdem a polaridade e transitam para células mesenquimais com interações celulares reduzidas e capacidade migratória aumentada. A TEM é caracterizada pelo aumento de marcadores mesenquimais como Vimentina, Snail, Slug, β -catenina e perda de marcadores epiteliais como E-caderina (TURLEY *et al.*, 2008; BOWEN DU, *et al.*, 2016).

O processo de TEM está correlacionado com o remodelamento da matriz extracelular, alterações no estroma, angiogênese, invasão, migração e infiltração de células imunes. O sistema imunológico tem papel fundamental na prevenção da progressão do câncer, ele é funcional na linha de defesa contra o desenvolvimento tumoral, demonstrando recentemente, eficiência na imunoterapia para alguns tipos de tumores. Contudo, o sistema imunológico também pode contribuir para o desenvolvimento tumoral através da inflamação crônica, associada ao aumento do risco de câncer. Um tumor estabelecido pode também estimular uma reação inflamatória que leva ao recrutamento de uma gama de populações celulares do infiltrado imune no microambiente tumoral (GOSENS, et al., 2017). Assim, TEM e inflamação envolvem uma série de redes de sinalização complexas e dinâmicas, entre diferentes componentes celulares da massa tumoral, através da atividade de diversos imunomediadores como citocinas e quimiocinas (DOMINGUEZ et al., 2017).

Snail é considerado um fator de transcrição chave como regulador de TEM, bem como Slug (LAMOUILLE S et al., 2014). Esse marcador mesenquimal é um dos principais repressores transcricional de E-caderina, por ligação na região proximal do promotor de E-caderina, tendo um papel fundamental na progressão tumoral. Snail induz o tráfego intratumoral de células supressoras derivadas de mielóides, por meio da regulação positiva dos ligantes de CXCR2, além de induzir outras células imunossupressoras como células T (PEINADO, et al. 2007; KUDO-SAITO, et al. 2009). E-caderina desempenha um papel na supressão da invasão tumoral e sua função é necessária para a manutenção de junções aderentes estáveis e para a polaridade das células epiteliais (PEREZ-MORENO et al, 2003). A expressão alterada desse marcador epitelial está correlacionado com a dediferenciação celular, aumento de invasão local e doença metastática em diferentes tipos de câncer, como, mama, gástrico e cólon (JAWHARI, et al. 1997; JEFFERS, et al. 1997; HUIPING, et al. 2001). O bloqueio de CXCR2 parece ser uma estratégia promissora, visto que essa inibição suprimiu o recrutamento de células supressoras para o tumor e inibiu a progressão, desacelerando TEM. Snail está amplamente relacionado à imunidade tumoral, regulando positivamente a expressão de quimiocinas, como CXCL1 e CXCL2, melhorando a infiltração de células supressoras no tumor, via CXCR2, inibindo a imunidade antitumoral e

promovendo a progressão (TAKI, et al. 2018). Essas quimiocinas funcionam como fatores de crescimento, ativando através do seu receptor, CXCR2, fatores de transcrição como Snail, induzindo assim, o fenótipo TEM, contribuindo para a progressão da doença. Ainda, Snail está envolvido na resistência a CDDP e PTX no CAO, além de estar envolvido nas vias de sinalização MAPK e PI3K, contribuindo para a resistência tumoral (KAUFHOLD & BONAVIDA, 2014).

Estudos têm investigado como a aquisição de características mesenquimais poderia contribuir para o desenvolvimento de um microambiente tumoral. Um estudo mostrou uma regulação positiva para CXCL8 em células submetidas à TEM, mostrando expressar níveis mais altos dos receptores CXCR1 e CXCR2, também em células de carcinoma colorretal (WANG *et al.*, 2011). Em outro estudo, foi demonstrado o papel da CXCL8 no contexto de TEM, mostrando que o bloqueio de CXCR1 diminui a migração de células tumorais mesenquimatosas (BATES *et al.*, 2004). Dados de um estudo mostram que TEM envolve a expressão induzida de uma quimiocina específica, CXCL8, e seu receptor CXCR1, e que essas moléculas funcionam na migração quimiocinética e quimiotática das células após transição epitélio mesenquimal (BATES, et al 2004). Os autores afirmam ainda que, a indução da expressão de CXCL8 pelas células tumorais está associada ao processo de transição dessas células e outras vias de sinalização podem estar envolvidas na expressão de quimiocinas quando o receptor é inibido.

Nesse contexto, dentre os mecanismos moleculares que levam à TEM, podemos citar a ação de fatores de crescimento presentes no microambiente tumoral, os quais, já foram demonstrados induzir ou ativar uma série de fatores de transcrição nas células tumorais, dentre eles Snail e Slug supracitados (HEIDER; BEUG, 1998). O CXCR2 e seus ligantes podem também ser alvo terapêutico para tumores com alta expressão de Snail. Surgindo assim, a importância de estudar os protetores e promotores do tumor no sistema imunológico e no processo de transição epitélio-mesenquimal.

2.7 MICROAMBIENTE TUMORAL

O papel do microambiente tumoral tem sido reconhecido na progressão e metástase do câncer de ovário e muitos biomarcadores podem ser potenciais alvos terapêuticos e diagnósticos. As citocinas, bem como quimiocinas, podem

auxiliar nessa progressão como fatores de crescimento, promovendo a proliferação e angiogênese, bem como moduladores do sistema imunológico, favorecendo o crescimento tumoral e bloqueando mecanismos celulares que ajudam na identificação e destruição do tumor (LUO, et al., 2016, JONES et al., 2016, NASH et al., 1999, NILSSON *et al.*, 2005). Ainda, o microambiente tumoral pode modular a resposta das células tumorais ao fármaco, através da hipóxia, diminuição da geração de radicais livres e inibição da apoptose. As células estromais também podem influenciar a quimiorresistência através de vias de sinalização antiapoptótica (TOMIDA et al., 1999; AGARWAL e KAYE, 2003).

Em particular, a interação de quimiocinas e seus receptores medeiam o tráfego de células imunitárias no microambiente tumoral, resultando no recrutamento e ativação de diferentes tipos de células do sistema imune como, por exemplo, macrófagos e linfócitos. As células imunes que integram o microambiente tumoral sofrem um processo de cooptação pelas células tumorais, o que contribui para a angiogênese e proliferação. São descritos três estágios dessa cooptação pelas células imunes: o recrutamento dessas células via produção de citocinas e quimiocinas, a interação dessas células via secreção de citocinas, que regulam a diferenciação das células imunes no sentido de promover o tumor e a resposta imune em que essas células geram citocinas, fatores de crescimento e agentes promotores de proliferação (CHEN, et al. 2007; COUSSENS, et al. 2002, WHITESIDE, et al. 2008). Esse infiltrado de células imunes determinam o equilíbrio entre respostas antitumorais e pró tumorais (BALKWILL, 2012; COPERCHINI *et al.*, 2019).

Os receptores das quimiocinas e os seus ligantes são os principais responsáveis pela migração leucocitária nas condições de homeostasia, assim como durante a inflamação e carcinogênese. Estes fazem parte dos mecanismos moleculares envolvidos na sobrevivência, motilidade e invasão das células tumorais. Um exemplo, é o receptor de quimiocinas CXCR4, o qual é frequentemente superexpresso em células malignas e por diferentes tipos de tumores, como câncer colo-rectal, câncer da mama, fígado e esôfago e a sua expressão em tumores primários correlaciona-se com a frequência de metastização linfática (KAIFI et al.,2005; KIM et al.,2005; SALVUCCI et al.,2006)

CXCL6 é uma citocina inflamatória comumente produzida em resposta à infecção e estresse. No câncer, é uma das mais abundantes citocinas no microambiente tumoral, incluindo próstata, ovário, cólon e mama. Ela se liga ao seu receptor ativando a via de sinalização STAT3, estimulando então a proliferação, ativação de vias de sobrevivência, induzindo TEM, entre outras características que contribuem para a progressão tumoral (DOMINGUEZ *et al.*, 2017; ZIVKOVIC *et al.*, 2007; KORTYLEWSKI *et al.*, 1999).

CXCL8 é uma quimiocina secretada por macrófagos, células endoteliais e epiteliais, em resposta à infecção ou lesão tecidual, seu efeito é mediado através da sua ligação com seu receptor CXCR2. Essa quimiocina desempenha um papel crucial na proliferação, migração e sobrevivência celular. Sua superexpressão tem sido relacionada a uma variedade de tumores como pulmão, próstata, ovário, mama e melanoma (ABULAITE *et al.*, 2013; LESINA *et al.*, 2011; BOLLRATH *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2013 e GIRI *et al.*, 2001).

CXCL2 é um fator importante na quimiorresistência e migração do câncer de mama. Em um estudo, os autores mostraram que a expressão de CXCL2 aumenta à medida que as células adquirem fenótipo maligno e em resposta à Doxorubicina (DOXO) no câncer de mama (ACHARYYA *et al.*, 2012).

Diante do exposto e visto a importância dessas quimiocinas e seus receptores na progressão tumoral, se faz necessário entender melhor o papel desse complexo no câncer para contribuir no desenvolvimento terapêutico e diagnóstico.

2.8 PONTENCIAIS ALVOS ENVOLVIDOS NA PROGRESSÃO DO CAO V

Dados conduzidos por nosso grupo demonstraram por intermédio da análise de microarranjo de cDNA que quimiocinas secretadas no microambiente tumoral, como CXCL2 e CXCL8, estão superexpressas no câncer de ovário, e essas quimiocinas vêm ganhando notoriedade na pesquisa oncológica, por poderem desempenhar um papel crucial na quimiorresistência de células de CAO V (FIGURA 3) (GAO, *et al.* 2020).

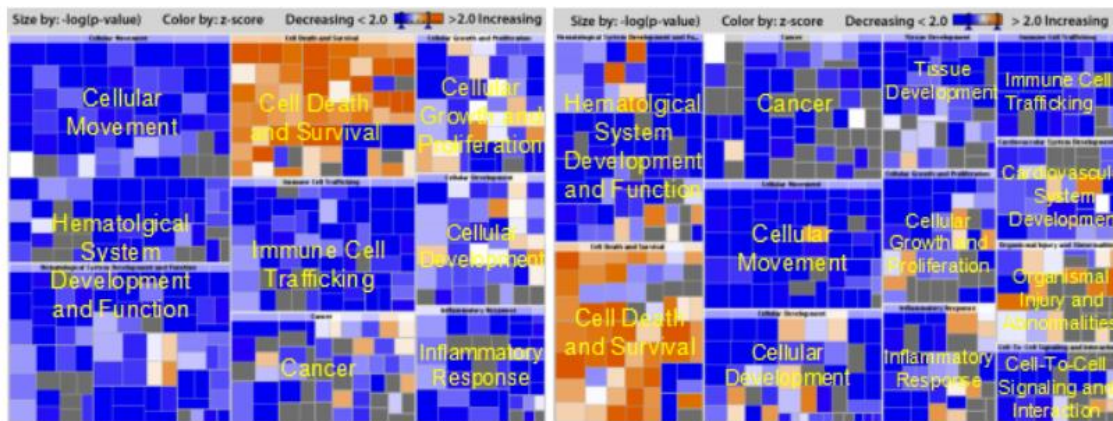


FIGURA 3: Identificação de novos alvos superexpressos em CAOv.

Mapas *tile* mostram tendências previstas das categorias de funções biológicas mais significativamente associadas. Cada quadrado no mapa representa uma função biológica específica e funções biológicas relacionadas são agrupadas em categorias maiores. O tamanho dos quadrados reflete o $-\log(P \text{ valor})$ das funções biológicas, com tamanhos maiores indicando maior significância estatística. A cor dos quadrados é graduada de laranja a azul, sendo laranja indicativa de um valor Z-score positivo (função biológica predita aumentada) e azul, valor Z-score negativo. As funções biológicas para as quais não foi possível prever uma direção baseada na base de dados *Ingenuity Knowledge Base* atual são mostrados em cinza. (GAO, et al. 2020).

CXCL2 e CXCL8 já foram relacionadas à quimiorresistência, migração e progressão em outros tipos de câncer como melanoma (GABELLINI *et al.*, 2009), cólon (OHRI *et al.*, 2010) e pulmão (REILAND *et al.*, 1999) (ACHARYYA *et al.*, 2012). O mecanismo de ação de CXCL2 e CXCL8 em suas células-alvo depende da interação com seu receptor específico, CXCR2, sabidamente correlacionado com funções como proliferação celular e aquisição do fenótipo quimiorresistente em cânceres humanos (BOLITHO *et al.*, 2010; AL-ALWAN *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2013). Todavia, as bases celulares e moleculares desse fenômeno seguem sem elucidação.

Ainda que CXCR2 tem sido associado a um mau prognóstico em diversos cânceres como cólon, pâncreas e melanoma, a sua função no CAOv não é totalmente clara. Deste modo, através dos dados encontrados no nosso grupo, o presente estudo focou no papel da ligação CXCL2/CXCR2.

2.9 RECEPTOR DA FAMÍLIA DE QUIMIOCINAS CXC – CXCR2

Muitos estudos até o momento mostraram que CXCR2 contribui para inflamação crônica, patologia pulmonar e é alvo de estudos na angiogênese, tumorigênese e

metástase em vários tipos de câncer como melanoma, colón, pulmão, ovário e próstata (GABELLINI *et al.*, 2009; OHRI *et al.*, 2010; REILAND *et al.*, 1999; BAIER *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2010). Evidências indicam através de estudos *in vivo* e *in vitro* que a infiltração metastática de órgãos distantes é mediado por quimiocinas e seus receptores, demonstrando que o bloqueio desse complexo, ligante e receptor, reduz o desenvolvimento de metástases em vários cânceres, como, mama (WILLIAMNS *et al.*, 2010), próstata (DARASH-YAHANA *et al.*, 2004), pulmão (SU *et al.*, 2005), colorretal (JUNG *et al.*, 2017) e gástrico (ZHAO *et al.*, 2011)

CXCR2 é um receptor de quimiocinas da superfície celular acoplada à proteína G, possuindo 7 domínios transmembranares, normalmente encontrado em neutrófilos, mas também é expresso em macrófagos, células endoteliais, células epiteliais e múltiplas células tumorais, podendo ser induzido por oncogenes ativados. A função de CXCR2 tem sido primeiramente estudada em leucócitos em associação com doenças inflamatórias e resposta imune (PETERING *et al.*, 1999; BOISVERT *et al.*, 2006).

Os receptores são denominados de acordo com o tipo de quimiocinas que se ligam a ele. A nomenclatura refere-se ao número de cisteínas, bem como sua posição. Sendo CXC, as duas cisteínas separadas por um aminoácido não conservado. Várias quimiocinas se ligam a esse receptor CXCR2, como CXCL1, CXCL2, CXCL6 e CXCL8 (BACON *et al.*, 2002; BAGGIOLINI *et al.*, 1994; MURPHY *et al.*, 2000).

A via de sinalização regulada por quimiocinas leva a uma variedade de respostas celulares como adesão, migração, quimiotaxia, entre outras. A ativação ou inibição da cascata a jusante ocorre através da ligação ao receptor associado à proteína G, com suas subunidades $\alpha\beta\gamma$ (FIGURA 4) (BAGGIOLINI *et al.*, 1998). CXCR2 está associado à via de PI3K e MAPK ligada a crescimento celular, sobrevivência e migração. (ZARBOCK *et al.*, 2008; KNALL *et al.*, 1996; VENKATAKRISHNAN *et al.*, 2000). Estudos conduzidos em melanoma humano, mostraram que a fosforilação de ERK1/2 está associada com a função de CXCR2 assim como a progressão tumoral em câncer de pulmão (YANAGAWA *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2009; DEVELARAJA *et al.*, 1999).

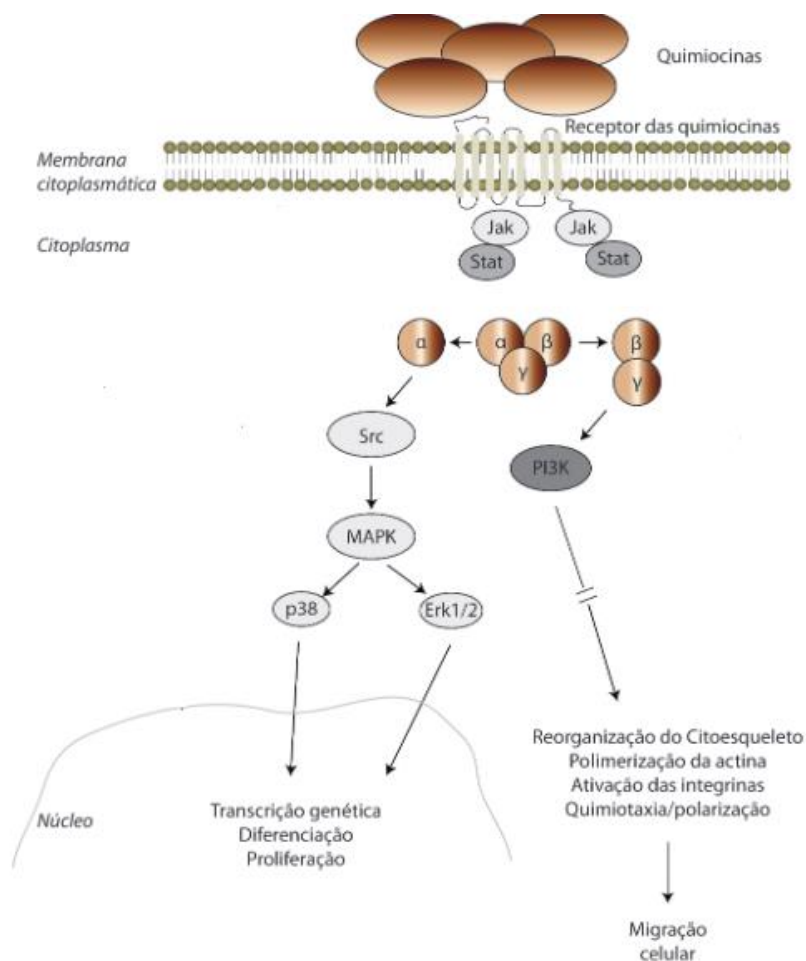


FIGURA 4: Mecanismos envolvidos na transdução de sinal de CXCR2.

A ligação de quimiocinas ao GPCR envolve a interação do N-terminal das quimiocinas com o N-terminal do receptor. Uma vez ocorrida a ligação do ligante, a proteína G associada é ativada e dissociada levando à ativação de uma série de vias de sinalização a jusante, responsáveis pela migração, proliferação entre outros. Abreviaturas: α , β e γ , subunidades da proteína G; Erk, Quinase sinalização regulada extracelular; Jak, Quinase Janus; MAPK, Proteína quinase ativada por Mitógeno (MAP); p38, p38 Proteína quinase ativada por Mitógeno; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; Stat, transdutor de sinal e ativador de transcrição. Imagem adaptada de Guerreiro *et al.*, 2011.

Evidências mostram que CXCR2 tem um papel importante na progressão do câncer de ovário, regulando o ciclo celular e apoptose por múltiplas vias de sinalização como, PI3K/AKT, NF- κ B, MAPK e STAT3. CXCR2 controla a apoptose suprimindo fatores pró-apoptóticos como, p53 e Bcl-xS, e aumentando proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (YANG. *et al.*, 2010).

As quimiocinas e seus receptores têm papel crucial nas doenças inflamatórias e esforços têm sido feitos para direcionar esse complexo em pacientes com doenças autoimunes e com inflamação crônica (NAGARCHETH et al., 2017; COPERCHINI et al., 2019). Como mediadores fundamentais da migração, quimiocinas e seus receptores, são de interesse para terapias com o intuito de reduzir a inflamação em vários contextos, como câncer e doença autoimune (ROTONDI et al. 2007, ROTONDI e CHIOVATO 2011).

Durante as últimas décadas, inibidores de CXCR1/2 e anticorpos foram desenvolvidos. Um estudo pré-clínico sugeriu que a associação de inibidores dos receptores com terapias combinadas pode ser eficaz no tratamento de tipos específicos de câncer (HA et al., 2017). Um exemplo, é o bloqueio do complexo CXCL8/CXCR1/2, regulando proliferação e auto-renovação de células tronco tumorais.

Antagonistas de CXCR2 tem sido desenvolvidos com o intuito de inibir vários tipos de crescimento tumoral. O tratamento de melanoma com SCH-479833 ou SCH-527123, mostrou diminuição no crescimento e na angiogênese (SINGH et al., 2009). SB225002, outro antagonista de CXCR2, (N-(2-hidroxi-4-nitrofenil)-N'-(2-bromofenil) ureia), é o primeiro inibidor não peptídico potente e seletivo relatado de um receptor de quimiocina (WHITE et al, 1998). *In vitro*, o SB225002 inibiu potentemente a quimiotaxia de neutrófilos humanos, induzida por CXCL8 e CXCL1 (SUZIKI et al, 1994). *In vivo*, o SB225002 bloqueou seletivamente neutrófilos induzidos por CXCL8 em coelhos (DOERSCHUK, et al 1992; MOTOSUGI et al, 1996). Esse inibidor pode também bloquear a proliferação de células de câncer esofágico, desativando a via de ERK1/2 (WANG et al., 2006). Este antagonista pode ser uma ferramenta útil para definir o papel do CXCR2 em doenças inflamatórias, onde os neutrófilos desempenham um papel importante (HAMMOND, et al. 1995; CHUNTHARAPI, et al 1995), podendo contribuir também para estratégias terapêuticas no câncer.

A terapia tendo como alvo os receptores de quimiocinas pode afetar o tráfego de diferente grupos celulares imunes, podendo modificar a atividade biológica das células imunes no microambiente tumoral, contribuindo para a inibição da progressão tumoral (NAGARSHETH et al., 2017). Diante desses dados e visto

que uma possível terapia combinada com outras drogas, moduladoras do sistema imunológico, pode levar a melhores resultados na terapia. CXCR2 pode ser um novo marcador prognóstico para o câncer de ovário e um potencial alvo para intervenção terapêutica. Nesse contexto, apontamos para a importância da modulação da expressão de CXCR2 na aquisição do fenótipo quimiorresistente por células de CAOV.

3 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o papel de CXCR2 e seus ligantes CXCL2 e CXCL8, em células de câncer de ovário seroso de alto grau, A2780 e resistente à cisplatina ACRP.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão gênica de CXCL8, CXCL2 e CXCR2 em células de CAOVS seroso de alto grau;
- Analisar a expressão gênica de CXCL8, CXCL2 em resposta à modulação da expressão de CXCR2 em células de CAOVS seroso de alto grau;
- Investigar o papel de CXCR2 no crescimento tumoral, invasão e angiogênese *in vivo* em modelo de membrana corioalantóica do ovo da galinha usando estratégia de silenciamento gênico em células de CAOVS seroso de alto grau;
- Analisar o papel de CXCR2 nos fenótipos proliferativos e quimiorresistentes em células de CAOVS seroso de alto grau;
- Correlacionar o silenciamento da expressão de CXCR2 com a viabilidade celular e proliferação das células de CAOVS seroso de alto grau;
- Analisar a ativação de vias sabidamente deflagradas por CXCR2, como as de PI3K/AKT/mTOR e MEK/ERK em células de CAOVS seroso de alto grau
- Avaliar o efeito da modulação da expressão de CXCR2 no fenótipo TEM em células de CAOVS seroso de alto grau.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido com duas linhagens celulares de CAOVS seroso de alto grau, A2780 e ACRP. Com o intuito de responder os objetivos propostos, realizamos os ensaios de viabilidade celular metabólica com a técnica de MTT, para avaliar a viabilidade das linhagens após tratamento com quimioterápicos. Posteriormente foi realizada a expressão gênica de CXCL2, CXCL8 e CXCR2, com tipo selvagem de CXCR2 e com silenciamento gênico, a partir de ensaio de interferência de RNA (siRNA) de CXCR2, através de PCR em tempo real, para avaliar o perfil de expressão das moléculas na linhagem parental, A2780, em comparação com a linhagem resistente, ACRP. Foi feito o ensaio de proliferação com a técnica de imunofluorescência, para avaliar o perfil proliferativo das linhagens após inibição de CXCR2. Para análise de TEM e vias de PI3K/AKT/mTOR e MEK/ERK, utilizamos a técnica de western blot, com o intuito de avaliar o papel de CXCR2 no fenótipo TEM e a possível relação de CXCR2 na quimiorresistência. O ensaio de formação de colônia, com coloração de cristal violeta, foi feito para analisar a viabilidade celular das linhagens com inibição de CXCR2, e por fim, para análise de invasão, crescimento tumoral e angiogênese, realizamos modelo *in vivo* da membrana corioalantóica do embrião da galinha, a fim de mostrar o papel de CXCR2 nos fenótipos carcinogênicos.

4.1 LINHAGENS CELULARES

Nesse projeto foram utilizadas as linhagens celulares de CAOVS, A2780 (Sigma) e ACRP (doação do NIH). As linhagens se encontram depositadas no BCRJ (<http://bcnj.org.br/>) e foram mantidas em meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma) suplementado com 0,2% de bicarbonato de sódio (p/v), 10% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell), 1% (v/v) de solução estabilizada de Penicilina (100 unidades/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), 1% (v/v) Solução Anfotericina B (Sigma) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Para fins de controle de qualidade, as linhagens utilizadas nesse trabalho foram submetidas a teste de micoplasma quando solicitadas no banco de células e posteriormente quando colocadas em cultura.

As linhagens utilizadas no estudo apresentam diferenciação quanto ao grau de resistência aos quimioterápicos CDDP, PTX e DOXO. A linhagem ACRP é

resistente à CDDP de forma induzida, enquanto que as células da linhagem A2780 não receberam qualquer tratamento a priori ao isolamento.

4.2 INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA

A indução de resistência á CDDP foi realizada em nosso laboratório, em células ACRP. As células após descongelamento e em confluência de cerca de 80%, foram expostas à CDDP em uma concentração de 1 μM por 24 horas, retirando o meio e acrescentando meio novo suplementado. Esperou-se as células recuperarem do choque de CDDP, até atingirem a confluência de 80% novamente para nova exposição. A indução seguiu-se com aumento gradativo da concentração de CDDP, até atingir a concentração máxima de 10 μM , a qual foi utilizada para manter a resistência.

4.3 ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA

Para cálculo da IC_{50} , concentração de droga que inibe 50% do crescimento das células, foi utilizado o método de determinação da viabilidade celular metabólica (VCM), por meio do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma) (RISS *et al.*, 2013). Brevemente, células de CAOv foram semeadas em placas de 96 poços na concentração 1×10^5 células/mL e incubadas por 24h nas condições padrão de cultivo descritas no item 4.1. Após a adesão celular, o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com os agentes quimioterápicos, CDDP, PTX e DOXO, em um gradiente de concentração que variou de acordo com a droga e a linhagem celular utilizadas (TABELA 2). Após o tempo de tratamento de 24h, os ensaios foram incubados com solução de MTT (concentração final 0,5 mg/mL) por 4h. Os cristais de tetrazólio formados foram dissolvidos em 100 μL de DMSO (P.A.) e a densidade óptica avaliada em 540 nm. Como controle negativo, utilizou-se o excipiente (PBS ou DMSO 2%) em volume igual ao volume de droga utilizado. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para o cálculo da IC_{50} utilizou-se o software GraphPadPrism versão 5.0.

Tabela 2: Concentrações dos quimioterápicos utilizados de acordo com a linhagem celular de CAOv e o tempo de tratamento para o cálculo da IC_{50} .

Linhagem celular	Quimioterápico	Faixa de concentração do quimioterápico (μM)
------------------	----------------	---

A2780/ACRP	Doxorrubicina	100 a 0,1 (diluição 1:10) – 24h de tratamento
	Cisplatina	100 a 3,125 (diluição 1:2)- 24h de tratamento
	Paclitaxel	10 a 0,0001 (diluição 1:10)- 24h de tratamento

4.4. SILENCIAMENTO GÊNICO

Os siRNA tendo como alvo CXCR2 foram adquiridos da Invitrogen (TABELA 3). O controle negativo utilizado foi o Stealth RNAi GC, da Invitrogen. Para os ensaios de transfecção, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços em concentração de $0,5 \times 10^6$ cels/ml. Para a transfecção foi utilizado 5 μ L/poço de Lipofectamine 2000 (Invitrogen), que foi diluída em 125 μ L/poço de meio Opti-MEM (Invitrogen) e incubados por 10 min. Nos experimentos de silenciamento gênico cada um dos siRNA foi utilizado na concentração final de 100pmol/mL, em 125 μ L de Opti-Mem (Invitrogen). Em seguida, o conteúdo do tubo contendo Lipofectamina com aquele contendo o siRNA foi misturado e realizado uma incubação de 20 min antes de adicionar o volume total de 250 μ L/poço do complexo com Lipofectamina em 750 μ L de Opti-MEM adicionado em cada poço. As análises por qRT-PCR para validação da técnica foram realizadas em 24h, 48h e 72h após a transfecção, para analisar o tempo mais promissor da inibição transiente do siRNA. O tempo determinado para todos os experimentos foi de 24h de transfecção. O silenciamento foi confirmado por qRT-PCR e analisado pelo software GraphPadPrism versão 5.0.

Tabela 3: Primers de RNA de interferência de CXCR2 utilizados no silenciamento gênico.

Gene	siRNA	Sequência (5' →3')
CXCR2	Stealth	UCUGGAAAGGUGAAGAUCUUAGUAA
		UUACUAAGAUCUUCACCUUUCAGAA
CXCR2	Stealth	CAAACUGGCGGAUGCUGUUACGGAU
		AUCCGUAACAGCAUCCGCCAGUUUG
CXCR2	Stealth	AAGGACCGUCUACUCAUCCAAUGUU

4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qRT-PCR)

O RNA total das amostras foi extraído pelo método do TRIZOL (Invitrogen). Brevemente, as células das linhagens A2780 e ACRP foram semeadas na concentração de $0,5 \times 10^6$ cel/mL e após 24h de aderência, as células foram recolhidas para ensaio ou então tratadas com siRNA controle e siRNA CXCR2, nas condições descritas na TABELA 4. Após 24h de tratamento, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS gelado. Em cada poço foi adicionado 600 μ L de TRIZOL e com auxílio de um mini-rodo, as células foram removidas da placa e transferidas para um tubo eppendorf. Em seguida, as amostras foram incubadas com TRIZOL em temperatura ambiente por 5 min. Após a adição de 200 μ L de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas vigorosamente por 15 segundos e incubadas novamente em temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13300 rpm a 4 °C por 15 min e as fases aquosas cuidadosamente transferidas para novo tubo, contendo igual volume de isopropanol 95%. As amostras foram então incubadas em temperatura ambiente por 5 min e novamente centrifugadas a 13300 rpm por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 70% gelado e novamente centrifugado. O RNA foi ressuspendido em água DEPC. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro Nanodrop Espectrophotometer ND-1000 (Nanodrop®).

Tabela 4: Condições experimentais utilizadas nas amostras para análise de expressão gênica por qPCR.

Linhagem celular	Condições Experimentais
A2780/ACRP	siRNA Controle 10 μ M
	siRNA CXCR2 10 μ M

Para a síntese da fita de DNA complementar utilizou-se o kit SuperScript II RT (Invitrogen) nas condições experimentais descritas na TABELA 5.

Tabela 5: Condições experimentais utilizadas para a síntese de cDNA

Reagentes	Condições experimentais	Tempo
RNA	1ug	
Random primer	100ng/ul	10 min – 65°C
H ₂ O	p/ vol. f. 8ul	
5xRT buffer	4ul	
DTT	2ul	60 min – 42°C
dNTP (10mM)	2ul	10min – 70°C
RnaseOUT	0,3 ul	
Superscript	0,5ul	∞ - 4°C
H ₂ O	3,2 ul	
	Vol.f 12ul	

Para a qRT-PCR, os níveis relativos de expressão dos transcritos foram avaliados utilizando o sistema Applied Biosystems® 7500 fast e quantificados pela intensidade da fluorescência de SYBR® green I (Invitrogen). Os primers utilizados nesse estudo estão descritos na TABELA 6.

Tabela 6: Primers utilizados na análise da expressão gênica por qPCR.

Gene	Iniciadores	Sequência (5' → 3')
<i>GAPDH</i>	Senso	CAGCCTCAAGATCATCAGCA
	Anti-senso	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT
<i>CXCL8</i>	Senso	GAGAAGTTTTTTGAAGAGGGCTG
	Anti-senso	AGTTTCACTGGCATCTTCACTG
<i>CXCL2</i>	Senso	GCTTGTCTCAACCCCGCA
	Anti-senso	TGGATTTGCCATTTTTTCAGCATC
<i>CXCR2</i>	Senso	TTGCAACCCAGGTCAGAAGTT
	Anti-senso	CAGCTGTGACCTGCTGTTATT

Foi realizado em todos os experimentos uma curva padrão em diferentes concentrações (1:5; 1:50; 1:500; 1:5000) para cada primer. Essa curva foi utilizada posteriormente nas análises dos dados. O cDNA foi diluído 1:20 vezes em água DEPC para utilização no ensaio (50ng). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada usando o método comparativo $\Delta\Delta CT$, utilizando como gene

de referência GAPDH, para normalização dos dados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As células das linhagens de CAO V foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL em placas de 6 poços em meio DMEM, suplementado, sob as condições de cultivo padrão citados no item 4.1. Após 24h de aderência, as células foram incubadas com siRNAs em meio Opti-MEM. Para extração de proteínas, as células primeiramente foram lavadas com PBS 1X, para remoção do excesso de meio de cultivo, removidas com auxílio de um mini-rodó e tampão de extração RIPA (Tris-HCL pH 7,4 50mM, NaCl 150mM p/v, 1% Triton 100X v/v, 0,5% Deoxicolato de sódio p/v e SDS 0,1% p/v) adicionado inibidores de fosfatase e proteases (SIGMA) (CAO, FENG *et al.*, 2005). As amostras foram incubadas por 15 min em gelo e em seguida, centrifugadas a velocidade máxima por 10min a 4 °C. O sobrenadante correspondente às proteínas totais foi armazenado a -80 °C, para posterior utilização. A dosagem das proteínas foi realizada pelo método BCA (Pierce BCA kit Thermo Fisher), em triplicata. A curva padrão foi construída utilizando os padrões do kit, em microplaca de 96 poços. Para o ensaio foram adicionados em cada poço, 1 µL da proteína, 4 µL de água e 100 µL do reagente BCA. A placa foi mantida a 37°C por 30 min e a leitura realizada em Leitor de Elisa (Bio-Rad) em absorvância de 562 nm.

4.7 WESTERN BLOT

A expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR e MEK/ERK e TEM foram analisadas nas linhagens de CAO V A2780 e ACRP, tratadas com siRNA (10uM) e SB225002(1ug/ml). O perfil das proteínas totais foi resolvido por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 10% (p/v) (LAEMMLI, 1970). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Trans-*Blot*[®] Bio-Rad) a 200 mA por 2h, no gelo, em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; metanol 20%) utilizando o sistema de transferência da BIORAD. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS-T (Tris-HCl 100mM; NaCl 1,5M pH 7,5 e 0,05% Tween 20 v/v) acrescido de leite em pó desnatado 5% (p/v) por 1h a temperatura ambiente ou BSA 5% (p/v) por 1h a temperatura ambiente e

posteriormente lavadas 3 vezes com TBS-T por 10 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (TABELA 6) a 4 °C overnight e posteriormente, lavadas três vezes com TBS-T por 10 minutos. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados anti-IgG, produzidos em coelho ou camundongo (1:10000 e 1:4000 respectivamente), por 1h em temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados foram diluídos em leite em pó 5% (p/v) diluído em TBS-T ou em BSA 5% (p/v) diluído em TBS-T.

As membranas foram reveladas por quimioluminescência utilizando o kit *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham), de acordo com o protocolo do fabricante. As membranas foram normalizadas utilizando os anticorpos monoclonais primários anti- β -actina, produzidos em camundongo e o anticorpo secundário conjugado anti-IgG camundongo. As imagens foram analisadas utilizando reagentes de revelação e fixação em sala escura em película.

Tabela 7: Descrição dos anticorpos primários utilizados na análise da expressão proteica.

Anticorpos	Fabricante	Diluição
AKT	Cell Signaling	1:1000
Fosfo-AKT	Cell Signaling	1:1000
ERK	Cell Signaling	1:1000
Fosfo-ERK	Cell Signaling	1:1000
SNAIL	Cell Signaling	1:1000
SLUG	Cell Signaling	1:1000
B- CATENINA	Cell Signaling	1:1000
VIMENTINA	Cell Signaling	1:1000
Actina	SIGMA	1:4000

4.8 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

Para o ensaio de formação de colônia, foi utilizado o protocolo adaptado de (FRANKEN *et al.*, 2006). Sucintamente, 150 células por poço das linhagens A2780 e ACRP, respectivamente, foram semeadas em placas de 6 poços. Após 24h de aderência, as células foram tratadas com siRNA controle, siRNA CXCR2, 5 μ M de

CDDP e 1/ug/ml de SB225002, por 10 dias. Após o período de tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e fixadas com formaldeído 4% (p/v). As células foram coradas com cristal violeta 0,1% (p/v) diluído em solução salina. Os experimentos foram realizados em triplicata e contados no programa Fiji-win64.

4.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

O ensaio de proliferação foi realizado através do método de BRDU, por imunofluorescência. As células foram plaqueadas em lamelas fixadas em placas de 12 poços em uma concentração de $0,3 \times 10^6$ cel/MI. Após 24h de aderência, as células foram transfectadas com siRNA CXCR2 e tratadas com inibidor de CXCR2, SB225002. Após 24h de tratamento o meio foi retirado e meio novo com diluição 1:1000/ml de BRDU foi acrescentado, sendo a placa, posteriormente incubada em estufa a 37°C por 1h. A placa então foi lavada duas vezes com PBS 1X e as lamelas foram fixadas com Metanol 20% gelado por 10 minutos em gelo. Posteriormente, foram lavadas com PBS 1X e as lamelas então foram retiradas para Imunofluorescência.

As lamelas foram lavadas com PBS 1X, 3 vezes por 5 minutos, em seguida foram tratadas com HCL 2M à temperatura ambiente durante 20 min para desnaturação do DNA, foram então lavadas novamente com PBS 1X, durante 5 min por duas vezes. A incubação com anticorpo monoclonal anti-BRDU de camundongo (DAKO) foi realizada a temperatura ambiente por 1h. O anticorpo foi diluído 1:10 em PBS-0,5% (v/v) Tween20-0,05% BSA (p/v). Posteriormente à incubação, as lamelas foram lavadas com a solução de diluição duas vezes por 10 minutos, seguida de incubação do anticorpo secundário anti-camundongo Alexa fluor 594 (Life Technologies), diluído 1:100 na mesma solução, por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Em seguida foram lavadas novamente por duas vezes em 10 min. Uma incubação de 15 min foi realizada para DAPI em uma diluição de 1:100 em PBS 1X em temperatura ambiente. Posteriormente as lamelas foram lavadas em PBS 1X e montadas em lâmina com 3ul de meio de montagem vectashield. Deixando secar em temperatura ambiente e guardando a -20°C para conservar a fluorescência até momento de análise. A análise foi

realizada em microscopia de fluorescência Zeis Z1 Apotome da LEICA e posteriormente contadas no software Fiji-win64.

4.10 ENSAIO DE INVASÃO, CRESCIMENTO E ANGIOGÊNESE DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DO OVO DA GALINHA (CAM)

O modelo de membrana corioalantóide de embrião de galinha (CAM) foi utilizado para avaliar as respostas angiogênicas e tumorigênicas nas linhagens A2780 e ACRP. Resumidamente, os ovos de galinha fertilizados (*Gallus gallus*) obtidos de fontes comerciais, foram incubados horizontalmente a 37,8 ° C em atmosfera úmida e encaminhados ao dia embrionário (E). No dia E3, uma janela foi aberta na casca do ovo após a remoção de 2-2,5 ml de albumina para permitir o descolamento da CAM em desenvolvimento. A janela foi selada com uma fita adesiva transparente e os ovos voltaram para a incubadora. Colocaram-se 10 µL de suspensão celular (1 milhão de células) na CAM em um anel de silicone de 3 mm sob condições estéreis. As células foram plaqueadas em concentração de $0,9 \times 10^6$ cels/ml em placas de 6 poços, transfectadas com siRNAs por 24 horas e posteriormente levadas para incubação na CAM. Os ovos foram selados novamente e retornaram à incubadora por mais 4 dias. Foram utilizados 5 ovos por condição, sendo essas condições: A2780 siRNA controle, A2780 siRNA CXCR2, ACRP siRNA controle e ACRP siRNA CXCR2 (10µM). Após a remoção do anel, a CAM foi excisada dos embriões, fotografada *ex ovo* sob um estereoscópio, com ampliação de 20x (Olympus, SZX16 acoplada a uma câmera DP71). O número de novos vasos (com menos de 20µm de diâmetro) crescendo radialmente em direção à área do anel foi contado de uma maneira cega para análise da angiogênese. A área da CAM foi determinada usando o software CellSens Standart (Olympus) para análise do crescimento tumoral e as membranas foram incluídas em cassetes e posteriormente adicionadas em formol para processamento e inclusão no bloco de parafina, posteriormente sendo realizados cortes em lâminas para realização de coloração em hematoxilina e eosina para análise de invasão. As fotos da invasão foram realizadas por câmera acoplada ao microscópio óptico em um aumento de 100X. O programa GraphPad Prism versão 5.0 foi utilizado para análise de dados. Um

teste de Mann-Whitney foi usado para calcular a significância entre as linhagens celulares parental e silenciadas.

4.11 TÉCNICA DE COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA (HE)

As lâminas com corte dos blocos de parafina descritos anteriormente, foram colocadas para secar em estufa a 37°C overnight. Após a secagem, foi realizado a desparafinação em xilol por duas vezes de 10 min, posteriormente foram passadas para álcool 100% por duas vezes durante 3 min, seguida de álcool 70% por 3 min, para hidratação. As lâminas foram lavadas em água corrente por 5min para coloração em hematoxilina de Mayer por 1min seguidas de lavagem por água corrente por 5min novamente. Posteriormente, as lâminas foram adicionadas em eosina por 3 min, passando então para lavagem em álcool 95%, para desidratação por duas vezes de 3 min e em Alcool 100% duas vezes por 3 min. Para finalizar, as lâminas foram transferida para o xilol em duas etapas de 3 min, para fixação do corante. Foi então, montadas com lamela e meio de montagem, deixando secar para análise a microscópio.

4.12 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

Uma análise *in silico* foi realizada para correlacionar a taxa de sobrevida das pacientes com CAOVS seroso de alta grau, com a expressão de CXCR2, CXCL2 e CXCL8. Os dados do TCGA de 370 pacientes, foram obtidos no The Cancer Genome Atlas Program, com relação à idade, tipo histológico, estágio da doença e informações de sobrevida. Foi realizado um tabela de Excel de todos os dados obtivos, para realização da curva de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier. A curva for realizada no software SPSS17.0. A análise estatística foi feita através do teste long rank.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicatas ou quadruplicatas biológicas. Análises para identificar diferenças estatísticas entre dois grupos experimentais foram realizadas através de Teste t de Student não-pareado. Adicionalmente, as análises para identificar diferenças estatísticas entre três ou mais grupos em experimentos com uma

variável foram realizadas através de análise de variância (ANOVA) de uma via. Análises para identificar diferenças estatísticas entre três ou mais grupos em experimentos com duas variáveis foram realizadas através de ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Os testes estatísticos utilizados em cada um dos experimentos estão indicados na legenda das figuras. Um valor $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (* indica $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$). As análises foram realizadas no *software* GraphPadPrism v.5 para Windows (versão 5.00.288).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ENTRE AS LINHAGENS DE CAO V

A comparação da resistência às drogas CDDP, PTX, DOXO, entre as linhagens A2780 e ACRP, foi avaliada pelo método de MTT, calculando o valor da IC₅₀ para CDDP, PTX e DOXO (TABELA 2). Ambas as linhagens celulares apresentaram diferenças significativas na resistência aos quimioterápicos testados (TABELA 8).

Em relação à eficácia das drogas, CDDP apresentou maior eficácia na linhagem A2780 quando comparada com ACRP, com uma IC₅₀ de 7,3µM contra uma IC₅₀ de 26,56µM da ACRP, mostrando, portanto, uma resistência 3,64 vezes maior à CDDP na linhagem ACRP em relação à parental A2780. CDDP foi o quimioterápico utilizado para indução da resistência (FIGURA 5).

Tabela 8: Valor das IC₅₀ estimadas nas linhagens A2780 e ACRP.

Quimioterápico	IC ₅₀	IC ₅₀ *
	A2780	ACRP
Cisplatina 24h	7,3 µM	26,56 µM
Paclitaxel 24h	0,022 µM	1,7 µM
Doxorrubicina 24h	0,07 µM	1,5 µM

Embora cisplatina seja o agente quimioterápico de primeira escolha para o CAO V, verifica-se que algumas células desenvolvem resistência adquirida ao fármaco, enquanto outras células são intrinsecamente resistentes. Essa resistência pode levar à falha terapêutica. Cerca de 70% das pacientes inicialmente respondem à CDDP, porém a maioria adquire resistência e outras sofrem recidiva após meses, não respondendo mais ao tratamento com CDDP (TUMMALA *et al.*, 2005; AGARWAL *et al.*, 2003). Os mecanismos pelos quais a quimiorresistência se estabelece são múltiplos, como expressão desregulada nas vias de morte celular, aumento no reparo de DNA, entre outros (KELLAN *et al.*, 2007; KUO *et al.*, 2007).

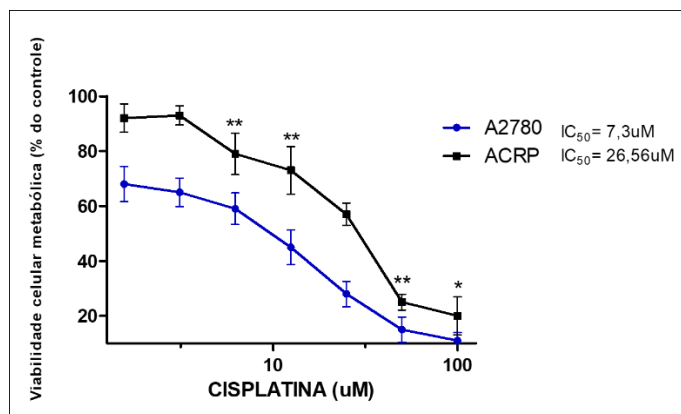


FIGURA 5: Geração de células pan-resistentes (ACRP) de câncer de ovário seroso de alto grau a partir de sua linhagem parental sensível (A2780). Foi utilizado o quimioterápico Cisplatina (1,5uM – 100uM). A IC₅₀ foi estimada pelo ensaio de MTT após 24h de tratamento. O resultado está representado como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média e desvio padrão (n=3). A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni. * p≤0,01; **, p≤0,005.

As células de CAOVS podem apresentar resistência intrínseca ou adquirida às drogas citotóxicas e uma estratégia terapêutica amplamente utilizada e alvo de novos estudos é a associação de fármacos de diferentes classes, ou ainda a quimioterapia de segunda escolha. Embora o CAOVS seja responsivo à múltiplos fármacos, com uma resposta satisfatória em 80% dos casos, quando empregada quimioterapia à base de platina e taxano, 75% das pacientes sofrem recidiva dentro de 2 anos após terapia primária. Existem várias questões em relação às estratégias baseadas em evidências de tratamento para pacientes com CAOVS recorrente como, tempo de terapia e escolha dos agentes quimioterápicos em mono ou politerapia (TUMMALA *et al.*, 2005; AGARWAL *et al.*, 2003). Para avaliar se houve resistência cruzada com outros agentes quimioterápicos, foram utilizados os agentes PTX e DOXO.

Os resultados para PTX, as células ACRP apresentaram uma resistência 77,27 vezes maior comparada a linhagem parental A2780, e para DOXO as células apresentaram 21,42 vezes maior resistência na ACRP em relação a parental A2780 (FIGURA 6) . Esses resultados mostram que a linhagem resistente à CDDP, ACRP, é uma linhagem pan-quimioresistente. A resistência cruzada aos medicamentos antineoplásicos usados na clínica para CAOVS, como observado em nossos experimentos *in vitro*, sustentam o desejo de elucidar os mecanismo de

aquisição de quimiorresistência pelas células de câncer de ovário e abre caminhos para investigar novas estratégias para superar esse desafio científico e clínico.

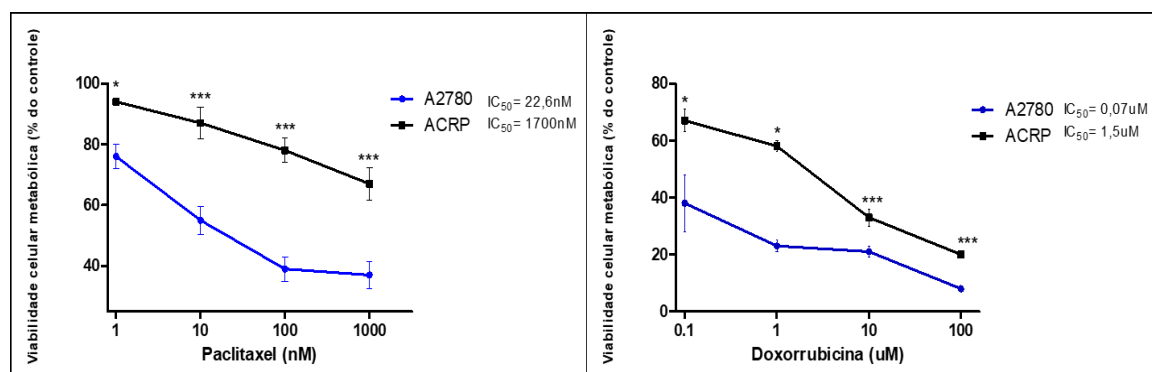


FIGURA 6: Geração de células pan-resistentes (ACRP) de câncer de ovário seroso de alto grau a partir de sua linhagem parental sensível (A2780). Foram utilizados os quimioterápicos, Paclitaxel (1nM-10nM) e Doxorubicina (0,1uM – 100uM). A IC₅₀ foi estimada pelo ensaio de MTT após 24h de tratamento. Os resultados estão representados como a porcentagem em relação ao controle (células não-tratadas) como média e desvio padrão (n=3). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni. * p≤0,01, ***p<0,001

A escolha de segunda linha de terapia depende de alguns fatores, como intervalo livre de platina, efeitos colaterais persistentes após tratamento anterior, perfis de toxicidades das próximas terapias e preferência do paciente, podendo nem sempre ser um tratamento benéfico. De acordo com a definição da quarta reunião internacional de consenso do câncer de ovário, a recorrência foi caracterizada em quatro categorias diferentes, refratárias à platina, resistentes, parcialmente sensíveis e totalmente sensíveis (FRIEDLANDER et al. 2011; PIGNATA, et al. 2017; LINDEMANN, et al. 2018)

Pacientes resistentes representam um grupo muito heterogêneo, com vários comportamentos biológicos de tumores, sendo essa uma condição desfavorável. Um estudo descobriu que PTX e DOXO oferecem taxas de resposta objetiva, diferentes perfis de toxicidade e sobrevida global de aproximadamente 12 meses (LIHUA et al. 2008). De acordo com nossos resultados, a escolha desses dois fármacos para pacientes resistentes à platina pode não ser tão benéfica, devido à resistência cruzada.

A resistência intrínseca ou adquirida pelas células neoplásicas à diferentes classes de quimioterápicos, que não estão relacionados em sua estrutura ou função, é classicamente definida como o fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR). A MDR foi inicialmente identificada entre o final da década de 60 e década de 70, quando alguns estudos verificaram que células neoplásicas apresentavam resistência cruzada à antibióticos e quimioterápicos (KESSEL *et al.*, 1998; KESSEL & WODINSKY 1968; BIEDLER & RIEHM 1970). A resistência a várias classes de agentes antitumorais tem sido sugerida como envolvendo o acúmulo e/ou retenção de medicamentos, alteração e/ou superprodução da enzima alvo e redução ou aumento do catabolismo do medicamento. Estudos pioneiros referidos acima, estabeleceram que o acúmulo reduzido de drogas nas células tumorais é um grande mecanismo de resistência a quimioterápicos importantes, como as antraciclinas. A superexpressão de glicoproteína P (gp-P) em células resistentes, que medeia o efluxo de drogas, é responsável por essa redução (LING e THOMPSON, 1974). A inibição da atividade de gp-P tornou-se uma estratégia muito procurada para superar essa resistência. As células que exibem o fenótipo MDR podem se tornar responsivas à quimioterapia após o tratamento com os agentes de reversão de MDR, como antagonistas da calmodulina, bloqueadores dos canais de cálcio e anestésicos locais (SIKIC, 1993). Muitos estudos avaliaram esses agentes moduladores de MDR, porém apresentaram alta toxicidade, não sendo aprovados para a prática clínica (DALTON, et al. 1995; FISHER, et al. 1996, Revisado por ROBAK, et al. 2018). Diante do exposto faz-se necessário estudo de novos alvos para a terapia do câncer, principalmente de pacientes que apresentem o fenótipo quimiorresistentes e não respondem mais ao tratamento proposto.

Conforme os nossos resultados apresentados e de acordo com a literatura apresentada, a terapia padrão com CDDP e a escolha de outro fármaco para o tratamento após adquirir resistência à CDDP, mostrou-se ineficaz na ACRP, sugerindo a importância de estudar novos alvos terapêuticos para contribuir com o sucesso do tratamento. CXCR2, bem como seus ligantes, CXCL2 e CXCL8, estão aumentados em células resistentes quando comparados com células

parental, sugerindo que esse receptor pode ter um papel essencial na resistência ao quimioterápicos (SHARMA *et al*, 2013, SHARMA *et al*, 2016).

Ainda, um estudo apontou para o papel de CXCR2 nos efeitos colaterais causados pelo quimioterápico de primeira escolha para CAO, CDDP, mostrando uma associação do aumento de CXCL1 e CXCR2 após tratamento, com uma nefrotoxicidade, causada pela exposição a CDDP. Os autores mostraram que a inibição da sinalização de CXCL1/CXCR2, reduziu os danos renais após tratamento, regulando respostas inflamatórias induzidas por CDDP, sugerindo seu papel na patogênese da lesão renal aguda, induzida por CDDP e talvez um novo alvo terapêutico para a doença (LIU, *et al*, 2020). Diante do exposto e pela escassez de dados na literatura, seguimos com o proposto em avaliar a modulação da expressão de CXCR2 em diferentes fenótipos no câncer, nas células de CAO seroso de alto grau sabidamente resistente ACRP e na parental A2780.

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CXCL2, CXCL8 E CXCR2 EM TIPO SELVAGEM E SILENCIADO DE CXCR2 EM LINHAGENS CELULARES DE CAO

Como mencionado anteriormente, dados do nosso laboratório gerados por microarranjo de cDNA revelaram que as quimiocinas, CXCL2 e CXCL8 são secretadas por células de CAO e provavelmente correlacionam com a aquisição do fenótipo quimiorresistente de células tumorais (dados não publicados). Intrigados com esse resultado, procuramos investigar esse novo mecanismo, possivelmente subjacente à resistência à CDDP, frequentemente observado em CAO. Para isso, inicialmente realizamos experimentos de PCR em tempo real para avaliar a expressão dos transcritos CXCR2, CXCL2 e CXCL8 em células A2780 e ACRP com CXCR2 selvagem e CXCR2 silenciado (siRNA CXCR2).

A linhagem resistente ACRP apresentou 2,3 vezes maior expressão do transcrito CXCR2 em relação à expressão na linhagem parental A2780, mostrando um aumento significativo da expressão desse receptor nas células resistentes quando comparada com as células parental ($p=0,0342$) (FIGURA 7). Mostrando que esse receptor pode estar relacionado ao fenótipo quimiorresistente e ter um papel importante na sua expressão.

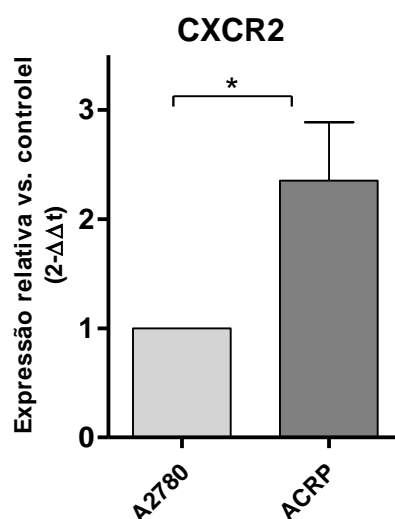


FIGURA 7: Análise da expressão de mRNA por qRT-PCR nas linhagens A2780 e ACRP. A expressão gênica foi apresentada como expressão relativa do gene de interesse em relação ao controle, após normalização pela expressão do gene GAPDH e calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O experimento foi realizado em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t-Student* não pareado. * $p=0,0342$.

Após a análise da expressão gênica de CXCR2 nas linhagens, foi feita a análise do nível do transcrito para validar a modulação da expressão de CXCR2 através do método de silenciamento gênico por RNA de interferência. A FIGURA 8 compara as linhagens A2780 e ACRP transfectadas com siRNA controle negativo e com siRNA de CXCR2. As linhagens apresentaram uma diminuição significativa, de aproximadamente 50%, da expressão de CXCR2 após 24 horas da transfecção. A expressão de CXCR2 foi 1,3 vezes menor em ACRP com siRNA CXCR2 quando comparada com A2780 siRNA CXCR2, sugerindo uma possível correlação entre a expressão do receptor e aquisição do fenótipo quimiorresistentes à CDDP nas células de CAO. Nossos resultados podem ser corroborados com dados da literatura que realizaram o silenciamento gênico de CXCR2, apresentando 50% de redução da expressão do receptor (NANNURU, et al. 2011).

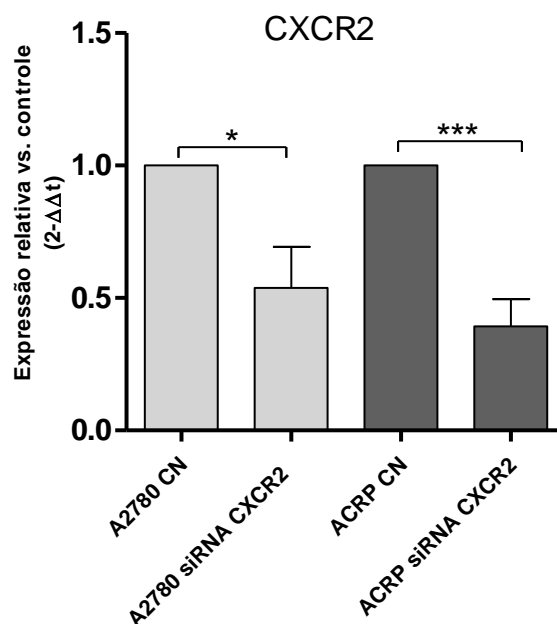


FIGURA 8: Análise da expressão de mRNA por qRT-PCR nas linhagens A2780 e ACRP. Foram utilizados 10 μ M siRNA controle negativo (CN) e 10 μ M siRNA para CXCR2 na transfecção nas células, em 24 horas. A expressão gênica foi apresentada como expressão relativa do gene de interesse em relação ao controle, após normalização pela expressão do gene GAPDH e calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O experimento foi realizado em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t-Student* não pareado. * $p=0,0246$ e *** $p= 0,0010$.

Posteriormente ao silenciamento gênico de CXCR2 e para explorar ainda mais o impacto da expressão de CXCR2 na quimiorresistência, avaliamos a expressão dos transcritos CXCL2 e CXCL8, ligantes de CXCR2, motivados pelo fato de serem secretadas, por células de CAOv quimiorresistentes, no microambiente tumoral.

As quimiocinas são de particular interesse na biologia do câncer visto que têm um papel no desenvolvimento de tumores e metástases, modificando a resposta imune tumoral, controlando a infiltração de leucócitos, servindo como fatores de crescimento e regulando a angiogênese (HANSSON et al, 2005; BELPERIO et al, 2000; GARTUNG, et al. 2019). Além disso, também estão relacionadas a migração celular (MOSER *et al.* 2004) e apoptose (JANES *et al.* 2005). Adicionalmente, as quimiocinas secretadas pelas células cancerosas e o estroma associado, desempenham um papel fundamental nos mecanismos de resistência aos medicamentos, por esses motivos se tornam de fundamental importância o

estudo do papel dessas quimiocinas do câncer (VISSER; JONKERS, 2009; PASQUIER, et al 2018; GARTUNG, et al. 2019).

Para CXCL2, a linhagem resistente ACRP apresentou uma alta expressão do transcrito e quando CXCR2 é silenciado nessa linhagem a expressão de CXCL2 diminuiu 2,5 vezes em relação a linhagem ACRP controle ($p= 0,0362$). Esse resultado pode ser corroborado com dados da literatura que mostram que sua expressão é maior em células resistentes e quando o receptor é inibido há uma diminuição na expressão dos ligantes de CXCR2 (KAVANDI et al, 2012; CHEN et al, 2018). Para CXCL8, nossos dados mostram uma diferença significativamente maior do que a encontrada em CXCL2, entre ACRP controle e ACRP com CXCR2 silenciado ($p=0,0025$). A expressão de CXCL8 diminuiu 6,5 vezes para a linhagem com silenciamento de CXCR2 quando comparada com as células controle. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem fortemente a ocorrência da ligação CXCL2/CXCL8-CXCR2 na modulação da sensibilidade à CDDP em CAO, corroborando assim com um papel central do microambiente tumoral e um potencial efeito autócrino das quimiocinas referidas no fenômeno estudado (FIGURA 9).

Podemos dizer que essas quimiocinas exercem uma retroalimentação positiva, como foi dito anteriormente, ou seja, as quimiocinas são secretadas no microambiente tumoral por células tumorais, contribuindo para a falha no tratamento e quimiorresistência. Além disso, estudos mostraram que a liberação de quimiocinas é aumentada após tratamento com quimioterápicos como, CDDP e PTX, sendo um fator crucial para a resistência das células tumorais e assim contribuindo para a progressão da doença (LIU, et al, 2020; SHARMA, et al 2013). Quando o receptor CXCR2 é inibido, essas quimiocinas passam a não se ligar mais, não sendo mais secretadas por essas células, diminuindo sua ação no microambiente tumoral e assim, aumentando a eficácia dos quimioterápicos e sensibilizando as células quimiorresistentes, podendo por fim, contribuir para diminuição da proliferação e progressão tumoral. Esses dados sugerem o papel que essa via de CXCR2 pode ter na quimiorresistência e que esse receptor pode ser alvo terapêutico para eficácia no tratamento do câncer de ovário seroso de alto grau.

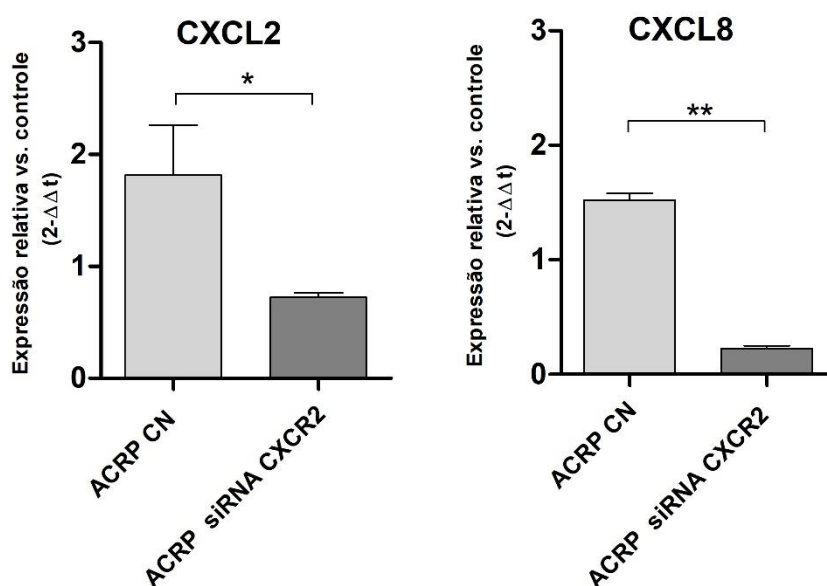


FIGURA 9: Análise da expressão de mRNA por qRT-PCR na linhagem ACRP para CXCL2 e CXCL8. Foram utilizados 10 μ M siRNA controle negativo (CN) e 10 μ M siRNA para CXCR2 na transfecção nas células em 24 horas. A expressão gênica foi apresentada como expressão relativa do gene de interesse em relação ao controle, após normalização pela expressão do gene GAPDH e calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O experimento foi realizado em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t-Student* não pareado. * $p = 0,0362$ e ** $p = 0,0025$ respectivamente.

De acordo com Yang, et al., (2010), através da análise da expressão proteica de CXCR2, as células de câncer de ovário apresentam alto nível de expressão do receptor, comparado com linhagens celulares da superfície epitelial do ovário normal (OSE72 e OSE137). CXCR2 também apresentou maior expressão em células resistentes, comparado a células tumorais sensíveis a sorafenib no CAO/V (DEVAPATIA, et al., 2015). Já no câncer de cólon as células tumorais apresentaram maior expressão de CXCL8 em comparação ao seu receptor CXCR2. Nesse estudo os autores associaram CXCL8 à migração, proliferação e angiogênese, mas não correlacionaram esses fatores com o CXCR2 (NING et al, 2011).

Um estudo investigou o mecanismo pelo qual a progesterona e o calcitriol, anteriormente associados a inibição do crescimento de células tumorais no câncer de ovário, inibem a expressão de genes inflamatórios, uma vez que esses genes são importantes na inflamação relacionada ao câncer. Assim, agentes como a progesterona e o calcitriol, podem regular negativamente a expressão de

quimiocinas com potencial contra a metástase. Nesse estudo a expressão de CXCL2 estava aumentada em células de CAOv em comparação a células normais, sendo essa expressão diminuída com a introdução dos agentes em estudo, corroborando com nossos dados. Os autores realizaram ainda a análise da expressão de CXCR2, apresentando expressão normal nas células tumorais quando comparado a células normais (KAVANDI et al, 2012). Esse estudo mostra o papel importante que CXCL2 pode ter na progressão e metástase do CAOv e a inibição do receptor CXCR2, foco do nosso estudo, pode ser uma estratégia eficaz para diminuição dessas quimiocinas no microambiente tumoral.

Um estudo comparando a expressão proteica intracelular de CXCL2 e CXCR2 e o nível de secreção de CXCL2 no sobrenadante de células de câncer de cólon parental e resistente, apresentou um nível de expressão aumentada de CXCL2 e CXCR2 nas células resistentes quando comparada com a parental, apresentando também maior secreção de CXCL2 em relação à parental (CHEN et al, 2018). Nesse mesmo estudo, os autores mostraram que a inibição de CXCR2, bem como sua ligação com CXCL2 resultou na supressão de genes associados a células tronco tumorais e carcinogênese, como o gene ALDH1 ligado à quimiorresistência, CD24 que contribui para mobilidade, TEM e tumorigênese, CD44 relacionado com a metástase e EpCAM que tem um papel na auto-renovação (DU et al, 2008; HUANG et al, 2009; OKANO et al 2014; LIN et al 2012).

Já em tumores de mama, um estudo mostrou que a expressão de CXCL8 e CXCR2 foi maior em células metastática, MDA-MB-231 e MDA-MB-468, em comparação a células não metastática, MCF-7 e SKBR3. O tratamento dessas células com PTX e DOXO, também mostrou um aumento significativo na expressão de CXCL8 de maneira dependente da dose, sugerindo que essa quimiocina pode ser crucial para fornecer resistência a essas células (SHARMA et al. 2013).

5.3 EFEITO DO SILENCIAMENTO DE CXCR2 EM LINHAGENS CELULARES DO CAOv POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Através dos dados encontrados, onde a expressão de CXCR2 está aumentada em células resistentes comparadas a células parental em nosso estudo, realizamos uma análise da expressão de CXCR2 em células resistentes, ACRP e parental,

A2780, com a modulação da expressão de CXCR2 por silenciamento gênico por imunofluorescência, para avaliar sua localização celular (FIGURA 10).

O resultado revelou a superexpressão de CXCR2 por células ACRP em comparação com células A2780, mostrando que CXCR2 pode levar à aquisição do fenótipo resistente à CDDP. Ainda, nosso resultado mostra uma expressão anômala de CXCR2 no núcleo celular. Apesar do fato que a relevância biológica da nossa observação precisa ser estudada, por se tratar de um dado inédito na literatura, é importante ressaltar que a quimiorresistência, bem como, a progressão da doença, pode ser causada ou agravada pela expressão anômala de CXCR2 no núcleo, principalmente em células resistentes a quimioterapia. Esse dado pode ser corroborado com o aumento da expressão de CXCR2 pelas células resistentes, ainda, pode sugerir que o silenciamento desse receptor no núcleo é capaz de diminuir a expressão de quimiocinas, na linhagem resistente, o que nos leva a acreditar que a localização subcelular desse receptor tem um papel fundamental nos fenótipos carcinogênicos.

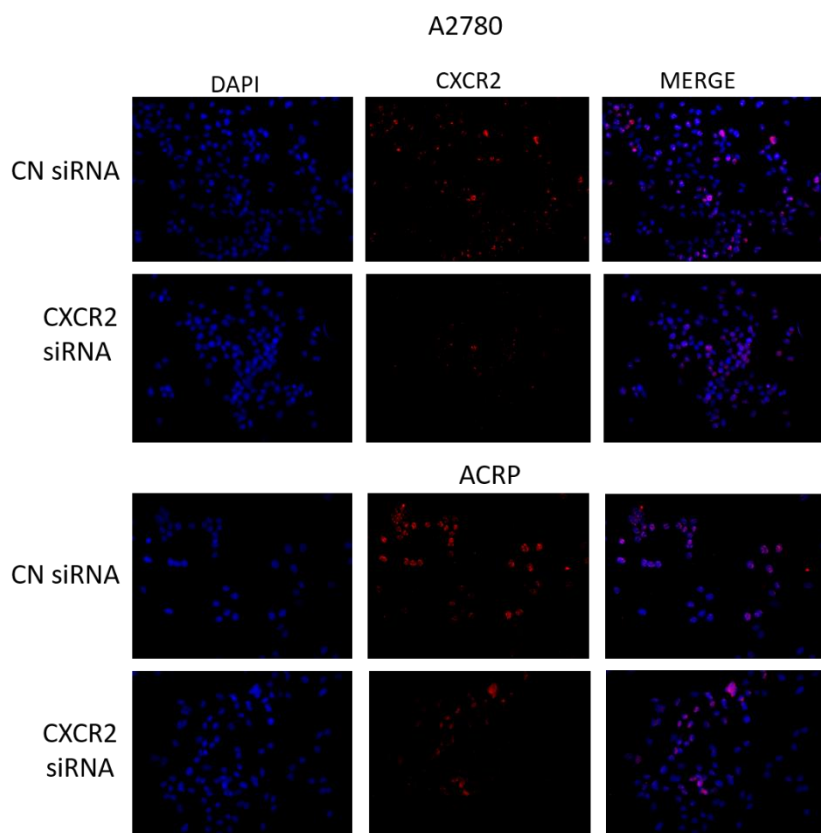


FIGURA 10: Análise da expressão de CXCR2 com silenciamento gênico de CXCR2 nas linhagens A2780 e ACRP por imunofluorescência. CXCR2 foi conjugado com anticorpo anti-CXCR2 (vermelho) enquanto os núcleos celulares foram corados com

DAPI (azul); as imagens foram posteriormente mescladas para facilitar a análise da localização celular. As células foram plaqueadas na mesma densidade (coluna esquerda da Figura). As imagens foram adquiridas com ampliação de 10x.

Um estudo recente com a proteína DEK, fator endógeno de cromatina de ligação ao DNA que regula a hematopoiese, mostrou que DEK se liga a CXCR2, pois ela contém os motivos ELR das quimiocinas, como CXCL8, para exercer sua função na regulação da hematopoiese. Hipotetizamos que a ligação de CXCR2 com essa proteína nuclear, DEK, pode ser a resposta da expressão anômala persistente de CXCR2 no núcleo, pois é uma proteína que exerce sua função no núcleo celular e de maneira dependente de CXCR2. De fato, estudos devem ser realizados para mostrar se DEK funciona como alvo para a localização nuclear de CXCR2 (CAPITANO, et al. 2019).

Diante desse resultado, seguimos com o proposto em avaliar o papel de CXCR2 em células de CAO, mostrando se sua expressão nuclear nas células resistentes pode contribuir também para a quimiorresistência e progressão da doença.

5.4 ANÁLISE *IN SILICO* DA SUPEREXPRESSÃO DE CXCR2 EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM CAO

Dados de 370 pacientes diagnosticada com CAO foram extraídos do banco de dados TCGA, e a informação da sobrevida global dessas pacientes foi obtida pelo método de Kaplan-Meier (TABELA 9). Os dados mostram a baixa expressão (n=95) e alta expressão (n=275) de CXCR2 realizada através da técnica de Microarranjo de cDNA. Os dados mostram que pacientes com alta expressão de CXCR2 apresentam significativamente um pior prognóstico de CAO e menor sobrevida em relação àquelas com baixa expressão de CXCR2 ($p=0,035$) (FIGURA 11). A taxa de sobrevida geral de pacientes que superexpressam CXCR2 foi de aproximadamente 50 meses, já aquelas com baixa expressão sobrevivem por cerca de 150 meses. Além disso, a superexpressão de CXCR2 foi identificada em 74,32% das pacientes estudadas.

Um estudo realizou essa análise e apresentou uma média de sobrevida de pacientes com superexpressão de CXCR2 de 38 meses, enquanto pacientes com baixa expressão apresentaram uma média de sobrevida de 56 meses. Este

estudo apresentou fortes evidências para o papel crítico de CXCR2 na progressão do câncer de ovário (YANG G., et al. 2010). A mesma análise foi feita em outros estudos como em adenocarcinoma de pulmão e carcinoma colangiocelular intra-hepático, resultando também em pior prognóstico e menor sobrevida em pacientes com superexpressão de CXCR2 (SAINTIGNY P; et al, 2013; SUEOKA H, et al., 2014).

Tabela 9: Informações clínicas para o CAO V do banco de dados do TCGA.

	Baixo CXCR2	Alto CXCR2
Total	95	275
Estadio I	1	0
Estadio II	5	16
Estadio III	72	216
Estadio IV	16	41
Idade Média	58	61
Sobrevida média	3,4 anos	2,7 anos

Adicionalmente, uma análise por estadio da doença foi realizada com os mesmos dados utilizados para sobrevida global no CAO V, avaliando os diferentes estadios da doença de pacientes com superexpressão e baixa expressão do receptor CXCR2. Esses dados sugerem que CXCR2 está envolvido com estadios avançados da doença, por haver maior taxa de superexpressão de CXCR2 em pacientes em estadio III e IV de CAO V (dados não mostrados).

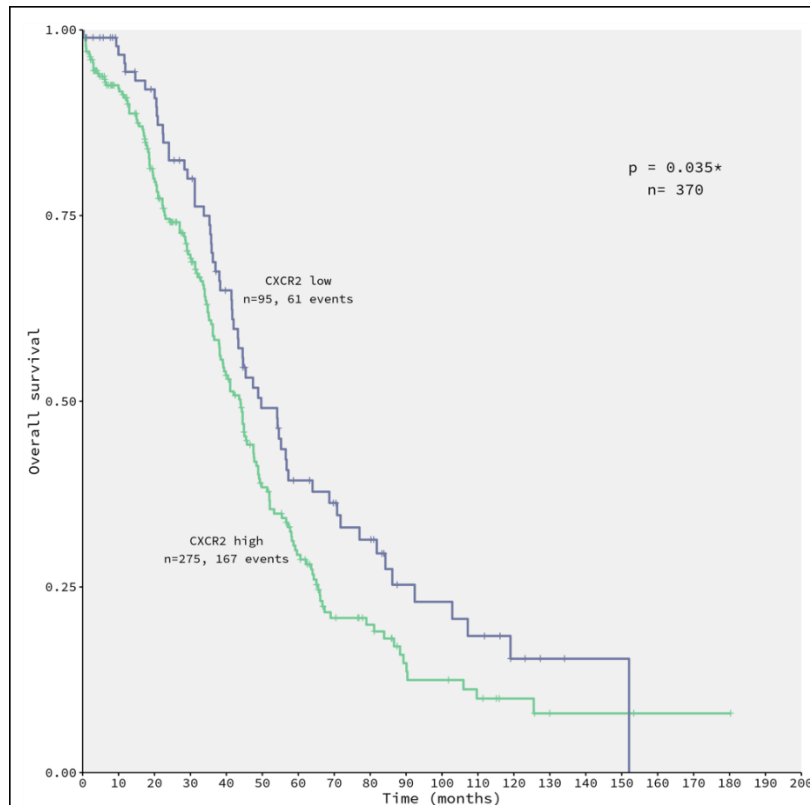


FIGURA 11: Correlação da superexpressão de CXCR2 com a pior taxa de sobrevida global para pacientes com CAOV seroso de alto grau. Dados de 370 pacientes foram extraídas do banco de dados TCGA para análise *in silico* da sobrevida global, usando o método de Kaplan-Meier. Foi realizado o teste long rank para analisar a diferença estatística entre os dois parâmetro investigados. $p= 0,035$.

A mesma análise foi realizada para os ligantes de CXCR2, CXCL2 e CXCL8, e não foram observadas diferenças estatísticas significativas em relação as pacientes com CAOV que apresentaram baixa expressão (n=109), ou alta expressão (n=261) para CXCL2 e nem para baixa expressão (n=102) e alta expressão (n=268) para CXCL8. No entanto, os dados mostram uma superexpressão de 70,54% e 72,43% de CXCL2 e CXCL8, respectivamente (FIGURA 12). Nossos resultados sugerem que as células de CAOV podem potencialmente secretar CXCL2 e CXCL8, que agiria autocrinamente no CXCR2, conferindo prognóstico desfavorável e menores taxas de sobrevida geral para portadores da doença. Tomando em conjunto, podemos postular que o CXCR2 emerge como um marcador e um potencial alvo terapêutico para CAOV.

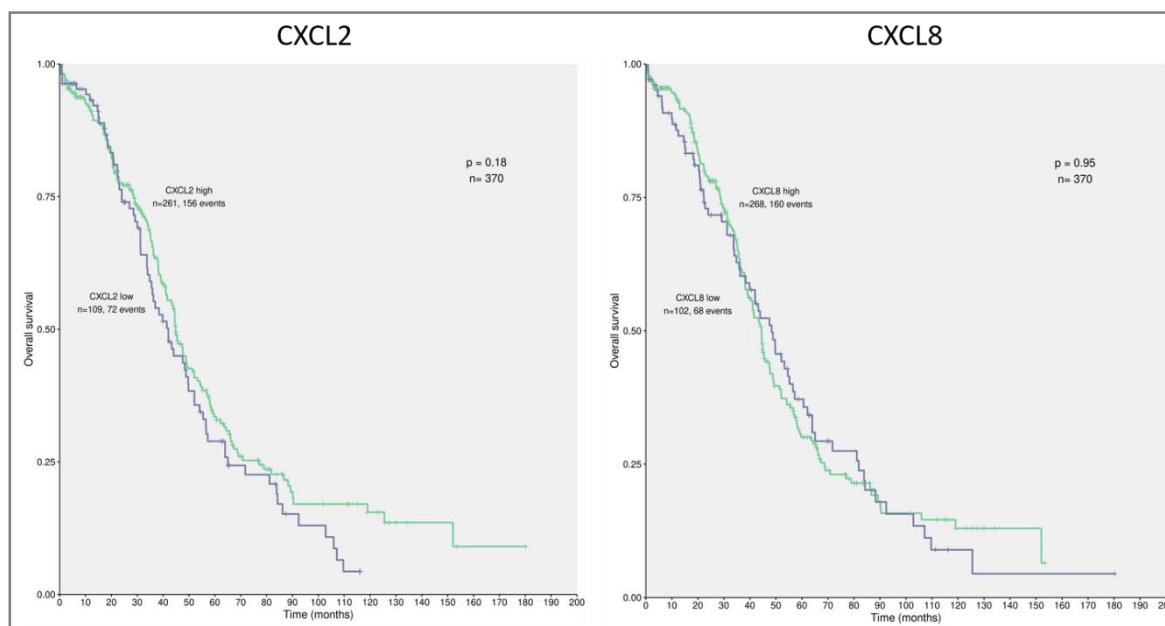


FIGURA 12: Superexpressão de CXCL2 e CXCL8 não correlaciona com a pior taxa de sobrevida global para pacientes com CAOV seroso de alto grau. Dados de 370 pacientes foram extraídas do banco de dados TCGA para análise in silico da sobrevida global, usando o método de Kaplan-Meier. Foi realizado o teste long rank para analisar a diferença estatística entre os dois parâmetro investigados $p= 0,18$ para CXCL2 e $0,95$ para CXCL8.

Dados de um estudo de meta-análise mostraram a alta expressão de CXCR2 relacionada à menor sobrevida global, sendo um fator de risco para o câncer. Nessa análise foram utilizados dados de 4 elegíveis estudos, reportando essa maior expressão de CXCR2 associada à menor sobrevida livre de recidiva. Esses resultados fortificam o fato de que a baixa expressão de CXCR2 prediz melhor eficácia da terapia (QIAO et al, 2018). Ainda nessa meta-análise, verificou-se uma menor sobrevida em pacientes com superexpressão de CXCR2 em câncer de células escamosas da laringe ($p=0,03$), câncer de pulmão ($p= 0.0005$), câncer de pâncreas ($p= 0,02$) e câncer renal de células claras ($p= 0,0004$), não sendo significativa somente para câncer do trato digestivo ($p= 0,46$). Outro estudo realizado por DESURMONT *et al*, (2015) também mostrou resultado semelhantes para câncer de cólon com metástase no fígado ($p= 0.002$). Nesse estudo, os autores correlacionaram também a pior sobrevida global com a superexpressão de CXCL8 ($p= 0.008$), correlacionando também, a pior sobrevida média livre da doença no grupo com alta expressão de CXCL8. Entretanto, em estudo conduzido em uma população asiática, com câncer esofágico, foi verificado que a

superexpressão de CXCR2 é um fator favorável ao prognóstico (LIANG et al, 2015). Porém, YANG et al, (2010) e NISHI et al, (2015), não relataram diferença entre baixo e alto nível de CXCR2, não encontrando diferença na sobrevivência e no prognóstico, resultando em uma heterogeneidade. Um estudo com CAOVS seroso de alto grau, assim como o nosso, mostrou que CXCL8 e CXCR2 apresentam correlação com maior grau do tumor, demonstrando também que CXCR2 foi significativamente associado com pior sobrevida, podendo esse ser um mediador importante para metástase de CAOVS (WEN, et al. 2020).

5.5 EFEITO DA INIBIÇÃO E SILENCIAMENTO DE CXCR2 NA PROLIFERAÇÃO EM LINHAGENS CELULARES DE CAOVS

Com o objetivo de provar que CXCR2 é uma molécula essencial na progressão de CAOVS, realizamos um ensaio para avaliar a capacidade proliferativa das células A2780 e ACRP através da imunofluorescência com BRDU. As células A2780 e ACRP foram transfectadas com vetor vazio para controle negativo, siRNA CXCR2 ou tratadas com o antagonista de CXCR2, SB225002.

Nossos resultados demonstraram uma diminuição significativa na proliferação celular em ambos modelos, siRNA CXCR2 e SB225002. De notar, a diminuição proliferativa na linhagem ACRP foi de aproximadamente 3,5 vezes e 2,0 vezes para A2780, em outras palavras, houve uma redução cerca de 50%. A proliferação celular foi menor na linhagem ACRP em relação a linhagem parental A2780, suportando, assim, o papel central de CXCR2 na progressão de CAOVS em relação à quimiorresistência. (FIGURA 13).

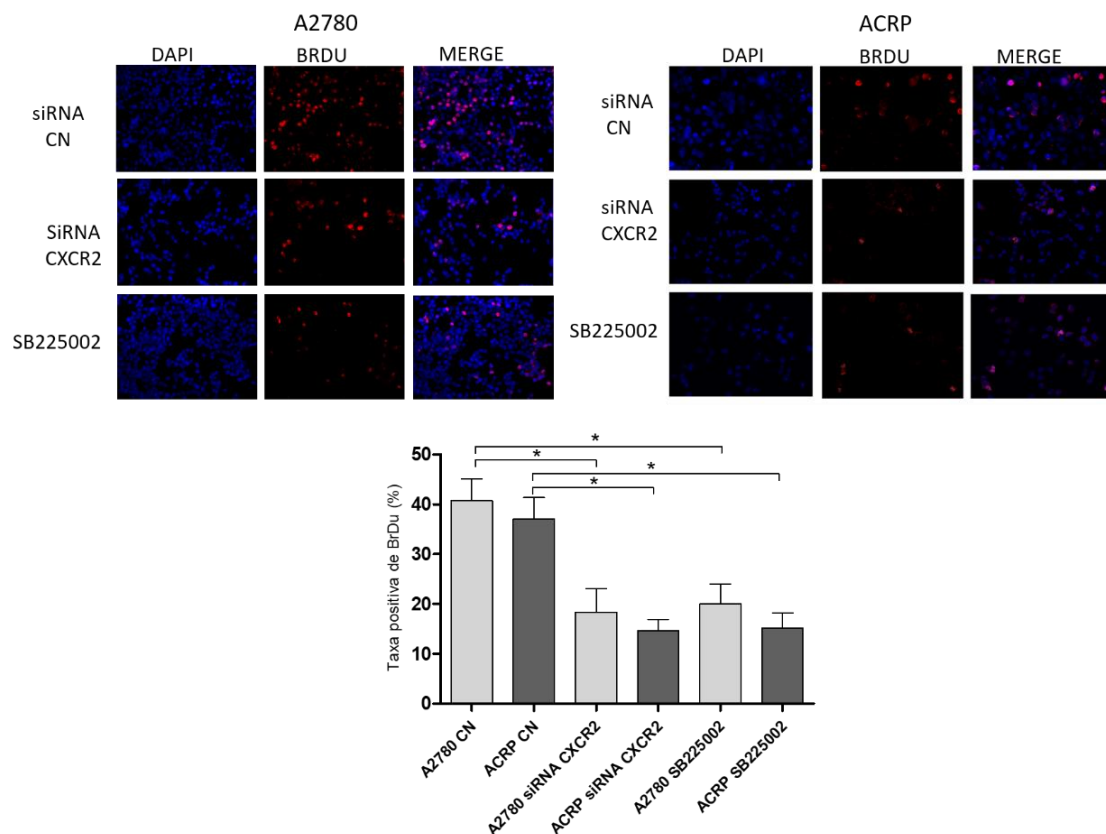


FIGURA 13: Análise da proliferação celular com inibidor SB225002 e silenciamento gênico de CXCR2 por imunofluorescência nas linhagens A2780 e ACRP. Imagens de microscopia de fluorescência. Em azul mostra os núcleos corados com DAPI, em vermelho as células expressando o marcador para proliferação (BRDU) e a união das duas coloração. Os experimentos foram realizados com siRNA CXCR2 (10 μ M), siRNA Controle Negativo ou um antagonista de CXCR2 (SB225002, 0.3 μ M) em A2780 e ACRP. As imagens são representativas de um ensaio. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores de p são baseados em ANOVA de uma via. * $p < 0,05$. As imagens foram adquiridas em ampliação de 10X.

Muitos estudos têm sido realizados para avaliar o papel de CXCR2 na progressão tumoral. Um trabalho realizado em câncer de mama não apresentou diferença significativa na proliferação celular, quando CXCR2 foi silenciado. Os autores avaliaram a proliferação *in vitro* e *in vivo*, encontrando o mesmo resultado, porém os dados para apoptose mostraram maior frequência de células positivas para caspase-3, sugerindo que CXCR2 pode não ter efeito na proliferação mas pode modular a sobrevivência (NANNURU, et al. 2010).

Antagonistas contra CXCR2 têm sido desenvolvidos na tentativa de inibir o crescimento tumoral. Células de Melanoma foram tratadas com SCH-479833 ou SHC-527123, inibidores direcionados para CXCR2, mostrando redução na

angiogênese. SB225002, alvo do nosso estudo, bloqueou a proliferação de células tumorais do esôfago, desativando ERK1/2. Um estudo realizado *in vivo* com células de glioma não encontrou diferenças na atividade proliferativa quando as células foram tratadas com SB225002, bem como, não induziu a apoptose, diferente do encontrado em estudos realizados com câncer de próstata (XU, et al. 2018) e renal (GREPIN, et al. 2014), onde a proliferação foi reduzida assim como a apoptose foi aumentada. Ainda, os autores desse estudo não encontraram alteração na expressão de CXCL2 e CXCR2 após a inibição com o antagonista, eles demonstraram uma expressão aumentada de CXCL2 em células de glioma após tratamento, indicativo de um possível mecanismo de compensação para superar o bloqueio de CXCR2 (ACKER, et al. 2020).

Ademais, um estudo mostrou que CXCL6 e CXCL8 podem promover a proliferação celular nas linhagens de CAO-3 e OVCAR3 de modo tempo e dose-dependentes. Ainda, a superexpressão de CXCL8 na linhagem A2780 aumentou o crescimento, a proliferação, o potencial angiogênico e a invasão celular (WANG, *et al.*, 2012). CXCL8 demonstra ter uma forte ligação com câncer de ovário, essa quimiocina é superexpressa e produzida por tumores malignos ovarianos, podendo estimular a angiogênese e diretamente estimular a proliferação, como mostrado na literatura nos estudos apresentados, indicando uma função na biologia do câncer de ovário epitelial. Em pacientes com CAO, a principal fonte de produção de CXCL8 são as células tumorais, embora a produção de células inflamatórias não possa ser excluída (LOKSHIN, et al. 2006).

Assim, desenvolver formas de inibição de CXCR2 pode, efetivamente, inibir o crescimento de células tumorais e ser uma estratégia ao tratamento atual do câncer de ovário.

5.6 EFEITO DA INIBIÇÃO E SILENCIAMENTO DE CXCR2 NA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DA FORMAÇÃO DE COLÔNIA EM LINHAGENS CELULARES DE CAO

Para provar nosso argumento, realizamos ensaios clonogênicos para avaliar o efeito da inibição de CXCR2, com inibidor SB225002 e o silenciamento gênico, através da utilização de siRNA, em monoterapia ou em terapia combinada com

CDDP, quimioterápico preferencialmente utilizado como tratamento de primeira escolha no CAO, na viabilidade celular (FIGURA 14).

A linhagem A2780 demonstrou uma diminuição na formação de colônias em todos os tratamentos, sendo essa diminuição mais evidente quando as células foram silenciadas com siRNA CXCR2 em combinação com 5 μ M de CDDP, assim como para o antagonista SB225002 em combinação com CDDP (cerca de 90%). Ainda, para células tratadas com siRNA, houve uma diminuição de aproximadamente 50% em relação ao controle e para as células tratadas somente com CDDP, uma diminuição de aproximadamente 70% em relação ao controle, já no tratamento com inibidor houve uma diminuição de 80%. Quando comparamos os tratamentos, fica evidente que A2780 obteve um resultado mais eficaz com o tratamento em combinação do silenciamento gênico e CDDP.

Para as células resistente ACRP, obtivemos uma diminuição cerca de 80% na formação de colônias, quando silenciadas com siRNA CXCR2 e de 90% para células silenciadas em combinação com 5 μ M de CDDP, mostrando que a modulação da expressão desse receptor pode restaurar a sensibilidade da linhagem resistente ao quimioterápico. Já no tratamento com o inibidor SB225002, houve uma diminuição de aproximadamente 55% e em combinação com CDDP de aproximadamente 70%. Para células tratadas apenas com CDDP, a diminuição na formação de colônias foi de aproximadamente 30% na ACRP, o que demonstra a resistência dessa linhagem ao quimioterápico em comparação com à A2780, onde o tratamento com CDDP foi muito mais eficaz. Quando comparamos os tratamentos com siRNA, inibidor e CDDP na ACRP, mostramos uma diminuição mais evidente nas células silenciadas para CXCR2, o que pode novamente ser corroborado com o papel desse receptor na resistência com a expressão nuclear desse receptor.

Em conjunto, nossos achados indicam que CXCR2 desempenha um papel central na aquisição do fenótipo quimiorresistente à cisplatina em CAO. De interesse, observamos efeitos aditivos com o tratamento combinado de células contendo CDDP e siRNA CXCR2 (A2780 $p < 0,001$; ACRP $p < 0,01$), bem como com CDDP e SB225002 (A2780 $p < 0,001$; ACRP $p < 0,01$), mostrando uma maior eficácia do quimioterápico quando CXCR2 é inibido ou silenciado, corroborando novamente

com o papel de CXCR2 na resistência à CDDP em CAO. Curiosamente, silenciar a expressão de CXCR2 parece ser mais eficiente do que inibir o receptor com o antagonista farmacológico SB225002, na linhagem resistente, o que pode nos sugerir um possível papel desse receptor no núcleo celular, evidenciado na linhagem celular resistente, já que o inibidor de CXCR2 não possui capacidade de atravessar as membranas e exercer sua função no núcleo celular.

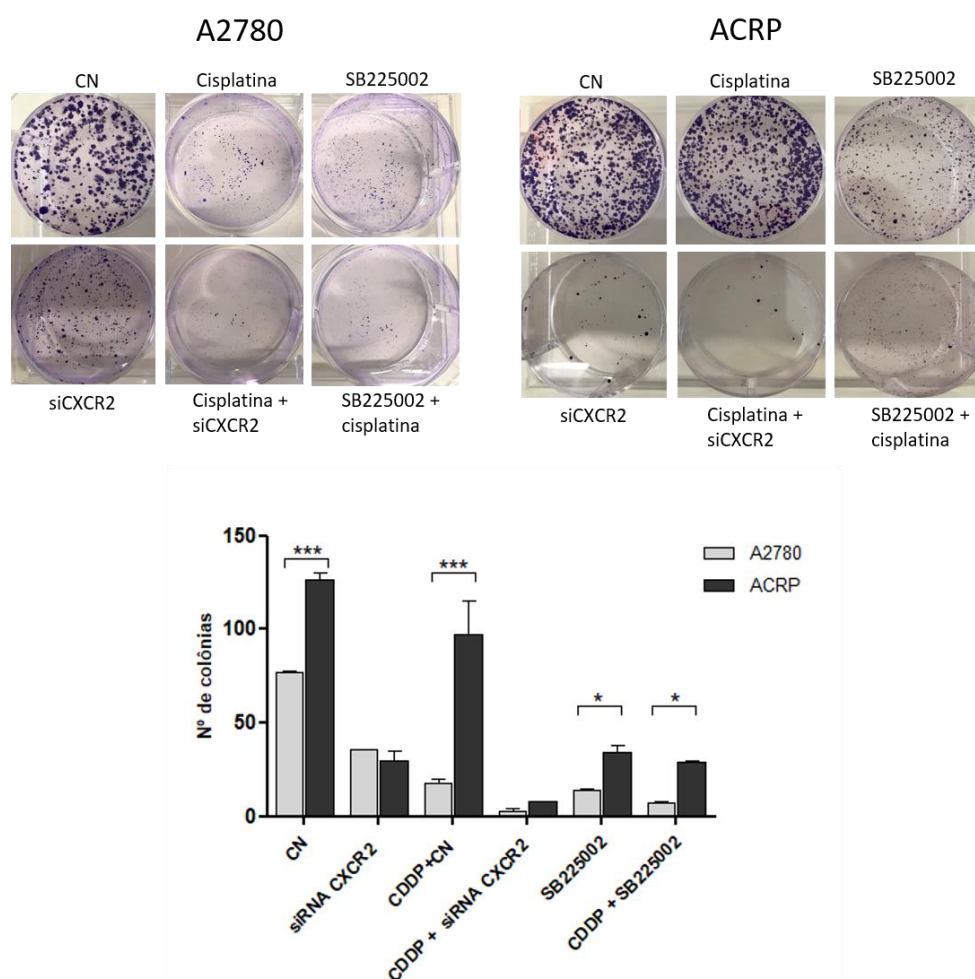


FIGURA 14: Avaliação da função de CXCR2 na viabilidade celular através de ensaio de formação de colônia nas linhagens A2780 e ACRP. 150 células das linhagens A2780 e ACRP foram semeadas em placas de 6 poços e tratadas com o inibidor SB225002 (1ug/ml) com e sem CDDP (5uM), siRNA de CXCR2 (10uM) com e sem CDDP (5uM) e siRNA controle negativo (10uM). Os experimentos foram realizados em triplicatas e corados com cristal violeta. Figura representativa de um experimento. Os dados foram analisados por ANOVA bidirecional seguida pelo pós-teste de Bonferroni Média e desvio padrão são mostrados no gráfico. * $p < 0.05$, *** $p < 0,001$.

Um estudo usando células transformadas da superfície do ovário e SKOV3, mostrou que o silenciamento de CXCR2 diminuiu a atividade das quimiocinas, CXCL1 e CXCL8, diminuindo também, a capacidade dessas células de formarem colônia, quando comparada com células não silenciadas, sugerindo assim, que o silenciamento de CXCR2 reduz a tumorigenicidade das células do câncer de ovário *in vivo* e *in vitro* (YANG et al., 2010).

Interessantemente, estudos recentes indicam que CXCL1 e CXCL2, através do seu receptor CXCR2, têm papel importante na metástase e quimiorresistência, como parte de uma via parácrina. Uma pesquisa feita por ACHARAYYA, et al, (2012), mostrou que essas quimiocinas são hiperativadas em linhagens de câncer de mama, pela quimioterapia, e que o bloqueio de CXCR2 em combinação com os agentes quimioterápicos poderiam, acentuadamente, reduzir a metástase de pulmão em camundongos.

SHARMA, et al (2013) avaliaram a modulação da sensibilidade das células tumorais metastática de câncer de mama a quimioterapia com a inibição de CXCR2, observando uma significativa sensibilidade a PTX e a DOXO das células silenciadas para o receptor em comparação com as células sem a transfecção, mostrando também inibição do crescimento tumoral nas células tratadas com doses mais baixas dos quimioterápicos (0,5 nM para PTX e 5 nM para DOXO), quando inibidas para CXCR2. Ainda nesse estudo, a inibição de CXCR2 aumentou a atividade antitumoral de PTX em um modelo *in vivo* de tumor de mama metastático. Os autores observaram inibição significativa de metástases pulmonares espontâneas em animais portadores de tumores *knockout* de CXCR2 e tratados com PTX em comparação com o grupo controle. Os dados da pesquisa sugerem o novo papel do CXCR2 e seus ligantes na manutenção da resistência à quimioterapia e fornecem evidências de que o direcionamento da sinalização do CXCR2, em um cenário adjuvante, ajudará a contornar a resistência à quimioterapia (SHARMA et al, 2013). Dados de um estudo do mesmo grupo mostraram que a inibição com antagonistas de CXCR2 diminuiu também o crescimento tumoral em células resistentes, mas não em células parental (SHARMA et al. 2016), mostrando assim um papel importante desse receptor na resistência de células tumorais. Em nosso estudo foi demonstrado esse mesmo efeito, na capacidade proliferativa e de formação de colônia, das células tumorais.

Estes dados indicam que CXCR2 pode ter múltiplos papéis e que seu potencial terapêutico é provavelmente multifatorial. De fato, provavelmente o benefício mais potente para a terapia antagonista do CXCR2 seria em combinação com agentes quimioterapêuticos atuais, que diferem dependendo do tipo de câncer tratado.

Esses dados sugerem o papel essencial de CXCR2 na resistência à terapia, indicando também, que a utilização de agentes que tenham como alvo CXCR2 em combinação com quimioterápicos pode fornecer uma estratégia promissora para combater a resistência das células tumorais.

5.7 ESTUDO *IN VIVO* DO PAPEL DE CXCR2 NO TAMANHO TUMORAL E ANGIOGÊNESE DE LINHAGENS CELULARES DO CAO V

Algumas quimiocinas podem induzir efeitos pró-angiogênicos, levando a tumores altamente neovascularizados e ao aumento da formação de metástase. Diversos estudos mostram as quimiocinas, principalmente as dos subgrupos CXC, são importantes reguladores da angiogênese tumoral (SON, et al. 2012; WANG, et al. 2012; SCHAUER, et al 2013). Diante do exposto, foi realizado um experimento *in vivo*, através da membrana corioalantóica (CAM) do embrião de galinha para avaliar o crescimento tumoral e a angiogênese (FIGURA 17).

Para o crescimento tumoral, mostramos que as células resistentes à CDDP, ACRP, apresentam maior capacidade de crescimento tumoral e, quando realizamos o silenciamento de CXCR2, houve uma diminuição no tamanho tumoral de 2,5 vezes. Ainda, uma comparação entre as linhagens não silenciadas, mostramos que a capacidade de crescimento tumoral nas células resistentes ACRP é 4 vezes maior que na parental A2780 (FIGURA 15). Esses resultados, embora não houve dados estatísticos, por terem sido realizados em duplicata, podem demonstrar a capacidade de progressão que as células resistentes podem adquirir. Assim, os resultados apontam para uma ação crucial de CXCR2 em células resistentes à CDDP, inferida pelo crescimento contínuo do tumor na ACRP, que é revertido pelo silenciamento do receptor CXCR2.

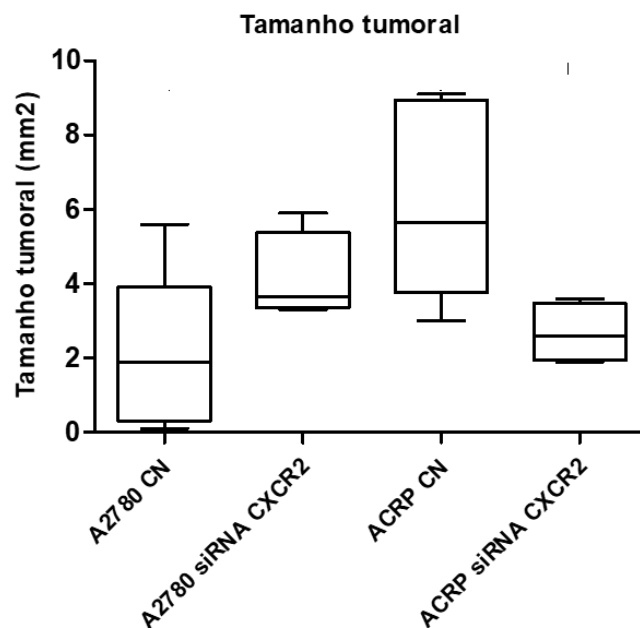


FIGURA 15: Estudo *in vivo* do papel de CXCR2 no crescimento tumoral nas linhagens A2780 e ACRP. Foi realizado o ensaio *in vivo* por membrana corioalantoica do embrião da galinha (CAM). O tumor foi medida após 5 dias de inoculação. Os dados mostram a diferença entre a ACRP resistente à cisplatina e a linhagem parental A2780 em células controle negativo e siRNA CXCR2. As células foram inoculadas após 24h da transfecção. Os dados são indicativos do efeito de CXCR2 no crescimento tumoral das células reistentes. Os experimentos foram realizados em duplicata com cinco ovos para cada condição.

Para o perfil angiogênico, nossos resultados não apresentaram diferenças entre as linhagens controle e as linhagens silenciadas, embora a angiogênese aconteça. Também não houve diferença entre a linhagem parental A2780 e a linhagem resistente ACRP. Acreditamos que novos experimentos devem ser realizados para uma análise comparativa e confirmar se há diferença na capacidade de formação de novos vasos sanguíneos (FIGURA 16).

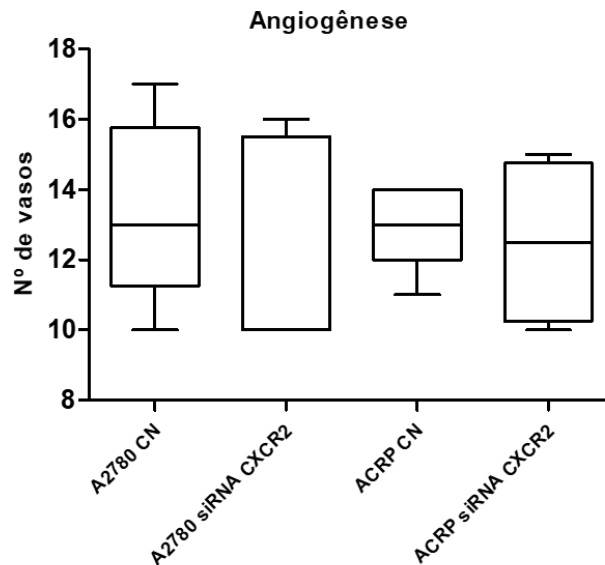


FIGURA 16: Estudo *in vivo* do papel de CXCR2 na angiogênese nas linhagens A2780 e ACRP. Foi realizado o ensaio *in vivo* por membrana corioalentoica do embrião da galinha (CAM). O tumor foi medida após 5 dias de inoculação. Os dados mostram a diferença entre a ACRP resistente à cisplatina e a linhagem parental A2780 ($p= 0,0139$), em células controle negativo e siRNA CXCR2. As células foram inoculadas após 24h da transfecção. A resposta angiogênica foi avaliada pela contagem de vasos com até 20 μ m de diâmetro crescendo radialmente para área do anel, nos tumores. A taxa de mortalidade global dos embriões / ovos foi a esperada (~ 10%). O ensaio foi realizado em duplicata com cinco ovos para cada condição.

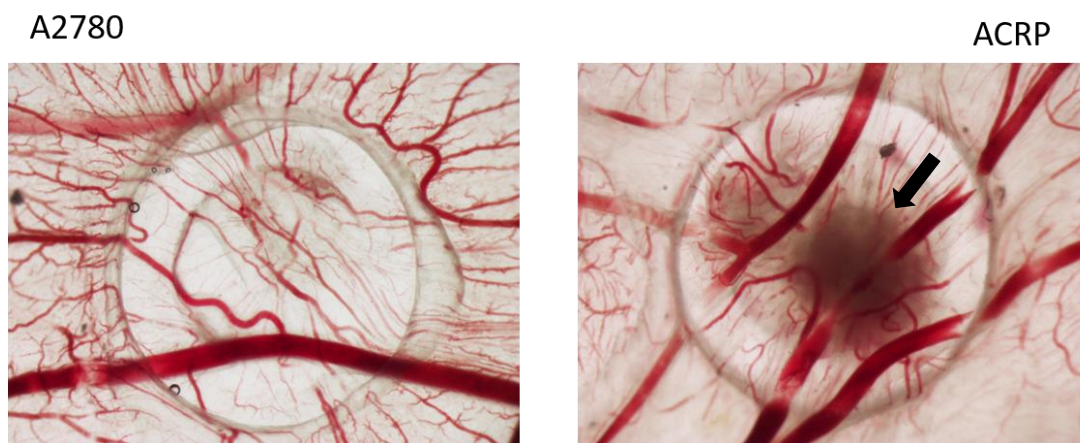


FIGURA 17: Imagem da CAM sem tumor na A2780 (esquerda) e com tumor na ACRP (direita). Imagens do local de inoculação das células na membrana do ovo da galinha, mostrando o tumor e os vasos sanguíneos em uma lupa com ampliação de 20x (Olympus, SZX16 acoplada a uma câmera DP71).

Estudos mostraram que CXCR2 é muito expresso em células tumorais mas com nenhuma correlação com o estágio do tumor (ARAKI et al, 2007; MULLER et al, 2001; NING et al, 2011). Já CXCL2, fornece sobrevivência estimulando a angiogênese. A expressão dessa quimiocina no microambiente tumoral atrai

células supressora mielóides no tumor, onde quimiocinas que aumentam a sobrevivência de células cancerosas são produzidas. Tratamentos com quimioterápicos levam a produção de TNF- α , que aumentam a expressão de quimiocinas como, CXCL2, resultando na quimiorresistência e progressão (HAGHNEGAHDAR, et al. 2000; ACHARYYA, et al. 2012).

A ativação de CXCR2 promove a angiogênese através de mecanismos como migração aumentada, mimetismo vasculogênico, mecanismo de modificação fenotípica em células cancerosas agressivas, resultando na formação de redes vasculares pelas células tumorais, o que contribui para a perfusão de tumores de crescimento rápido, aumento de expressão de VEGF nos tecidos tumorais e indução de células mielóides infiltradas nos tumores (WANG, et al 2017; AIKINS et al. 2017; WEI et al. 2015; JABLONSKA et al. 2014;)

SHARMA et al, (2013), mostraram em modelo *in vivo* que o silenciamento de CXCR2 aumenta a atividade antitumoral de PTX, diminuindo o crescimento tumoral em camundongos *knockout* para CXCR2 em comparação com os camundongos que expressavam esse receptor. Além disso, também demonstraram uma diminuição na densidade de microvasos em tumores de mama com CXCR2 inibido, diferentemente dos nossos resultados. O mesmo foi encontrado em outro estudo com tumores de mama, obtendo uma significativa diminuição na densidade dos microvasos quando comparado ao controle (NANNURU, et al, 2010).

Para Acker, *et al.* (2020), o bloqueio da via de CXCL8/CXCL2/CXCR2 representa uma promessa para a terapia do câncer. Nesse estudo foi encontrado uma redução exponencial do crescimento tumoral *in vivo*, tratados localmente com antagonista de CXCR2. Eles ainda sugerem que a diminuição na angiogênese e redução no acúmulo de macrófagos associados ao tumor (TAM) após tratamento, é a causa da diminuição do crescimento tumoral. Esses dados podem ser corroborados com os dados realizados em um estudo com câncer renal, onde o SB225002, inibiu a proliferação de células endoteliais e o crescimento por células de carcinoma renal, afetando também a vasculatura tumoral e proliferação dessas células, sendo um alvo promissor para tratamento (GREPIN, et al. 2014).

5.8 EFEITO DO SILENCIAMENTO DE CXCR2 NA INVASÃO DE LINHAGENS CELULARES DO CAO V NA CAM

Através da retirada do local de inoculação das células na membrana do embrião da galinha, realizamos a inclusão em bloco de parafina para posterior análise de invasão tumoral.

Nossos resultados mostram invasão de forma heterogênea nas duas linhagens, sem inibição e com inibição de CXCR2, impossibilitando uma análise estatística. Ensaio posteriores devem ser realizados para melhor análise da invasão celular. Demonstramos aqui, exemplos de invasão das células tumorais para o interior da membrana (FIGURA 18, B, D, F, H). Ainda, realizamos imagens de células apoptóticas sob a membrana sem invasão (FIGURA 18 A e E), uma membrana sem nenhuma célula tumoral, aparentemente normal (FIGURA 18 C) e de células tumorais começando a invadir a membrana (FIGURA 18 G).

Esses resultados revelam que as células são capazes de invadir a membrana, mostrando que são células com perfil metastático, porém não podemos afirmar se as células resistentes possuem maior capacidade de invasão e metástase em comparação as células parentais, e se o silenciamento gênico nessas células é capaz de diminuir essa invasão e conseqüentemente a metástase. Entretanto, acreditamos que o aumento do número de experimentos seja necessário para avaliar se há alguma diferença entre as linhagens e o silenciamento de CXCR2, pois segundo estudos a inibição de CXCR2 foi capaz de diminuir o perfil invasivo das células (YANG et al., 2010; SHARMA et al. 2013; SAINTIGNY, *et al.* 2013)

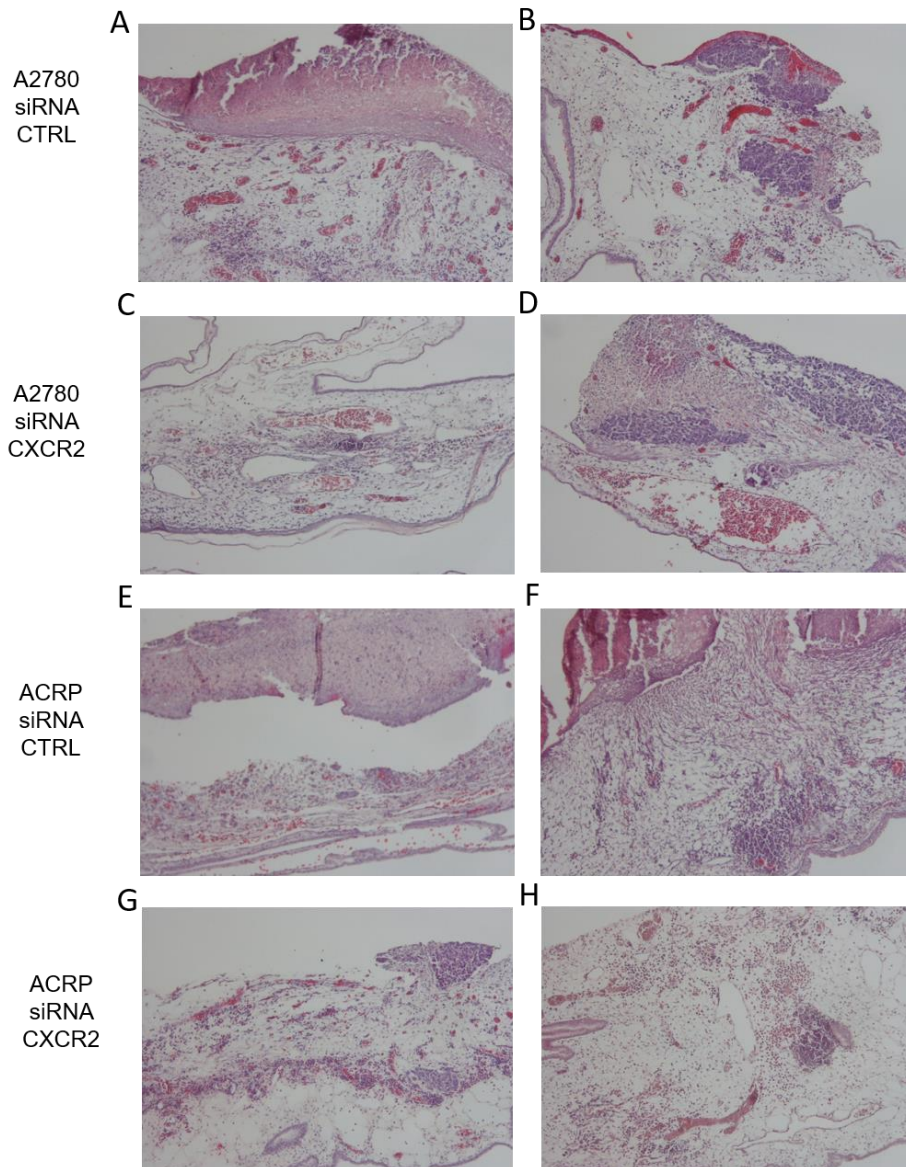


FIGURA 18: Imagens de invasão das linhagens celulares A2780 e ACRP com controle negativo e silenciadas para CXCR2. Coloração de Hematoxilina e Eosina em seções de bloco de parafina, mostrando invasão de células silenciadas e controle negativo. (A) células A2780 CTRL mostrando células apoptóticas na superfície da membrana, (B) grupos de células A2780 CTRL com invasão para dentro da membrana (C) Células A2780 com siRNA de CXCR2, mostrando uma membrana normal, sem células tumorais (D) A2780 siRNA com invasão de células tumorais para dentro da membrana (E) ACRP CTRL com grupo celular na superfície da membrana (F) ACRP CTRL invadindo para dentro da membrana (G) ACRP siRNA na superfície da membrana e (H) membrana com grupo de células ACRP siRNA dentro da membrana. As fotos foram retiradas de microscopia óptica em um aumento de 100x.

A patologia da metástase é a invasão de células de cancerosas para o estroma subjacente ou matriz extracelular (CLARK, et al. 2015). Segundo estudo, interações cruciais entre células tumorais e estromais tal como, fibroblastos,

células do infiltrado imune como as citocinas e linfócitos T, podem modular a invasão de células tumorais. O câncer é um microambiente inflamatório que desencadeia a infiltração crônica de células imunes, devido a indução de mediadores inflamatórios como as quimiocinas, por isso, muitos estudos mostram a expressão aumentada desses fatores, como descrito anteriormente. Assim o crescimento e invasão podem ser mediados por contato direto entre células heterotípicas ou moléculas difusíveis, como as quimiocinas, dentro de um microambiente tumoral (KRAMER et al 2017; WEI, et al, 2019). Em adição, um estudo de câncer de mama revelou que macrófagos tem a capacidade de aumentar a expressão de quimiocinas inflamatórias que se ligam a CXCR2 e estes macrófagos são capazes de promover a migração de células tumorais e epiteliais, bem como, promover a invasão através da ativação de CXCR2 (BOHRER et al, 2012).

Um estudo usando clones silenciados para CXCR2 de células de adenocarcinoma de pulmão, mostrou através de co-cultura com fibroblastos associado ao câncer, que produzem altos níveis de ligantes de CXCR2, que houve uma diminuição no perfil invasivo das células. Para confirmação do resultado foi utilizado o inibidor farmacológico de CXCR2, SB225002, o mesmo utilizado em nosso estudo, em células com perfil altamente invasivo e metastático. O inibidor também foi capaz de diminuir a invasão dessas células quando comparada com o controle negativo (SAINTIGNY, *et al.* 2013).

Em células de câncer de mama, um estudo mostrou através de ensaio *in vitro* com Matrigel que o silenciamento de CXCR2 inibiu significativamente a capacidade destas células de invadir a membrana. Foi observado uma redução de 72% na invasão em células silenciadas para CXCR2 em comparação às células controle (NANNURU et al. 2010).

Dados da literatura nos mostra que o silenciamento de CXCR2 é capaz de diminuir a invasão de células tumorais. Ainda, as quimiocinas podem promover invasão de células tumorais e o bloqueio de CXCR2 pode reduzir essa invasão tumoral (SHARIF, et al. 2015), além de inibir a proliferação de células resistente no câncer de mama e aumentar o efeito da quimioterapia no câncer de cólon (SHARMA, et al. 2016).

5.9 EFEITO DA INIBIÇÃO E SILENCIAMENTO DE CXCR2 EM LINHAGENS CELULARES DO CAO V EM MARCADORES DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL

Como estudos vêm mostrando que CXCR2 está associado ao processo de TEM (BOWTELL et al. 2010), questionamos se isso também poderia contribuir para os mecanismos de CXCR2 na promoção da quimiorresistência à CDDP em CAO V. Para isso, analisamos a expressão proteica em marcadores envolvidos na TEM (FIGURA 19).

Em nossos resultados, as células resistentes ACRP mostraram uma maior expressão de SNAIL, SLUG e β -Catenina, mas não na linhagem A2780, demonstrando que a resistência dessa linhagem está intimamente associada ao processo de TEM. Quando essas células foram silenciadas com siRNA de CXCR2, essa expressão diminuiu significativamente para SNAIL (1,1 vezes) e SLUG (0,9 vezes) e o mesmo não ocorreu em A2780, sugerindo que CXCR2 está envolvido na indução quimiorresistente de CXCR2 em células de CAO V. O mesmo resultado não foi encontrado para as duas linhagens quando CXCR2 foi inibido com o antagonista SB225002. O que pode ser corroborado com os dados da expressão anômala de CXCR2, visto a ação do silenciamento nessas células, e mostrando novamente o papel desse receptor no núcleo celular, na quimiorresistência. Para vimentina, a expressão não se alterou entre os diferentes tipos de inibição para as duas linhagens e não reverteu a expressão de β -Catenina. Hipotizamos, então, que possa haver um eixo CXCR2-SNAIL-SLUG contribuindo para o papel das quimiocinas na indução da quimiorresistência de CDDP em células de CAO V. (FIGURA 19).

A diminuição dos marcadores de TEM, pode contribuir para a sensibilidade dessas células, podendo então melhorar a resposta à terapia. Ainda, acreditamos que é uma possível via de sinalização que implica na alteração da proliferação celular, e com maiores impactos em células resistentes. Isso também corrobora com nossos resultados supracitados, onde CXCR2 parece estar envolvido com a resistência em CAO V, e onde o silenciamento desse receptor tem a capacidade de diminuir os fenótipos tumorigênicos.

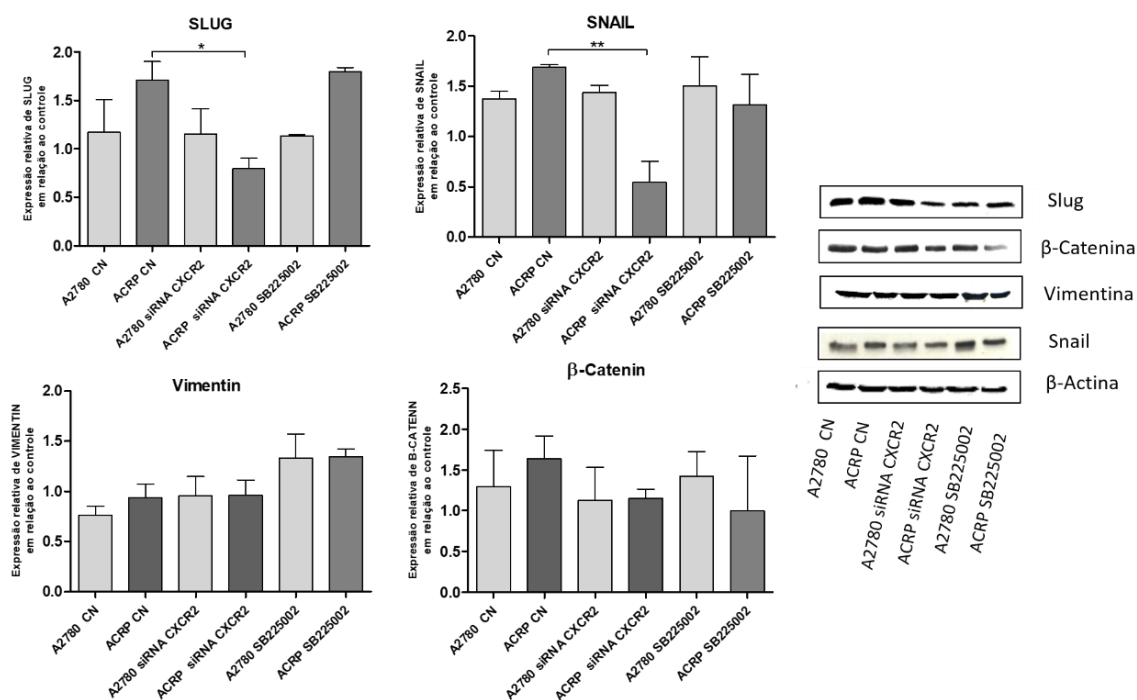


FIGURA 19: Análise da expressão proteica de marcadores de TEM com silenciamento gênico e inibidor SB225002 de CXCR2 nas linhagens A2780 e ACRP. A análise de Western Blot mostrou uma diferença significativa para SNAIL ($p= 0,005$) e SLUG ($p= 0,022$) em células silenciadas de CXCR2. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores de p são baseados em ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni. β -actina foi usada para como controle de normalização.

O fenômeno de transição epitelial-mesenquimal ganhou atenção no campo da biologia do câncer por sua potencial contribuição para a progressão de carcinomas. O TEM do tumor é uma alteração fenotípica que promove a aquisição de uma morfologia do tipo fibroblástico por células epiteliais, resultando em maior mobilidade e invasividade das células tumorais, maior propensão metastática e resistência à quimioterapia, radiação e certas terapias direcionadas a pequenas moléculas. Sabe-se também que as células tumorais submetidas á TEM aumentam a secreção de fatores específicos, incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que podem desempenhar um papel importante na progressão tumoral (SAVAGNER, et al. 2001; BATES, et al. 2004;

SHARMA et al. (2016), mostraram que células resistentes à PTX e DOXO apresentaram maior expressão de marcadores de TEM como vimentina e β -catenina como também menor expressão de E-caderina quando comparada com as células parentais. Os autores acreditam que o direcionamento da sinalização

de CXCR2 pode ajudar a contornar a resistência á terapia no câncer de mama. Este mesmo artigo também mostrou que a sinalização de CXCR2 tem um papel na manutenção de células-tronco tumorais, entretanto, os autores sugerem que essa via de sinalização é importante para o crescimento primário e para o processo de metástase, mas a relação entre a via de CXCR2 e as células troncos tumorais, bem como, marcadores para TEM precisam ser melhor investigadas.

Um estudo com CAOv seroso de alto grau, avaliou marcadores de TEM, Vimentina e o marcador epitelial, E-caderina. Os autores mostraram que CXCL8, via CXCR2, aumentou o nível da proteína Vimentina e diminui nível de E-caderina, mostrando que CXCL8 pode regular TEM e promover a migração de CAOv. Os autores mostraram ainda, que a via de Wnt/ β -catenina pode ser ativada por meio do aumento da expressão de CXCL8, induzindo o processo de TEM (WEN, et al. 2020).

Uma possível ligação entre a via de CXCR2 e TEM tem sido sugerida por alguns autores. Foi mostrado que Snail promoveu progressão tumoral através de uma ligação dependente de CXCR2, em tumor de pulmão de não pequenas células (YANAGAWA et al, 2010). Em um outro estudo, foi demonstrado que a superexpressão de Snail levou ao aumento do crescimento tumoral *in vivo*, associado com o aumento da angiogênese e altos níveis de ligantes de CXCR2 como, CXCL5 e CXCL8, sendo sugerido que Snail promove a progressão e a angiogênese mediada por CXCR2, pois quando ocorre o bloqueio de CXCR2, o crescimento tumoral mediado por Snail é reduzido (YANAGAWA et al, 2010; GURZU et al. 2019). O mesmo ocorreu no estudo de câncer de ovário, Snail induz a expressão de CXCL8 e promove a progressão tumoral através do recrutamento de células supressoras mielóides. Quando ocorre o bloqueio de CXCR2, essa progressão diminui, assim como também há uma diminuição de células com perfil mesenquimatoso (TAKI, et al. 2018). Snail também induz o tráfico de células mielóides por meio da regulação positiva de CXCR2 e uma análise dos dados de câncer de ovário do TCGA indicou que Snail está correlacionado com muitas quimiocinas, incluindo ligantes de CXCR2 (MANA et al. 2018). Estudos recentes revelaram ainda que a ligação de CXCL5/CXCR2 induz ativação da via de β -catenina no câncer colorretal e no carcinoma de tireóide (DONG et al. 2018, ZHAO et al 2017).

A superexpressão de Snail revela, ainda, induzir a secreção de CXCL8. O bloqueio da via de sinalização de CXCL8 em tumores sólidos pode favorecer o resultado clínico, suprimindo o crescimento tumoral, angiogênese e atividade promotora de TEM através da via CXCL8/CXCR2 (DAVID, et al. 2016).

É importante ressaltar que a aquisição de um fenótipo mesenquimal por células tumorais é um processo transitório e pode envolver algumas células na interface tumor-estroma. No entanto a transição epitelio-mesenquimal ainda é controversa, já que estudos têm apoiado a idéia de que células tumorais mesenquimais são necessárias para o retorno do fenótipo epitelial, uma vez que tenham atingido o local de metástase. Essa natureza transitória de TEM levanta uma questão de quando uma inibição da sinalização de CXCL8 pode ser adequada para bloquear ou reverter o fenótipo TEM. A identificação de reguladores da TEM, pode levar a estratégias combinatórias que podem prevenir com mais eficiência as metástases tumorais, e o bloqueio da via de CXCR2 parece ser uma estratégia atraente para diminuir os sinais promotores de tumor (KWOK et al. 2005; CHAFFER et al. 2006; BUKHOLM et al. 2000; PALENA et al. 2013).

Esses resultados sustentam a ideia de que Snail/Slug tem papel em múltiplas funções, incluindo o sistema imunológico e TEM, uma vez que quimiocinas podem regular intrinsecamente fatores de transcrição supracitados e esses controlam TEM. Isso nos leva a concluir que CXCR2, assim como quimiocinas, tem um papel fundamental na resistência, que está associada a transição epitelio-mesenquimal, podendo contribuir para o crescimento tumoral visto em nossos resultados.

5.10 EFEITO DA INIBIÇÃO E SILENCIAMENTO DE CXCR2 EM LINHAGENS CELULARES DO CAO V NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/mTOR E MEK/ERK.

Há ampla discussão para o desenvolvimento e estudos clínicos de inibidores de PI3K/AKT/mTOR, principalmente nos subtipos de câncer que apresentam essa via geneticamente modificada e que podem ser beneficiados com o uso de inibidores em combinação com quimioterápicos, levando a ação desses agentes em diferentes vias que controlam funções carcinogênicas (GUIMARAES, et al. 2015). Outra importante via de sinalização celular modulada nos diversos tipos de câncer é a via de MEK/ERK. Os sinais transmitidos por essa cascata de

sinalização pode induzir a ativação de diversas moléculas que regulam a sobrevivência celular e a diferenciação (MANSOUR *et al.*, 1994; SMALLEY, 2003).

Argumentamos, então, se CXCR2 modularia as vias clássicas de sinalização carcinogênicas, como PI3K/AKT e MEK/ERK. Vias essas, que podem ser moduladas por diferentes quimiocinas, como CXCL6 (WANG, *et al.* 2012). As vias de sinalização reguladas por quimiocinas levam a uma variedade de respostas celulares diferentes, incluindo adesão, migração, quimiotaxia, alteração na morfologia celular e regulação ou ativação da integrina. Os aspectos que levam à cascata de sinalização a justante decorrem da ativação da proteína G associada ao receptor CXCR2, pela qual a subunidade α e o complexo $\beta\gamma$ se dissociam e ativam ou inibem alvos como PI3k e MAPK (BAGGIOLINI *et al.* 1998; ZARBOCK *et al.* 2008; SUNAHARA *et al.* 1996; RODRIGUEZ-VICIANA, *et al.* 1994).

Observamos uma tendência biológica na diminuição da expressão para p-AKT (0,5 vezes), e p-ERK (0,3 vezes) nas células resistentes ACRP com silenciamento gênico para CXCR2 quando comparadas ao controle negativo. O mesmo não foi mostrado para as células A2780 e para o tratamento com inibidor nas duas linhagens celulares (FIGURA 20). Esses resultados embora não significativos ($p=0,07$ e $p=0,09$, respectivamente), mostram que CXCR2 pode estar modulando essas vias de sinalização e esse receptor pode ainda ter papel fundamental na resistência, podendo induzir a morte celular através do uso de moléculas capaz de inibir seu funcionamento.

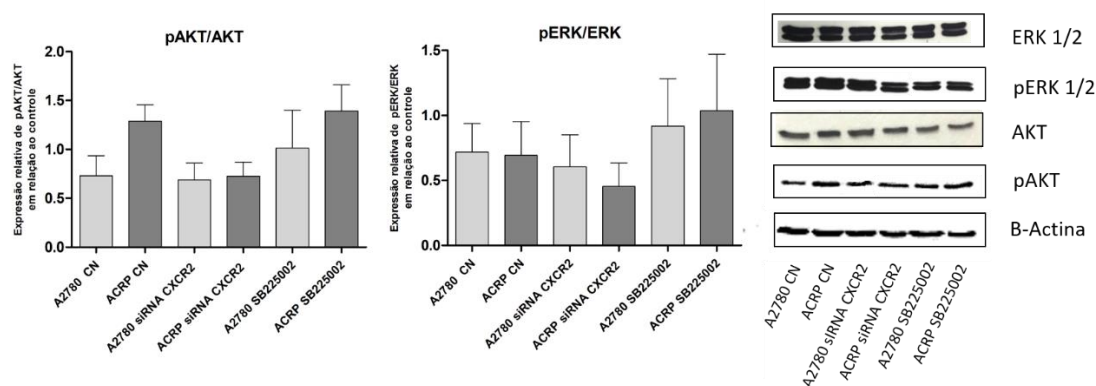


FIGURA 20: Análise da expressão de proteínas associadas as vias de sinalização de PI3K/AKT/mTOR e MEK/ERK com silenciamento

ento gênico e inibidor SB225002 de CXCR2 nas linhagens A2780 e ACRP. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores de p são baseados em ANOVA de duas vias com *post test* de Bonferroni, não apresentando diferença estatística. β -actina foi usada como controle de normalização. $p > 0,05$.

Ainda, tem sido documentado que a via de Wnt/ β -catenina também está erroneamente ativada em múltiplos câncer, como osteosarcoma (CUI, et al. 2018; ZHAO, et al. 2018; LIU, et al. 2019). Essa via também parece estar envolvida no mecanismo regulatório de CXCL6/CXCR2, na metástase. Um estudo mostrou que a superexpressão de CXCL6, via CXCR2, contribui para o crescimento tumoral, TEM e metástase, ativando as vias de PI3K/AKT e Wnt/ β -catenina, em osteosarcoma, que podem ser inibidas pelo tratamento com o antagonista, SB225002 (LIU, et al. 2019). A via de Wnt/ β -Catenina está envolvida na proliferação, polaridade celular e homeostase tecidual (LOGAN e NUSSE, 2004). Mutações nessa via estão ligadas ao desenvolvimento do câncer. Investigações foram realizadas também para mostrar se, e como CXCL5/CXCR2 regula a via de β -catenina, contribuindo para a invasão e TEM em carcinoma da tireóide. Nesse estudos eles mostraram que CXCL5/CXCR2 aumentam a invasão por meio da via de β -catenina. Sendo suportados por outro estudo em câncer colorretal, onde revelaram que esse complexo induz ativação da mesma via. Esses dados podem sugerir uma possível via de compensação para as quimiocinas e o receptor para exercer suas funções nos fenótipos da doença (ZHAO, et al, 2018; CUI, et al. 2018). Experimentos podem ser realizados com as células de CAOVS seroso de alto grau para confirmar se esses resultados também podem ocorrer nesse tipo de câncer.

Desse modo, a inibição dessas vias torna-se uma estratégia eficaz na diminuição da indução da resistência e, por conseguinte, na sobrevivência celular.

Nosso resultado pode ser corroborado, também, com outros estudos (WANG et al. 2006, MAXWELL et al. 2007; MURPHY et al. 2005). Assim como os demais resultados apresentados, CXCR2 parece ser um marcador promissor na ajuda ao combate do câncer de ovário.

Estudos em melanoma humano mostraram que a fosforilação de ERK1/2 e a ativação de NF- κ B estão associadas à função do CXCR2 e seus ligantes (SINGH et al. 2009; SINGH et al. 2009). Vários estudos mostraram que a ativação de AKT,

STAT3 e a proteína MAPK quinases MEK1/2, ERK1/2 e p38 também podem estar envolvidas na rede de sinalização do CXCR2 (MAXWELL et al. 2007; MURPHY et al. 2005; WANG et al 2006). Ainda estudos mostram que TEM pode ser induzido via AKT e ERK, através da ativação de CXCR2 pelos seus ligantes, contribuindo também para a invasão e migração através do complexo CXCL/CXCR2 ativando essas mesmas vias de sinalização, demonstrando participar da intensiva atividade biológica (GAO, et al. 2015; ZHOU, et al. 2015; ZHAO, et al. 2017; QIU, et al. 2018).

CXCR2 pode controlar a tumorigênese ovariana manipulando uma rede de sinalização abrangente composta por PI3K/AKT, NF-κB, MAPK e STAT3, que regula a progressão do ciclo celular, apoptose / antiapoptose e angiogênese. A promoção da proliferação através da expressão de CXCR2 parece envolver o aumento de ERK1/2 e PI3K/AKT, vias clássicas de sinalização na carcinogênese (WANG et al. 2006). Ainda, um estudo em câncer de esôfago mostrou que CXCL2 aumenta a transcrição de EGR-1, através da via de ERK1/2, podendo ser bloqueado por antagonista específico de CXCR2 (SB225002), o mesmo não foi mostrado nesse trabalho para a inibição com SB225002 (WANG et al. 2006). Já no estudo de câncer renal, o bloqueio com SB225002 inibiu atividades de ERK e AKT e induziu a clivagem de PARP, podendo explicar os efeitos do antagonista na proliferação e apoptose, encontrados nesse estudo, porém o autor relata que os resultados tem um efeito dose-dependente (GREPIN, et al, 2014).

Em um estudo no câncer de pâncreas mostrou que o bloqueio de CXCL5 ou CXCR2 atenuou o crescimento tumoral em modelos de ratos e relatou que essa via inclui a via de AKT e ERK em células endoteliais humana. Ainda, a ativação dessas vias pode modular a expressão de citocinas e quimiocinas, formando um loop para melhorar a função de CXCR2. A via de PI3K/AKT ativada por CXCR2 promove a ligação de NF-κB ao DNA nuclear e regula transcricionalmente a proliferação celular e apoptose. A inibição de CXCR2 também atenua a expressão de BCL-2, antagonista da morte celular, levando ao aumento da apoptose nas células tumorais (KNALL et al. 1997; MURPHY et al. 2006).

Com base na literatura, nossos resultados, embora não significativos, podem sugerir o papel de CXCR2 nas clássicas vias de sinalização carcinogênicas,

podendo contribuir para os fenótipos tumorigênicos, como, a migração, sobrevivência e progressão tumoral.

Por fim, nosso estudo prova que CXCR2 está retido no núcleo das células de CAO, submetidas à aquisição do fenótipo resistente, que se correlaciona fortemente com o mau prognóstico da doença e seu alto índice de mortalidade que segue desafiando a pesquisa e a clínica. Ainda, CXCR2 está associado a proliferação e crescimento tumoral, nas células resistentes de CAO, mostrando seu papel na resistência e progressão da doença. Quando modulamos a expressão desse receptor, com localização nuclear, mostramos uma reversão significativa nos fenótipos tumorigênicos estudados. Com isso, a obtenção de estratégias eficazes por meio da síntese de moléculas análogas, com maior lipossolubilidade do que a do inibidor competitivo, SB225002, possa atingir CXCR2 no núcleo, de células de CAO seroso de alto grau, e contribuam, ainda que parcialmente, com o prognóstico ruim da doença. De qualquer forma, introduzimos nesse trabalho um novo mecanismo que contribui para a quimiorresistência à CDDP nas células de CAO.

6. CONCLUSÃO

A expressão anômala de CXCR2 no núcleo das células tumorais pode ser fator determinante para futuras estratégias terapêuticas, contribuindo para prognóstico da doença;

O receptor CXCR2 está associado ao pior prognóstico e menor sobrevida de pacientes com câncer de ovário epitelial seroso de alto grau, superexpresso principalmente em pacientes recidivadas e com quimiorresistência;

A inibição de CXCR2 contribui para a sensibilização das células resistentes de CAOVS seroso de alto grau, melhorando a eficácia de Cisplatina, diminuindo a proliferação e o crescimento tumoral nas células resistentes;

CXCR2 pode estar diretamente relacionado ao fenótipo de TEM, apontando um papel importante na resistência e progressão da doença, além de sugerir um papel nas vias de sinalização de PI3K/AKT e MEK/ERK que controlam a sobrevivência e migração;

Por fim, o bloqueio da via de CXCR2 pode ser alvo de terapia em potencial para o tratamento, principalmente para pacientes com quimiorresistência de CAOVS seroso de alto grau, visto o importante papel desse receptor no fenótipo quimiorresistente da doença.

7. PERSPECTIVAS

Através dos dados encontrados nesse trabalho, vislumbramos seguir com a caracterização de CXCR2 nas linhagens de CAOVS seroso de alto grau, avaliando o papel de CXCR2 no núcleo das células.

Ainda, mostrar se DEK está envolvido nessa expressão anômala de CXCR2, nas linhagens de CAOVS, e por fim, avaliar tumores retirados de pacientes, para analisar se o mesmo fenótipo, encontrado *in vitro*, ocorre e assim propor o desenvolvimento de novos mecanismos de terapia e diagnóstico.

Com os dados desse trabalho, em conjunto com experimentos futuros, acreditamos contribuir para a clínica do câncer de ovário seroso de alto grau, com o desenvolvimento de novo alvo terapêutico e diagnóstico.

8. REFERÊNCIAS

- ABULAITI, Y. SHINTANI, S. FUNAKI, T. NAKAGIRI, M. INOUE, N. *et al.* Interaction between non-small-cell lung cancer cells and fibroblasts via enhancement of TGF-beta signaling by IL-6, *Lung Cancer* 82 (2), 204–213, 2013.
- ACKER G, ZOLLFRANK J, *et al.* The CXCR2/CXCL2 signalling pathway – A alternative therapeutic approach in high-grade glioma. *European J. of Cancer*. 126, 106-115, 2020.
- AGARWAL R., KAYE S. B. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 502–516, 2003.
- AIKINS AR, KIM M, RAYMUNDO B, KIM CW. Downregulation of transgelin blocks interleukin-8 utilization and suppresses vasculogenic mimicry in breast cancer cells. *Experimental biology and medicine*; 242:573–583,2017.
- ARAKI S, OMORI Y, LYN D, SINGH RK, MEINBACH DM, SANDMAN Y, LOKESHWAR VB, LOKESHWAR BL. Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer. *Cancer Res*; 67:6854–62, 2007.
- BACON K, BAGGIOLINI M, BROXMEYER H, *et al.* Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res*; 22:1067–8, 2002.
- BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines–CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*; 55:97–179, 1994.
- BAGGIOLINI M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*; 392:565–8, 1998.
- BAIER PK, WOLFF-VORBECK G, EGGSTEIN S, *et al.* Cytokine expression in colon carcinoma. *Anticancer Res*; 25:2135–9, 2005.
- BARBIERI F, BAJETTO A, PORCILE C, *et al.* CXC receptor and chemokine expression in human meningioma: SDF1/CXCR4 signaling activates ERK1/2 and stimulates meningioma cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci*;1090:332–343, 2006.
- BATES RC, DELEO MJ, MERCURIO AM. The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis, *Exp. Cell Res*. 299 (2),315–324, 2004.
- BALKWILL F. Chemokine biology in cancer. *Seminars in Immunology*, 2003.
- BALKWILL FR. The chemokine system and cancer. *Journal of Pathology*, 2012.
- BIEDLER JL, RIEHM H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res*, 30: 1174-1184, 1970.
- BOHRER LR, SCHWERTFEGER KL. Macrophages promote fibroblast growth factor receptor-driven tumor cell migration and invasion in a CXCR2-dependent manner. *Mol Cancer Res*;10:1294–305, 2012

BOLLRATH J, PHESSÉ TJ, VON BURSTIN VA, T. *et al.* 130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis, *Cancer Cell* 15 (2), 91–102, 2009.

BOWTELL, D. D. The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer. *Nature Rev. Cancer*, v. 10, p. 803–808, 2010.

BUKHOLM IK, NESLAND JM, BORRESEN-DALE AL. Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients [see comments] *J Pathol*;190(1):15–19, 2000.

BURGER M, HARTMANN T, BURGER JA, SCHRAUFSTATTER I. KSHV-GPCR and CXCR2 transforming capacity and angiogenic responses are mediated through a JAK2-3-dependent pathway. *Oncogene*; 24:2067–2075, 2005.

BRUYÈRE, C., MIJATOVIC, T., LONEZ, C., SPIEGL-KREINECKER, S., BERGER, W., KAST, R. E. LEFRANC, F. Temozolomide-induced modification of the CXCR2 chemokine network in experimental gliomas. *International Journal of Oncology*, 38(5), 1453–1464, 2011.

CAPITANO ML, MOR-VAKNIN N, SAHA AK, *et al.* Secreted nuclear protein DEK regulates hematopoiesis through CXCR2 signaling. *J. Clin. Invest.* 129(6): 2555-2570, 2019.

CARONNI N SAVINO B RECORDATI C VILLA A LOCATI M BONECCHI R. Cancer and chemokines. *Methods in Molecular Biology*, 2016.

CHAFFER CL, BRENNAN JP, SLAVIN JL, BLICK T, *et al.* Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res*; 66(23):11271–11278, 2006.

CHAKRABARTI S AND PATEL K D. Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 78(1), 279-288, 2005.

CHANG Q, BOURNAZOU E, SANSONE P, *et al.* The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis, *Neoplasia* 15 (7), 848–862, 2013.

CHEN MC, BASKARAN R, LEE NH, HSU HH, HO TJ, TU CC *et al.* CXCL2/CXCR2 axis induces cancer stem cell characteristics in CPT-11-resistant LoVo colon cancer cells via Gai-2 and Gaq/11. *J Cell Physiol.* 1(13), 2018.

CHINTHARAPAI A, KIM KJ. Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. *J Immunol*, 155 (5) 2587-2594

CLARK AG, VIGNJEVIC DM. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol*; 36:13–22, 2015.

COPERCHINI F, CROCE L, MARINO M, CHIOVATO L, ROTONDI M. Role of chemokine receptors in thyroid cancer and immunotherapy. *Endocrine-related Cancer* V26(8), pg. 465-478, 2019.

CUI, H., SONG, R., WU, J. MicroRNA-337 regulates the Pi3K/Akt and wnt/beta-catenin signaling pathways to inhibit hepatocellular carcinoma progression by targeting high-mobility group at-hook2. *Am. J. Cancer Res.*8, 405–421, 2018.

DALTON WS, CROWLEY JJ, SALMON SS, et al. A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group study. *Cancer.*75:815–20, 1995.

DARASH-YAHANA M, PIKARSKY E, ABRAMOVITCH R, ZEIRA E *et al.* Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB Journal*, 2004

DAS M, LW S. Role of tumor microenvironment in cancer stem cell chemoresistance and recurrence. *The Inter. J. of Bioch. & Cell Biology.* 103, 115-124, 2018.

DEVALARAJA MN, WANG DZ, BALLARD DW, RICHMOND A. Elevated constitutive I κ B kinase activity and I κ B- α phosphorylation in Hs294T melanoma cells lead to increased basal MGSA/GRO- α transcription. *Cancer Res*; 59:1372–1377, 1999.

DESURMONT T, SKRYPEK N, DUHAMEL A, et al. Overexpression of chemokine receptor CXCR2 and ligand CXCL7 in liver metastases from colon cancer is correlated to shorter disease-free and overall survival. *Cancer Sci*; 106:262–269, 2015.

DOERSCHUK CM. The role of CD18-mediated adhesion in neutrophil sequestration induced by infusion of activated plasma in rabbits. *Am J Pathol.*149(3):963-73, 1996.

DONG C, YONGFU Z, JINGCHAO X. Activated CXCL5-CXCR2 axis promotes the migration, invasion and EMT of papillary thyroid carcinoma cells via modulation of b-catenin Pathway. *Biochimie* 148, 2018.

DU, L., WANG, H., HE, L., ZHANG, J., NI, B., WANG, X, et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6751–6760, 2008.

FISHER GA, LUM BL, HAUSDORFF J, SIKIC BI. Pharmacological considerations in the modulation of multidrug resistance. *Eur J Cancer*; 32A:1082–8, 1996.

FRANKEN NAP, RODERMOND HM, STAP, J et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1, 2315-2319, 2006.

FRIEDLANDER, M., TRIMBLE, E., TINKER, A. et al. Clinical trials in recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 21: 771–775, 2011.

GABELLINI C, TRISCIUOGGIO D, DESIDERI M, *et al.* Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression. *Eur J Cancer*; 45:2618–27, 2009.

GAO M, HERLINGER AL, WU R, et al. NAC1 attenuates BCL6 negative autoregulation and function as a BCL6 coactivator of FOXQ1 transcription in cancer cells. *Aging*. 12: 9275-9291, 2020.

GARTUNG A, YANG J, SUKHATME VP, et al. Suppression of chemotherapy-induced cytokine/lipid mediator surge and ovarian cancer by a dual COX2/sEH inhibitor. *PNAS*, 116(5), 1698-1703, 2019.

GIRI D, OZEN M, ITTMANN M. Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer, *Am. J. Pathol.* 159 (6), 2159–2165, 2001.

GREPIN R, GUYOT M, GIULIANO S, et al. The CXCL7/CXCR1/2 axis is a key driver in the growth of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res*; 74(3), 2014.

GUERREIRO R, SANTOS-COSTA Q, AZEVEDO-PEREIRA J.M. As quimionas e os seus receptores. *Acta Med Port* ; 24: 967-976, 2011.

GUHA S, EIBL G, KISFALVI K, et al. Broad-spectrum G protein-coupled receptor antagonist, [d-Arg1,d-Trp5,7,9,Leu11]SP: a dual inhibitor of growth and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Res*; 65:2738–2745, 2006.

GURZU S, KOBORI L, FODOR D, JUNG I. Epithelial mesenchymal and endothelial mesenchymal transitions in Hepatocellular carcinoma: A review. *BioMed Res. Int.* 2019.

HAGHNEGAHDAR H, DU J, WANG D, et al. The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma *J. Leukoc. Biol.*, 67 (1), pp. 53-62, 2000.

HAMMOND ME, LAPOINTE GR, FEUCHT PH, et al. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol*, 155 (3) 1428-1433, 1995.

HUIPING C, KRISTJANSDOTTIR S, JONASSON JG, et al. Alterations of E-cadherin and beta-catenin in gastric cancer. *BMC Cancer* 1: 16, 2001.

HUANG, E. H., HYNES, M. J., ZHANG, T., GINESTIER, C., DONTU, G., APPELMAN, H., ... BOMAN, B. M. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Research*, 69(8), 3382–3389, 2009.

HWANG WL, YANG MH, TSAI ML, et al. SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells, *Gastroenterology* 141 (1), 279–291 291, 2011.

JABLONSKA J, WU CF, ANDZINSKI L, LESCHNER S, WEISS S. CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN-beta. *International journal of cancer*; 134:1346–1358,2014.

JAWHARI A, JORDAN S, POOLE S, et al. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin–catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterology* 112: 46–54, 1997.

JEFFERS MD, PAXTON J, BOLGER B, et al. E-cadherin and integrin cell adhesion molecule expression in invasive and in situ carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 64: 481–486, 1997.

JUFFERMANS NP, DEKKERS PE, PEPPELENBOSCH MP, et al. Expression of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 on granulocytes in human endotoxemia and tuberculosis: involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Infect Dis*; 182:888–894, 2000.

JUNG K HEISHI T, INCIO J, HUANG Y, BEECH EY, et al. Targeting CXCR4-dependent immunosuppressive Ly6Clow monocytes improves antiangiogenic therapy in colorectal cancer. *PNAS*, 2017.

KESSEL & WODINSKY. Uptake and Retention of Daunomycin by Mouse Leukemic Cells as Factors in Drug Response. *Cancer Research*, 2,938-941, 1968.

KNALL C, WORTHEN GS, JOHNSON GL. Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 94 (7), 3052-3057, 1997.

KNALL C, YOUNG S, NICK JA, et al. Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem*; 271:2832–8, 1996.

KUO M. T., CHEN H. H., SONG I. S., SAVARAJ N., ISHIKAWA T. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 71–83, 2007.

KELLAND L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 573–584, 2007

KRAMER CD, GENCO CA. Microbiota, immune subversion, and chronic inflammation. *Front Immunol*; 8:255, 2017.

KORTYLEWSKI M, HEINRICH PC, MACKIEWICZ A, U. et al. Interleukin-6 and oncostatin induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1, *Oncogene* 18 (25), 3742–3753, 1999.

KWOK WK, LING MT, LEE TW, et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res*; 65(12):5153–5162, 2005.

LESINA M, KURKOWSKI MU, LUDES K, M. et al. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer, *Cancer Cell* 19 (4), 456–469, 2011.

LIANG B, ZHAO H, CHE JB, WANG HJ, SHI GN. Overexpression of interleukin-8 receptor 2 (IL-8R2) indicates better prognosis in esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma procession. *Med Onco*; 31:89, 2014.

LIHUA, P., CHEN, X.Y., AND WU, T. Topotecan for ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*.2, 2008

LINDEMANN K, GAO B, MAPAGU C, et al. Response rates to second-line platinum-based therapy in ovarian cancer patients challenge the clinical definition of platinum resistance. *Elsevier*. 150(2), 239-246, 2018

LIN, C. W., LIAO, M. Y., LIN, W. W., WANG, Y. P., LU, T. Y., & WU, H. C. Epithelial cell adhesion molecule regulates tumor initiation and tumorigenesis via activating reprogramming factors and epithelial mesenchymal transition gene expression in colon cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39449–39459, 2012.

LING, V., AND THOMPSON, L. H.Reduced permeability of CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J. Cell. Physiol*.83, 103–116, 1974.

LIU P, LI X, LV W, XU Z. Inhibition of CXCL1-CXCR2 axis ameliorate cisplatin-induced acute kidney injury by mediating inflammatory response. *Biomed Pharmacother*, 122, 2020.

LIU G, AN L, ZHANG H, DU P; SHENG Y. Activation of CXCL6/CXCR1/2 Axis Promotes the Growth and Metastasis of Osteosarcoma Cells in vitro and in vivo. *Front. Pharmacol*. 10:307.2019.

LOKSHIN AE, WINANS M, LANDSITTEL D, et al. Circulating IL8 and anti IL8 autoantibody in patients with ovarian cancer. *Gynecologic Onc*. 102, 224-251, 2006.

LUTTICKEN C, WEGENKA UM, YUAN J, C. *et al.*, Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130, *Science* 263 (5143), 89–92, 1994.

MANA T, KAORU A, TSUKASA B, JUNZO H, KEN YI, RYUSUKE M, KOJI Y, NAOKI H, YUKO H et al. Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation. *Nat Commun*; 9: 1685, 2018.

MESTAS J, BURDICK MD, RECKAMP K, et al. The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. *J Immunol*; 175:5351–7, 2005.

MURPHY PM, BAGGIOLINI M, CHARO IF, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*; 52:145–76, 2000.

MULLER A, HOMEY B, SOTO H, GE N, CATRON D, BUCHANAN ME, MCCLANAHAN T, MURPHY E, YUAN W, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*; 410:50–6, 2001.

MURPHY CR, SEATON A, MAXWELL P, *et al.* CXCR2/NF-kappaB/Bcl-2-survivin signalling pathway promotes resistance to oxaliplatin in metastatic prostate cancer cells *Cancer Res*, 66, 2006.

NAGARSHETH N WICHA MS ZOU W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews: Immunology*, 2017.

NANNURU KC, SHARMA B, VARNEY ML, AND SINGH RK. Role of chemokine receptor CXCR2 expression in mammary tumor growth, angiogenesis and metastasis. *J Carcinog*. 10: 40, 2011

NING Y, MANEGOLD PC, HONG YK, ZHANG W, POHL A, LURGE G *et al.* Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer*. 128(9), 2038-2049, 2011.

NISHI T, TAKEUCHI H, MATSUDA S, OGURA M, KAWAKUBO H, *et al.* CXCR2 expression and postoperative complications affect long-term survival in patients with esophageal cancer. *World J Surg Oncol*; 13:232, 2015.

OHRI CM, SHIKOTRA A, GREEN RH, *et al.* Chemokine receptor expression in tumor islets and stroma in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*; 10:172–81, 2010.

OKANO, M., KONNO, M., KANO, Y., KIM, H., KAWAMOTO, K., OHKUMA, *et al.* Human colorectal CD24+ cancer stem cells are susceptible to epithelial - mesenchymal transition. *International Journal of Oncology*, 45(2), 575–580, 2014.

PALENA C, HAMILTON DH, FERNANDO RI. Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol*. 8(6), p. 713-722, 2013.

PASQUIER J, GOSSET M, GEYL C, *et al.* CCL2/CCL5 secreted by stroma induce IL-6/PYK2 dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Molecular Cancer*, 17 (47), 2018.

PEREZ-MORENO M, JAMORA C, FUCHS E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112: 535 –548, 2003.

PIERRE SAINTIGNY, ERMINIA MASSARELLI, STEVEN LIN, YULONG CHEN, *et al.* CXCR2 expression in tumor cells prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 15; 73(2): 571–582, 2013.

PIGNATA S, CECERE SC, BOIS AD, HEITZ F. Treatment of recurrent ovarian cancer. *Annals of Oncology*. 28(8), 51-56, 2017.

QIAO B, LUO W, LIU Y, WANG J, *et al.* The prognostic value of CXC chemokine receptor 2 (CXCR2) in cancers: a meta-analysis. *Oncotarget*.; 9(19): 15068–15076, 2018.

REILAND J, FURCHT LT, MCCARTHY JB. CXC-chemokines stimulate invasion and chemotaxis in prostate carcinoma cells through the CXCR2 receptor. *Prostate*; 41:78–88, 1999.

ROBAK P, DROZDZ I, SZEMRAJ J, et al. Drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Treatment Reviews*. 70, 199-208, 2018.

RODRIGUEZ-VICIANA P, WARNE PH, DHAND R, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*; 370:527–32, 1994.

ROTONDI M CHIOVATO L ROMAGNANI S SERIO M ROMAGNANI P. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocrine Reviews*, 2007.

ROTONDI M CHIOVATO L. The chemokine system as a therapeutic target in autoimmune thyroid diseases: a focus on the interferon- γ inducible chemokines and their receptor. *Current Pharmaceutical Design*, 2011.

SAI J, WALKER G, WIKSWO J, RICHMOND A. The IL sequence in the LLKIL motif in CXCR2 is required for full ligand-induced activation of Erk, Akt, and chemotaxis in HL60 cells. *J Biol Chem*; 281:35931–35941, 2006..

SHARMA B, VARNEY ML, SAXENA S, WU L, SINGH RK. Induction of CXCR2 ligand, stem cell-like phenotype, and metastasis in chemotherapy-resistant breast cancer cells. *Cancer Lett*. 372(2) pg. 192-200, 2016

SHARIF GM, SCHMIDT MO, YI C, et al. Cell growth density modulates cancer cell vascular invasion via Hippo pathway activity and CXCR2 signaling. *Oncogene*, 34 (48), pp. 5879-5889, 2015.

SIKIC BI. Modulation of multidrug resistance: at the threshold. *J Clin Oncol*. 11:1629–35, 1993.

SINGH S, SADANANDAM A, NANNURU KC, et al. Small-molecule antagonists for CXCR2 and CXCR1 inhibit human melanoma growth by decreasing tumor cell proliferation, survival, and angiogenesis. *Clin Cancer Res*; 15:2380–2386, 2009.

STADTMANN A, ZARBOCK A. CXCR2: from bench to bedside. *Front Immunol*. 2012.

STEVEN G, VANDAMME N, VAN P, VLIERBERGHE GEERTBERX. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*; 1868(2), pg 584-591; 2017.

SU L ZHANG J XU H WANG Y CHU Y LIU R XIONG S. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clinical Cancer Research*. 2005

SUNAHARA RK, DESSAUER CW, GILMAN AG. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 36:461–80, 1996.

TAKI M, ABIKO K, BABA T. et al. Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation. *Nat Commun.* 9 (1685), 2018.

TUMMALA M. K., MCGUIRE W. P. Recurrent ovarian cancer. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 3, 723–736, 2005

TOMIDA, A. & TSURUO, T. Drug resistance mediated by cellular stress response to the microenvironment of solid tumors. *Anticancer Drug Des.* 14, 169–177, 1999.

VENKATAKRISHNAN G, SALGIA R, GROOPMAN JE. Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. *J Biol Chem*; 275:6868–75, 2000.

WANG B, HENDRICKS DT, WAMUNYOKOLI F, PARKER MI. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res*; 66:3071–3077, 2006.

WANG Y, LIU J, JIANG Q, DENG J, XU F, et al. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell-Secreted CXCL1 and CXCL8 Facilitate Breast Tumor Growth by Promoting Angiogenesis. *Stem cells*; 35:2060–2070, 2017

WEI ZW, XIA GK, WU Y, CHEN W, XIANG Z, et al. CXCL1 promotes tumor growth through VEGF pathway activation and is associated with inferior survival in gastric cancer. *Cancer Lett*; 359:335–343, 2015.

WEN J, ZHAO Z, HUANG L, et al. IL8 promotes cell migration through regulating EMT by activating the Wnt/b-catenin pathway in ovarian cancer. *J Cell Mol Med.* 24: 1588-1598, 2020.

WILLIAMS SA HARATA-LEE Y COMERFORD I ANDERSON RL SMYTH MJ MCCOLLS R. Multiple functions of CXCL12 in a syngeneic model of breast cancer. *Molecular Cancer*, 2010

WHITE JR, LE J, YOUNG PR, et al. Identification of a Potent Selective Non-peptide CXCR2 Antagonist That Inhibits IL-8-induced Neutrophil Migration. *J. of Biol. Chemistry*, 273, 1998.

WEI LY, LEE JJ, YEY CY. Reciprocal activation of cancer-associated fibroblasts and oral squamous carcinoma cells through CXCL1. *Oral oncology.* 88, 115-123, 2019.

XU M, JIANG H, WANG H, et al. SB225002 inhibits prostate cancer invasion and attenuates the expression of BSP, OPN and MMP2. *Oncol Rep*; 40(2). 2018.

YANAGAWA J, WALSER TC, ZHU LX, et al. Snail promotes CXCR2 ligand-dependent tumor progression in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, 15:6820–6829, 2009.

YANAGAWA J, WALSER TC, ZHU LX, HONG L, FISHBEIN MC, MAH V, CHIA D, et al. Snail promotes CXCR2 ligand-dependent tumor progression in NSCLC. *Clin Cancer Res.* 15(22), 6820-6829, 2010.

YANG G, ROSEN DG, LIU G, *et al.* CXCR2 promotes ovarian cancer growth through dysregulated cell cycle, diminished apoptosis, and enhanced angiogenesis. *Clin Can Res*; 16:3875–86, 2010.

ZARBOCK A, LEY K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol*; 172:1–7, 2008.

ZIVKOVIC M, POLJAK-BLAZI M, ZARKOVIC K, *et al.* Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16-F10, *Cancer Lett.* 246 (1–2), 100–108, 2007.

ZHAO BC WANG ZJ MAO WZ MA HC HAN JG ZHAO B XU HM. CXCR4/SDF-1 axis is involved in lymph node metastasis of gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 2011.

ZHAO, B. OU, D. HAN, P. WANG, Y. ZONG, C. ZHU, *et al.* Tumor-derived CXCL5 promotes human colorectal cancer metastasis through activation of the ERK/Elk-1/Snail and AKT/GSK3beta/beta-catenin pathways, *Mol. Canc*, 66, 2017.

ZHAO, M., XU, P., LIU, Z., *et al.* Dual roles of mir-374A by modulated C-Jun respectively targets ccnd1-inducing Pi3K/Akt signal and pten-suppressing Wnt/Beta-catenin signaling in non-small-cell lung cancer. *Cell Death Dis.*9:78, 2018.



The CXCR2-SNAIL Axis: Is this a Novel Anti-Tumor Therapeutical Target for Cancer Cells Undergoing Epithelial-Mesenchymal Transition Process?

Taciane Barbosa Henriques¹, Diandra Zipinotti dos Santos¹, Mariam F. Hakeem-Sanni⁵, Ian Victor Silva^{1,3}, Leticia Batista Azevedo Rangel^{1,2,4*}

¹Biotechnology Program/RENORBIO, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil; ²Biochemistry and Pharmacology Program, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil; ³Morphology Department, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil; ⁴Pharmaceutical Sciences Department, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil; ⁵University of Sydney, Sydney, Australia

ABSTRACT

The epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in the progression of cancers, metastasis and drug resistance. Several factors are known to mediate EMT-driven drug resistance in cancer cells, among them the tumor microenvironment (TME). This phenomenon has gained attention in the field of cancer biology for its potential contribution to in the progression of carcinomas. It is also known that tumor cells experiencing EMT increases the secretion of specific factors in the TME, including cytokines, chemokines and growth factors, which can play an important role in tumor progression. The main event in EMT is the repression of E-cadherin driven by transcriptional factors including SNAIL, SLUG and ZEB1. Chemokines function as growth factors, activating, through its receptor CXCR2 and transcription factors such as SNAIL, thus inducing the EMT phenotype, contributing to the progression of the disease. Studies have investigated how the acquisition of mesenchymal characteristics could contribute to the development of a tumor microenvironment, and point to a possible link between the CXCR2 pathway and EMT. This review describes the mechanism by which CXCR2 is involved in EMT through SNAIL, contributing to progression of cancer and summarizes new advances in the research of EMT-associated CXCR2.

Keywords: Tumor Microenvironment; Epithelial-Mesenchymal Transition; CXCR2; SNAIL

Introduction

Despite significant advances in research to improve early diagnosis and treatment of patients with cancer, chemoresistance remains a determining factor for treatment failure, contributing to metastasis, which is the main cause of mortality from the disease. Metastasis is responsible for 90% of approximately 600,000 cancer related deaths each year in the United States [1,2]. Response to therapy varies between patients. Significant proportion of patients will ultimately develop

disease recurrence, associated with chemoresistance. Thus, chemoresistance and the ability of tumor cells to metastasize are very important drivers in disease progression. Therefore, cancer drug resistance will be a key factor to determine the success of the upcoming targeted therapy drugs. Traditionally, the resistance phenotype has been associated with changes in the cell death pathway, increased DNA repair, changes in checkpoints that occur during the cell cycle, changes in the intracellular signaling pathways and epithelial-mesenchymal transition (EMT) have traditionally been implicated in promoting a resistance phenotype [3,4]. However, the tumor microenvironment has received increasing attention, since there is a functional interaction between tumor cells and adjacent cells through secreted factors, such as cytokines and chemokines, which play an essential role in tumor initiation and progression. Chemokines of the CXC family, such as CXCL6, CXCL8 and CXCL2, have already been associated with chemoresistance and metastasis from breast and ovarian cancer by promoting the migration of myeloid cells to the tumor [5,6]. However, it is known that these chemokines play their role by binding to the CXCR2 receptor, whose expression is related to a metastatic potential, modulation of angiogenesis and resistance in other types of cancer such as melanoma [7], colon [8] and lung [9]. CXCR2 is expressed in a variety of tumor cells, including breast, melanoma, pancreas and ovary, and these cancers have a high capacity to metastasize. CXCR2 appears to be involved in tumorigenesis via several signaling pathways in cancer, such as ERK1/2, PI3K/AKT, MAPK and NF-KB [10-12]. Recent studies have reported the association of CXCR2 in the mesenchymal epithelium transition, where the increased expression of SNAIL, a mesenchymal marker, induces the expression of chemokines such as CXCL1 and CXCL2, and the blocking of this receptor

decreases the expression of SNAIL thus decreasing proliferation and consequently metastasis and angiogenesis [6]. EMT is an important factor for cancer progression, better understanding its role and the relationship of the tumor microenvironment in this context is crucial to contribute to the fight against cancer. Thus, this review focuses particularly on the interaction of CXCR2 and its ligands in the phenomenon of EMT, contributing to cancer progression.

Epithelial-mesenchymal transition

The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process in which cells lose cell-cell adhesion, polarity and transition to mesenchymal cells with reduced cell interactions and increased migratory capacity. EMT is involved in numerous biological and pathological processes, including embryonic development, wound healing, cancer cell metastasis and drug resistance. [13,14]. EMT is characterized by an increase in the expression of mesenchymal markers such as Vimentin, SNAIL, SLUG, β -catenin and loss of epithelial markers such as E-cadherin [15]. This phenomenon promotes the acquisition of a fibroblastic type morphology by epithelial cells, resulting in greater mobility and invasiveness of tumor cells, greater metastatic propensity and resistance to chemotherapy, radiation and certain therapies directed at small molecules [15,16]. It is also known that tumor cells undergoing EMT increase the secretion of specific factors, including cytokines, chemokines, and growth factors, which can play an important role in tumor progression. The EMT process is correlated with the remodeling of the extracellular matrix, changes in the stroma, angiogenesis, invasion, migration and infiltration of immune cells [17,18]. Furthermore, EMT has been studied extensively in cancer, and is believed to play a crucial role in invasion, metastasis, chemoresistance and processes that are involved in cancer cell aggressiveness.

Several signaling pathways including AKT-mTOR [19], MAPK/ERK [20], are involved in EMT that lead to the activation of EMT transcription factors (EMT-TFs). SNAIL (SNAI1, also known as SNAIL and SNAI2, also known as SLUG) is considered a key transcription factor regulating EMT [18]. These EMT-TFs bind to specific DNA sequences, such as E-box to regulate EMT-target genes. SNAIL is also one of the main transcriptional repressors of E-cadherin, by binding to the proximal region of the E-cadherin promoter, it plays a fundamental role in tumor progression [18,21]. E-cadherin assists in suppressing tumor invasion and its function is necessary for the maintenance of stable adherent junctions and for the polarity of epithelial cells [22]. The altered expression of this epithelial marker is correlated with cell de-differentiation, increased local invasion and metastatic disease in different types of cancer including, breast, gastric and colon [22-24]. EMT-TFs are also known to promote cancer drug resistance. TGF β , a well-studied EMT-related cytokine, has been associated with drug resistance [25]. Overexpression of Twist, another EMT-TF induces EMT and promotes resistance in colorectal cancer cells [26]. Additionally, other EMT-TFs, such as SLUG and ZEB, is reported to be related to drug resistance [27,28].

Tumor microenvironment is also a factor mediating EMT-driven drug resistance. SNAIL induces intratumor traffic of myeloid-derived suppressor cells through the positive regulation of CXCR2 ligands, in addition to inducing other immunosuppressive cells such as T cells [21,30]. SNAIL is largely related to tumor immunity, it positively regulates the expression of chemokines, such as CXCL1 and CXCL2, it improves the infiltration of suppressor cells into the tumor, via CXCR2 and inhibits anti-tumor immunity whilst promoting progression [6].

Family of CXC chemokines and CXCR2 receptor in the tumor microenvironment

The various components of the tumor microenvironment actively participate in different tumor processes and influences the initiation of tumors as well as their malignant progression, spread and response to therapies. Both tumor cells and stroma cells release cytokines, and chemokines, creating an inflammatory microenvironment. These molecules assist tumor progression as growth factors, promoting proliferation and angiogenesis, as well as modulators of the immune system which in turn favors tumor growth and blocks cellular mechanisms that help in the identification and destruction of the tumor [31-33]. In particular, the interaction of chemokines and their receptors mediate the traffic of immune cells into the tumor microenvironment, resulting in the recruitment and activation of different immune system cell types, such as macrophages and lymphocytes [32]. The immune cells that make up the tumor microenvironment undergo a process of co-optation by the tumor cells, which contributes to angiogenesis and proliferation. Three stages of this cooptation by immune cells are described as: the recruitment of immune cells via the production of cytokines and chemokines, the interaction of immune cells via the secretion of cytokines, which regulates differentiation in order to promote the tumor progression and the immune response in which cells generate cytokines, growth factors and proliferation-promoting agents [34]. The tumor-infiltrating immune cells determines the balance between antitumor and pro tumor responses [35].

The chemokine receptors and their ligands are primarily responsible for leukocyte migration under conditions of homeostasis, as well as during inflammation and carcinogenesis. These are part of the molecular mechanisms involved in the

survival, motility and invasion of tumor cells. One example is the chemokine receptor CXCR4, which is often overexpressed in malignant cells and by different types of tumors such as colorectal cancer, breast, liver and esophageal cancer, its expression in primary tumors correlates with frequent lymphatic metastasis [36-38].

CXCL6 is an inflammatory cytokine commonly produced in response to infection and stress. In cancer, it is one of the most abundant cytokines in the tumor microenvironment, including prostate, ovary, colon and breast cancer. It binds to its receptor CXCR1/2, activating the STAT3, PI3K and Wnt/ β -catenin signaling pathway, thus stimulating proliferation, activation of survival pathways, inducing EMT among other characteristics that contribute to tumor progression [39,40].

CXCL8 is a chemokine secreted by macrophages, endothelial and epithelial cells in response to infection or tissue damage, its effect is mediated through its connection with its CXCR2 receptor. The increased expression of the proangiogenic chemokine CXCL8 suggests that it may function as a significant regulatory factor within the tumor microenvironment [41]. This chemokine plays a crucial role in cell proliferation, migration, chemoresistance and survival. Its overexpression has been linked to a variety of tumors such as lung, prostate, ovary, breast and melanoma [42,43].

CXCL2 is an important factor in the chemoresistance and migration of breast cancer. In one study, the authors showed that CXCL2 expression increases as cells acquire a malignant phenotype and in response to Doxorubicin in breast cancer [5].

CXCR2 is a cell surface chemokine receptor coupled to protein G and having 7 transmembrane domains is normally found in neutrophils. It is also expressed in macrophages, endothelial cells, epithelial cells and multiple tumor cells, and can be induced by activated oncogenes. The function of CXCR2 has been primarily studied in leukocytes in association with inflammatory diseases and an immune response [43,44]. The receptors are named according to the type of chemokines that bind to it. The nomenclature refers to the number of cysteines, as well as their position. Being CXC, the two cysteines are separated by an unconserved amino acid. Several chemokines bind to this CXCR2 receptor, such as CXCL1, CXCL2, CXCL6 and CXCL8 [45-47].

Many studies to date have shown that CXCR2 contributes to chronic inflammation and pulmonary pathology, it is the target of studies in angiogenesis, tumorigenesis, chemosensitivity and metastasis in various types of cancer such as melanoma, colon, lung, ovary and prostate cancer [7-8,45]. Evidence through in vivo and in vitro studies indicate that metastatic infiltration of distant organs is mediated by chemokines and their receptors. Blocking this complex (ligand and receptor) reduces the development of metastases in various cancers, such as, colon [48], lung [49], colorectal [50], osteosarcoma [51] and gastric cancer [52].

Role of CXCR2 in the epithelial-mesenchymal transition via expression of SNAIL

The immune system has a fundamental role in preventing the progression of cancer; it is important in the line of defense against tumor development, demonstrating recently, efficiency in immunotherapy for some types of tumors [28]. However, the immune system can also contribute to tumor development through

chronic inflammation, suppressing anti-tumor adaptive immune response associated with an increased risk of cancer. An established tumor can also stimulate an inflammatory reaction that leads to the recruitment of a range of cell populations from the immune infiltrate in the tumor microenvironment [16,31]. During tumorigenesis, cancer cells, innate immune cells, such as dendritic cells or tumor-associated macrophages (TAMs), and cancer-associated fibroblasts (CAFs) or endothelial cells, produce a variety of cytokines and chemokines in response to the danger signals originating from the tumor. This prolonged reaction favors tumor cell survival and proliferation, immunosuppression and angiogenesis [28,29,31]. During metastatic progression, tumor cells undergo phenotypic changes, allowing the cells to adapt to the different microenvironment encountered. EMT appears as a major modulator during these phenotypic conversions. Thus, cancer-associated EMT and chronic inflammation involve a series of inflammatory mediators such as soluble factors, oxidative stress, or hypoxia and production of proinflammatory mediators, including cytokine, chemokines, and matrix metalloproteinases, which fuel the tumor [18,25,53]. Chemokines function as growth factors, activating through its receptor, CXCR2, transcription factors such as SNAIL, which induces the EMT phenotype and contributes to the progression of the disease. CXCR2 ligands function as chemokines to attract Myeloid-derived suppressor cell (MDSCs) to the tumor. SNAIL induce infiltration of suppressor cells, accelerating EMT and leading to tumor progression. Blocking this cycle using CXCR2 antagonist, appears to be a promising treatment strategy, as this inhibition suppressed recruitment of MDSCs to the tumor and inhibited progression, slowing down EMT [6,30,44].

Studies have investigated how the acquisition of mesenchymal characteristics could contribute to the development of a tumor microenvironment, and point to a possible link between the CXCR2 pathway and EMT [54,55]. One study showed positive regulation for CXCL8 in cells undergoing EMT, showing higher levels of CXCR1 and CXCR2 receptors, in colorectal carcinoma cells [44]. CXCL8 / CXCR1 blockade has been shown to decrease the migration of mesenchymal tumor cells [42-44]. Data from another study showed that EMT involves the induced expression of CXCL8 and its receptor CXCR1, and that these molecules function in the chemokinetic and chemotactic migration of cells after mesenchymal epithelium transition [43,44]. The author's further state that the induction of CXCL8 expression by tumor cells is associated with the transition process of these cancer cells, and other signaling pathways may be involved in the expression of chemokines when the receptor is inhibited, such as PI3k/AKT and MAPK. As an example, a study demonstrated that the interaction of CXCL1/CXCR2 induces activation of PI3K signaling. SNAIL phosphorylation mediated by PI3K, induced by CXCR2, promotes nuclear accumulation of SNAIL and, consequently, its repressive activity in the E-cadherin promoter, thus inducing EMT. Increasing evidence implies the contributions of EMT in the emergence of therapeutic failure and tumor recurrence. Consequently, blocking EMT induced by CXCL1 / CXCR2 successfully prevented post-chemotherapy relapse, showing to be a promising alternative to prevent cancer progression and recurrence [56,57].

Different studies have shown that cells resistant to different drugs, such as Paclitaxel and Doxorubicin, showed higher expression of EMT markers, such as vimentin and β -catenin, as well as lower expression of E-cadherin, through the overexpression of CXCL8/CXCR2. When this complex is inhibited, the expression

of the EMT markers is decreased. The authors believe that targeting CXCR2 signaling may help to overcome resistance to cancer therapy [55,58]. It was further demonstrated that overexpression of SNAIL led to increased tumor growth in vivo, associated with increased angiogenesis and high levels of CXCR2 ligands such as CXCL5 and CXCL8. It was suggested that SNAIL promotes CXCR2-mediated progression and angiogenesis and when blockade of CXCR2 occurs, tumor growth mediated by SNAIL is reduced [59,60]. SNAIL also induces trafficking in myeloid suppressor cells through positive regulation of CXCR2, and an analysis of ovarian cancer data from TCGA indicated that SNAIL is correlated with many chemokines, including CXCR2 ligands [61]. Overexpression of SNAIL has also been shown to induce secretion of CXCL8. Although CXCL8 can be secreted by a variety of stromal cells, EMT pathways induce CXCL8 expression and secretion in tumor cells as shown in colorectal cancer cell lines. In this study, SNAIL has been shown to directly promote IL-8 transcription upon binding [62,63]. Blocking the CXCL8 signaling pathway in solid tumors can favor the clinical outcome, suppressing tumor growth, angiogenesis and EMT promoting activity through the CXCL8/CXCR2 pathway [63].

Discussion

It is important to note that the acquisition of a mesenchymal phenotype by tumor cells is a transient process and may involve some cells at the tumor-stroma interface. However, the epithelial-mesenchymal transition is still controversial, since studies have supported the idea that mesenchymal tumor cells are necessary for the return of the epithelial phenotype, once they have reached the site of metastasis. This transient nature of EMT raises the question of when an inhibition of CXCL8 signaling may be adequate to block or reverse the EMT

phenotype. The identification of EMT regulators can lead to combinatorial strategies that can more effectively prevent tumor metastases, and blocking the CXCR2 pathway appears to be an attractive strategy for decreasing tumor-promoting signs [64,65].

These results support the idea that SNAIL has a role in multiple functions, including the immune system and EMT, since chemokines can intrinsically regulate transcription factors such as SNAIL and SLUG, and these transcription factors control EMT. This leads us to conclude that CXCR2, as well as chemokines, has a fundamental role in resistance, which is directly associated with the epithelial-mesenchymal transition, and can therefore contribute to cancer metastasis. CXCR2 and its ligands can be a therapeutic target for tumors with high SNAIL expression. Thus, the importance of studying tumor protectors and promoters in the immune system and in the epithelial-mesenchymal transition process arises.

Conclusion

CXCR2 is associated with chemoresistance, tumor progression and the induction of EMT through increased SNAIL expression. This review provides insights into the mechanism that might link EMT to tumor immunity, suggesting that this complex may be a therapeutic target to contribute to cancer treatment, decreasing chemoresistance and EMT and consequently decreasing tumor progression.

Reference

1. Jo Y, Choi N, Kim K, Koo HJ, Choi J, Kim HN. (2018). Chemoresistance of Cancer Cells: Requirements of Tumor Microenvironment-mimicking In Vitro Models in Anti-Cancer Drug Development. *Theranostics*. 8(19):5259-5275.

2. <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>, Accessed in May, 05, 2020.
3. Becker, M., Levy, D. (2017). Modeling the Transfer of Drug Resistance in Solid Tumors. *Bull Math Biol.* 79, 2394–2412.
4. Gillet JP, Gottesman MM. (2010) Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol.* 596:47–76.
5. Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Kim, J., Morris, P.G. Massagué, J. (2012) A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell.* 150(1), 165–178.
6. Taki M, Abiko K, Baba T. et al. (2018) Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation. *Nat Commun.* 9(1685).
7. Gabellini C, Trisciuglio D, Desideri M, et al. (2009) Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression. *Eur J Cancer.* 45:2618–27.
8. Ohri CM, Shikotra A, Green RH, et al. (2010) Chemokine receptor expression in tumour islets and stroma in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 10:172–81.
9. Sharma B, Nawandar DM, Nannuru K, Varney ML, Singh R. (2013) Targeting CXCR2 enhances chemotherapeutic response, inhibits mammary tumor growth, angiogenesis and lung metastasis. *Mol. Cancer Ther.* 12(5).
10. Singh S, Sadanandam A, Nannuru KC, et al. (2009) Small-molecule antagonists for CXCR2 and CXCR1 inhibit human melanoma growth by

decreasing tumor cell proliferation, survival, and angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 15:2380–2386.

11. Devalaraja MN, Wang DZ, Ballard DW, Richmond A. (1999) Elevated constitutive I κ B kinase activity and I κ B- α phosphorylation in Hs294T melanoma cells lead to increased basal MGSA/GRO- α transcription. *Cancer Res.* 59:1372–1377.
12. Juffermans NP, Dekkers PE, Peppelenbosch MP, et al. (2002) Expression of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 on granulocytes in human endotoxemia and tuberculosis: involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Infect Dis.* 182:888–894.
13. Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
14. Turley EA, Veiseh M, Radisky DC, Bissell MJ. (2008) Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol.* 5(5):280-90.
15. Du B, Shim JS. (2016) Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules.* 21(7). pii: E965.
16. Goossens S, Vandamme N, Van Vlierberghe P, Berx G. (2017) EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 1868(2):584-591.
17. Dominguez C, David JM, Palena C. (2017) Epithelial-mesenchymal transition and inflammation at the site of the primary tumor. *Semin Cancer Biol.* 2017; 47:177-184.
18. Lamouille S, Xu J, Derynck R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(3):178-96.

19. Lamouille, S.; Connolly, E.; Smyth, J.W.; Akhurst, R.J.; Derynck, R. (2012) TGF-beta-induced activation of mTORcomplex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *J. Cell Sci.* 125, 1259
20. Grotegut, S.; von Schweinitz, D.; Christofori, G.; Lehenbre, F. (2006) Hepatocyte growth factor induces cellscattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J.* 25, 3534–3545.
21. Peinado H, Olmeda D, Cano A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 7(6):415-28.
22. Jawhari A, Jordan S, Poole S, et al. (1997) Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin–catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterology.* 112: 46–54.
23. Huiping C, Kristjansdottir S, Jonasson JG, et al. (2001) Alterations of E-cadherin and beta-catenin in gastric cancer. *BMC Cancer.* 1: 16.
24. Jeffers MD, Paxton J, Bolger B, Richmond JA, Kennedy JH, McNicol AM. (1997) E-cadherin and integrin cell adhesion molecule expression in invasive and in situ carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.* 64(3):481-6
25. Bate S RC, Deleo MJ, Mercurio AM. (2004) The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR-1-mediated chemotaxis, *Exp. Cell Res.* 299 (2),315–324.
26. Teicher, B.A.; Holden, S.A.; Ara, G.; Chen, G. (1996) Transforming growth factor-beta in vivo resistance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 37, 601–609
27. Wu, Y.Y.; Ginther, C.; Kim, J.; Mosher, N.; Chung, S.Y.; et al. (2012) Expression of Wnt3 activates Wnt/beta-catenin pathway and promotes

- EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 10, 1597–1606. [
28. Haslehurst, A.M.; Koti, M.; Dharsee, M.; Nuin, P.; Evans, K.; et al. (2012) EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer.* 12.
 29. Siebzehnruhl, F.A.; Silver, D.J.; Tugertimur, B.; Deleyrolle, L.P.; Siebzehnruhl, D.; et al. (2013) The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Mol. Med.* 5, 1196–121.
 30. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. (2009) Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell.* 15(3):195-206.
 31. Luo Z, Wang Q, Lau WB, Lau B, Xu L, Zhao L, et al. (2016) Tumor microenvironment: The culprit for ovarian cancer metastasis? *Cancer Lett.* 377(2):174-82.
 32. Jones VS, Huang RY, Chen LP, Chen ZS, Fu L, Huang RP. (2016) Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta.* 1865(2):255-65.
 33. Nash MA, Ferrandina G, Gordinier M, Loercher A, Freedman RS. (1999) The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocr Relat Cancer.* 6(1):93-107.
 34. Whiteside TL. (2008) The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene.* 6;27(45):5904-12.
 35. Balkwill FR. (2012) The chemokine system and cancer. *Journal of Pathology.*

36. Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A, Deschênes J, Sauter G, et al. (2006) The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast Cancer Res Treat.* 97(3):275-83.
37. Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang HJ, Kuo C, Foshag L, Bilchik AJ, Hoon DS. (2005) Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol.* 23(12):2744-53.
38. Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, Obonyo D, Wachowiak R, et al. (2005) Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 97(24):1840-7.
39. Kortylewski M, Heinrich PC, Mackiewicz A, U. et al. (1999) Interleukin-6 and oncostatin M induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1, *Oncogene.* 18 (25), 3742–3753.
40. Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, M. et al. (2011) Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer, *Cancer Cell.* 19 (4), 456–469.
41. Waugh DJ, Wilson C. (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *ClinCancer Res.* 14:6735– 6741.
42. Bollrath J, Phesse TJ, Von Burstin VA, T. et al. (2009) 130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis, *Cancer Cell.* 15 (2), 91–102.

43. Petering H, Götze O, Kimmig D, Smolarski R, Kapp A, Elsner J. (1999) The biologic role of interleukin-8: functional analysis and expression of CXCR1 and CXCR2 on human eosinophils. *Blood*. 93(2):694-702.
44. Boisvert WA, Rose DM, Johnson KA, Fuentes ME, Lira SA, et al. (2006) Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression. *Am J Pathol*. 168(4):1385-95.
45. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, et al. (2002) Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res*. 22:1067–8.
46. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*. 1994;55:97-179.
47. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, et al. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 52(1):145-76.
48. Baier PK, Wolff-Vorbeck G, Eggstein S, et al. (2005) Cytokine expression in colon carcinoma. *Anticancer Res*. 25:2135–9.
49. Su L Zhang J Xu H Wan G Y Chu Y Llu R Xlong S. (2005) Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clinical Cancer Research*.
50. Jung K Heishi T, Incio J, Huang Y, Beech EY, et al. (2017) Targeting CXCR4-dependent immunosuppressive Ly6Clow monocytes improves antiangiogenic therapy in colorectal cancer. *PNAS*.

51. Liu P, Li X, Lv W, Xu Z. (2020) Inhibition of CXCL1-CXCR2 axis ameliorate cisplatin- induced acute kidney injury by mediating inflammatory response. *Biomed Pharmacother.* 122.
52. Zhao BC Wang ZJ Mao WZ Ma HC Han JG Zhao B Xu HM. (2011) CXCR4/SDF-1 axis is involved in lymph node metastasis of gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology.*
53. Savagner P. (2001) Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays.* 23(10):912-23.
54. Wen J, Zhao Z, Huang L, et al. (2020). IL8 promotes cell migration through regulating EMT by activating the Wnt/b-catenin pathway in ovarian cancer. *J Cell Mol Med.* 24: 1588-1598.
55. Yanagawa J, Walser TC, Zhu LX, Hong L, Fishbein MC, Mah V, et al. (2010) Snail promotes CXCR2 ligand dependent tumor progression in NSCLC. *Clin Cancer Res.* 15(22), 6820-6829.
56. Kaufhold S, Bonavida B. (2014). Central Role of Snail1 in the Regulation of EMT and Resistance in Cancer: A Target for Therapeutic Intervention *J Exp Clin Cancer Res.* 33(1):62.
57. Sharma B, Varney ML, Saxena S, Wu L, Singh RK. (2016) Induction of CXCR2 ligand, stem cell-like phenotype, and metastasis in chemotherapy-resistant breast cancer cells. *Cancer Lett.* 372(2); 192-200.
58. Wen J, Zhao Z, Huang L, et al. (2020) IL8 promotes cell migration through regulating EMT by activating the Wnt/b-catenin pathway in ovarian cancer. *J Cell Mol Med.* 24: 1588-1598.

59. Gurzu S, Kobori L, Fodor D, Jung I. (2019) Epithelial mesenchymal and endothelial mesenchymal transitions in Hepatocellular carcinoma: A review. *BioMed Res. Int.*
60. Mana T, Kaoru A, Tsukasa B, Junzo H, Ken YI, et al. (2018) Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation. *Nat Commun.* 9: 1685.
61. David JM, Dominguez C, Hamilton DH, Palena C. (2016) The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance. *Vaccines (Basel).* 4(3).
62. Bates RC, De Leo MJ; Mercurio AM. (2004) The epithelial-mesenchymal transition of colon carcinoma involves expression of IL-8 and CXCR1-mediated chemotaxis. *Exp Cell Res.* 299, 315–324.
63. Hwang WL, Yang MH, Tsai ML, Lan HY, Su SH, Chang SC, Teng HW, Yang SH, Lan YT, Chiou S.H.; et al. (2011) SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology.* 141,279–291.
64. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, et al. (2006) Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res.* 66(23):11271–11278.
65. Palena C, Hamilton DH, Fernando RI. (2013) Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol.* 8(6), p. 713-722.