



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Henrique Tonelli

Análise da expressão de quimiocinas e de seus
receptores em linhagens celulares de carcinoma de
células escamosas oral

Henrique Tonelli

Análise da expressão de quimiocinas e de seus
receptores em linhagens celulares de carcinoma de
células escamosas oral

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para obtenção
do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta
Coorientador: Prof. Dra. Carine Ervolino de Oliveira

Este exemplar corresponde à versão final do
trabalho de conclusão de curso apresentado pelo
aluno Henrique Tonelli e orientado pelo Professor
Dr. Ricardo Della Coletta.

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/25783-0.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marlene Girello - CRB 8/6159

T612a Tonelli, Henrique, 1994-
Análise da expressão de quimiocinas e de seus receptores em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas oral / Henrique Tonelli. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Ricardo Della Coletta.

Coorientador: Carine Ervolino de Oliveira.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Quimiocinas. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Proliferação celular. I. Della Coletta, Ricardo, 1972-. II. Oliveira, Carine Ervolino de, 1984-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais complementares

Título em outro idioma: Analysis of chemokine expression and its receptors in oral squamous carcinoma cell lines

Palavras-chave em inglês:

Chemokines

Carcinoma, squamous cell

Cell proliferation

Área de concentração: Patologia

Títuloção: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 01-10-2018

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Ricardo Della Coletta e à Professora Doutora Carine Ervolino de Oliveira por toda a orientação, ensinamentos e supervisões ao laboratório e nas pesquisas. Agradeço também pelos direcionamentos e possibilidade em apresentar os resultados finais em congressos, resultando em premiações, que considero ser de toda equipe.

RESUMO

Embora diferentes estudos tenham relatado o papel das quimiocinas e de seus receptores em diferentes estágios do desenvolvimento e progressão tumoral, os padrões de expressão e seus efeitos sobre os carcinomas de células escamosas oral ainda não estão completamente esclarecidos. Os objetivos deste estudo foram avaliar o padrão de expressão das quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5, CCL19, CCL21 e CXCL12 e de seus receptores de superfície CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 e CXCR4 em diferentes linhagens de CEO e determinar os efeitos de CCL5 sobre a proliferação celular. Para alcançar estes objetivos, os níveis de expressão das quimiocinas e de seus receptores foram avaliados nas linhagens de CEO SCC-9, SCC-15, SCC-25, HSC-3 e SCC-9 ZsGreen LN-1 e na linhagem de queratinócitos normais HGK por meio de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) e os efeitos das diferentes concentrações da proteína CCL5 recombinante (0, 1 e 3 ng/ml) na proliferação celular foram analisados pelo índice de incorporação de bromodeoxiuridina (BrDU). Os resultados demonstraram um padrão bastante variado entre as linhagens celulares de CEO quanto a expressão das quimiocinas, com níveis maiores de expressão de CCL5 pelas células SCC-9, SCC-25 e HSC-3 em relação a linhagem controle. Similarmente, os níveis de expressão dos receptores foram variados e as linhagens SCC-9, SCC-25 e SCC-9 ZsGreen LN-1 demonstraram maiores níveis de expressão de CCR5 que a linhagem HGK. Independente dos níveis de expressão de CCL5 e CCR5, CCL5 induziu significativamente a proliferação de todas as linhagens celulares de CEO, com exceção da linhagem HSC-3. Nossos resultados sugerem que as quimiocinas e seus receptores, com destaque para CCL5, podem contribuir para o desenvolvimento e progressão dos CEO.

Palavras-chave: Quimiocinas. Receptores. Carcinoma de células escamosas oral. Proliferação celular.

ABSTRACT

Although different studies have reported the role of chemokines and their receptors in different stages of tumor development and progression, the patterns of expression and their effects on oral squamous cell carcinomas (OSCC) have not yet been fully elucidated. The aims of this study were to evaluate the pattern of expression of chemokines CCL3, CCL4, CCL5, CCL19, CCL21 and CXCL12 and their surface receptors CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 and CXCR4 in different OSCC cell lines, and to evaluate CCL5 effects on cell proliferation. To achieve these goals, the levels of expression of chemokines and their receptors were evaluated on SCC-9, SCC-15, SCC-25, HSC-3 and SCC-9 ZsGreen LN-1 OSCC cells and on HGK, a normal keratinocyte cell line, by quantitative RT-PCR (qRT-PCR), and the effects of different concentrations of CCL5 recombinant protein (0, 1 and 3 ng/ml) on cell proliferation were analyzed by bromodeoxyuridine incorporation indices (BrDU). The results demonstrated a variable pattern of chemokine expression among OSCC cells, with higher levels of CCL5 in SCC-9, SCC-25 and HSC-3 cells compared to control cells. Similarly, the expression levels of receptors did not follow a clear pattern, but SCC-9, SCC-25 and SCC-9 ZsGreen LN-1 cells demonstrated higher levels of CCR5 expression than normal keratinocytes. Regardless CCL5 and CCR5 expression levels, CCL5 induced significantly the proliferation of all OSCC cell lines, with exception of HSC-3. Our results suggest that chemokines and their receptors, especially CCL5, may contribute to the development and progression of OSCC.

Keywords: Chemokine. Receptors. Oral squamous cell carcinomas. Cell proliferation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
	2.1 Carcinoma de células escamosas oral	11
	2.2 Quimiocinas e seus receptores	13
3	OBJETIVO	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	18
	4.1 Cultura de Células	18
	4.2 Análise da Expressão Gênica por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)	19
	4.2.1 Isolamento de RNA Total	19
	4.2.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)	19
	4.2.3 Reação de qRT-PCR	20
	4.3 Análise da proliferação celular	21
	4.4 Análise estatística	21
5	RESULTADOS	21
	5.1 Expressão das quimiocinas nas linhagens celulares de CEO	21
	5.2 Expressão dos receptores de quimiocinas nas linhagens de CEO	23
	5.3 Efeito de CCL5 na proliferação celular	24
6	DISCUSSÃO	26
7	CONCLUSÃO	28
8	REFERÊNCIAS	28
	ANEXOS	34
	ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO	34

ANEXO 2 – INICIAÇÃO CIENTÍFICA	35
--------------------------------	----

2 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas oral (CEO), também conhecido como carcinoma espinocelular ou carcinoma epidermóide, tem sua origem a partir dos queratinócitos que revestem a cavidade oral. É o tumor maligno mais frequente em boca, representando mais de 90% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral e cerca de 4% das neoplasias malignas em todo o mundo (Marsh et al., 2011). Mais de 400 mil casos novos de CEO são diagnosticados anualmente e a Organização Mundial de Saúde espera um aumento global na incidência para as próximas décadas (Warnakulasuriya, 2009). Como uma característica comum a todos os processos neoplásicos, o CEO é o resultado de um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas capazes de promover a expressão e função aberrante de moléculas responsáveis por regular o crescimento, a sobrevivência e a motilidade celular. Então, o conceito mais simplista e fundamentalista é que o câncer resulta da superexpressão de oncogenes e do silenciamento de genes supressores de tumor.

O CEO é uma doença com alta de taxa de mortalidade, com a sobrevida em 5 anos próxima de 50% (Rodrigues et al., 2014; Chinn e Mayers, 2015). Tal realidade se deve principalmente ao diagnóstico tardio, ao conhecimento limitado sobre a biologia deste tumor e, conseqüentemente, desconhecimento de prováveis moléculas-alvo que possam direcionar estratégias terapêuticas mais eficientes para estes pacientes e fornecer informações sobre o prognóstico. Nas últimas décadas, o estroma tumoral tem despontado como um compartimento funcional importante na ativação e/ou manutenção de muitas características das células malignas, refletindo numa percepção do câncer como uma doença complexa e dependente não apenas das células tumorais, mas também de interações entre as células tumorais e as células do microambiente tumoral, incluindo fibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias (Hanahan e Coussens, 2012; Mezawa e Orimo, 2016).

Neste sentido, diferentes estudos relatam o papel das quimiocinas e de seus receptores em diferentes estágios da progressão tumoral, facilitando o crescimento do tumor por meio da indução da transição epitélio-mesenquimal, da angiogênese, do escape do sistema imune e da formação de metástases (Sarvaiya et al., 2013). As quimiocinas pertencem a uma superfamília de proteínas pró-inflamatórias de baixo peso molecular (8-14 kDa) induzidas e/ou secretadas, envolvidas em uma variedade de respostas imunes, atuando primariamente como fatores quimioatraentes e ativadores de leucócitos. Elas são

tipicamente induzidas por citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, estímulos patogênicos e, sinalizam através de receptores acoplados a proteína G transmembrânica (receptores de quimiocinas) (Wolff et al., 2011). As quimiocinas são produzidas e secretadas por diferentes tipos celulares, incluindo células tumorais, células do estroma tumoral e células imunes infiltradas no microambiente tumoral (Zlotnik 2006). As quimiocinas estão envolvidas no crescimento de diferentes tipos de cânceres incluindo mama, ovário, pâncreas, pulmão, estômago, leucemias, linfomas entre outros (Sarvaiya et al., 2013). Por meio da ativação da via de sinalização MAPK/ERK, elas promovem a proliferação das células tumorais (Sebolt-Leopold et al., 1999; Anders et al., 2014). Por outro lado, alguns receptores de quimiocinas podem inibir a proliferação de células tumorais como, por exemplo, CCR5 que inibiu a progressão de câncer de mama (Mañes et al., 2003). De modo contrário, a expressão de CCR5 e de seus ligantes (CCL3, 4 e 5) detectada em linfomas e em diversos tumores sólidos foi associada com a invasão tumoral (Kato et al., 2013; Aldinucci et al., 2014).

Algumas quimiocinas, como por exemplo CXCL12, podem promover o crescimento, migração e invasão tumoral diretamente ou indiretamente por meio do recrutamento de células endoteliais necessárias para a angiogênese. Além disso, as células T reguladoras e as células dendríticas plasmocitóides que, representam um papel crucial na evasão da resposta imunológica, são atraídas para o microambiente tumoral por CXCL12. O recrutamento e a retenção destas células imunossupressoras no microambiente tumoral limitam a eficácia da resposta imune (Obermayer et al., 2011). É bem estabelecido que a migração de células tumorais e formação de metástases compartilham similaridades com o tráfego de leucócitos que é altamente regulado por quimiocinas e por seus respectivos receptores (Shang et al., 2009). De tal forma que se especula que as células tumorais também utilizam mecanismos mediados por receptores de quimiocinas, tais como aqueles que regulam o tráfego de leucócitos, na formação de metástases para órgãos expressando sua quimiocina cognata (Murphy, 2001; Lazenec et al., 2010). Esta teoria é suportada por estudos que demonstraram que a expressão dos receptores de quimiocinas CCR7 e CXCR4 em células de câncer de mama e, os níveis de expressão de seus ligantes (CCR7/CCL19-CCL21 e CXCR4/CXCL12) são muito mais altos nos locais passíveis de formação metastática (linfonodos, pulmão e fígado) do que em outros tecidos (intestino delgado, pele, cérebro e músculo esquelético) (Müller et al., 2001; Legler et al., 2014). Considerando que a morte dos pacientes geralmente decorre

da disseminação metastática (Lazennec et al., 2010), torna-se essencial o melhor entendimento do papel das quimiocinas e receptores envolvidos na formação e disseminação de metástases.

Os resultados na literatura são escassos e conflitantes em relação a expressão e o papel das quimiocinas e dos receptores supracitados em CEOs (Chuang et al., 2009; Shang et al., 2009; Li et al., 2011; Wolff et al., 2011). Neste sentido, a avaliação da expressão de quimiocinas e de seus receptores em linhagens de CEOs poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos associados ao desenvolvimento e progressão do câncer oral. Além disso, a análise da expressão de quimiocinas e de seus receptores poderá permitir a identificação de potenciais marcadores de diagnóstico e/ou prognóstico bem como de importantes alvos terapêuticos. Dessa forma, este trabalho se propôs a analisar a expressão das quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5, CCL19, CCL21 e CXCL12 e dos receptores CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 e CXCR4 em linhagens de CEOs e comparar com os níveis de expressão de queratinócitos normais e não-transformados humanos. Adicionalmente, o estudo verificou os efeitos de CCL5 sobre a proliferação das linhagens tumorais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma de células escamosas oral

O CEO está entre os 10 tipos de câncer mais prevalentes no mundo e tem uma incidência de aproximadamente 300.000 novos casos e 145.000 mortes anuais (Ferlay et al., 2015). Apesar da incidência para este tipo de câncer ter diminuído em algumas partes do mundo, o que é consistente com a diminuição do uso de tabaco, dois terços dos casos de CEO ocorrem em países em desenvolvimento e altas taxas são observadas em todas as regiões do Brasil (Warnakulasuriya, 2010). Além disso, um aumento de 62% na incidência está previsto para os próximos 20 anos no mundo todo em virtude das mudanças demográficas (Shield et al., 2017). O CEO corresponde à cerca de 95% das neoplasias malignas que ocorrem na cavidade bucal e tem sua origem a partir de células malignas derivadas do epitélio pavimentoso estratificado (Scully & Bagan, 2009), onde a língua é a localização mais comum para o câncer de boca e, juntamente com o assoalho bucal, somam mais da metade dos cânceres orais excluindo aqueles que afetam lábios (Bello et al., 2010).

Os principais fatores de risco para o CEO permanecem sendo o uso de tabaco com associação sinérgica ao uso de álcool. O álcool não é diretamente um agente carcinogênico, porém o seu metabolismo leva a liberação de acetaldeído, que apresenta efeitos genotóxicos (Batista R. C 2015). O consumo do tabaco associado ao álcool é capaz de aumentar em 20 vezes o risco para o desenvolvimento de recidivas ou segundos tumores primários na cavidade oral ou trato aerodigestivo (Carvalho et al., 2004; Leston & Dios, 2010). O CEO ocorrendo tipicamente entre a quinta e oitava décadas de vida, apesar do recente aumento na incidência entre pacientes jovens (Müller et al., 2017). Os CEOs têm origem a partir da mucosa clinicamente normal, porém muitos tumores evoluem de desordens orais potencialmente malignas, dentre as quais as mais comumente encontradas são as leucoplasias e as eritroplasias. O CEO é histologicamente caracterizado por uma proliferação de células pleomórficas com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e figuras mitóticas atípicas. A proliferação demonstra um padrão invasivo, formando ninhos e ilhas de células epiteliais malignas contendo níveis variados de queratinização celular que podem formar “pérolas”.

Em termos de tratamento, a remoção cirúrgica permanece a melhor opção par os pacientes com CEO, porém não se mostra efetiva em tumores metastáticos e em estágios avançados. Embora quimioterapia e radioterapia sejam aplicadas em combinação com cirurgia para o tratamento de tumores avançados, a probabilidade de recorrência é alta (Malik et al., 2016). Devido ao alto potencial de invasão local e metástase linfonodal, a taxa de sobrevida em 5 anos para CEO está é menor que 50%, sem melhora significativa nas últimas décadas (Chinn et al., 2015). Apesar dos pacientes com CEO diagnosticados em estágios iniciais (I ou II) apresentarem boa taxa de sobrevida em 5 anos, dois terços de todos os pacientes são diagnosticados em estágios avançados (III ou IV), onde a sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 30-50% (Rodrigues et al., 2014). Recorrências loco-regionais e segundos tumores primários são comuns e impactantes para os pacientes com CEO e mesmo tumores em estágios iniciais podem metastizar, principalmente os localizados na língua (Bello et al., 2010).

O sistema TNM de estadiamento tumoral, especialmente a presença de metástase linfonodal cervical, permanece como o mais importante fator preditivo clínico em pacientes com CEO, além da localização do tumor dentro da cavidade oral (Ni et al., 2015). A presença de disseminação extracapsular da metástase linfonodal comprovada pelo exame histopatológico, é particularmente um fator preditivo importante de sobrevida

global (Ferris e Kraus, 2012). Histologicamente, a profundidade de invasão tem importância prognóstica e foi recentemente incorporada na classificação do estadiamento na categoria T, em adição à extensão extranodal inserida como parâmetro na categoria N, como indicado na 8ª edição do Manual de Estadiamento do Câncer do *American Joint Cancer Committee* (Ridge et al., 2017). Além disso, novos sistemas de gradação histológica têm sido propostos, como o modelo BD (do inglês *tumor budding e depth of invasion*), que mostrou significativa associação com o desfecho clínico como um marcador prognóstico independente (Almangush et al., 2015; Sawazaki-Calone et al., 2015). Contudo, apesar das melhorias nos sistemas de gradação, as classificações clínicas e histológicas utilizadas atualmente se mostram individualmente como ferramentas inacuradas na predição do prognóstico (Almangush et al., 2017). Recorrências, metástases e morte devido ao câncer podem ocorrer até mesmo em pacientes com tumores pequenos, provavelmente como um resultado da heterogeneidade etiológica e molecular dos tumores, bem como de fatores microambientais (Soland e Brusevold, 2013; Ni et al., 2015). Mesmo quando as margens cirúrgicas são diagnosticadas histopatologicamente como livres de tumor, a taxa de recorrência local permanece entre 10-30% (Ni et al., 2015).

Especificamente para os tumores de língua e assoalho bucal, que juntos correspondem a mais de 50% dos tumores da cavidade oral, as metástases ocultas, isto é, que não são detectadas clinicamente ou com o auxílio de um exame de imagem, são frequentes (encontradas em 20 a 30% dos pacientes), dificultando o manejo e prognóstico. Embora tenha sido sugerido que a riqueza de linfonodos cervicais e a ampla rede de vasos linfáticos possam favorecer o transporte das células tumorais para os linfonodos adjacentes (Chung et al., 2010), as razões pelas quais os CEOs de língua e assoalho bucal frequentemente lançam metástases não estão completamente esclarecidas. Contudo, vários estudos têm buscado esta reposta, focando em análises de genes/proteínas específicas ou em análises de interação com o microambiente tumoral (Nitta et al., 2011; Alitalo et al., 2012; Curry et al., 2014).

2.2 Quimiocinas e seus receptores

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que controlam os padrões migratórios e o posicionamento de todas as células imunológicas e se ligam a receptores acoplados à proteína G em suas células alvo (Griffith et al., 2014). Nos últimos anos, ficou claro que

a função das quimiocinas é muito mais amplo do que seu papel na quimiotaxia dos leucócitos. Elas participam do desenvolvimento de órgãos, angiogênese, tráfego de leucócitos e homing, tumorigênese e metástase, bem como em respostas imunes à infecção microbiana (Le Y et al., 2014). Quimiocinas podem ser amplamente divididos em duas categorias: homeostáticas e inflamatórias, de acordo com sua expressão e função no sistema imune. As primeiras, homeostáticas, são aquelas “continuamente” expressadas, envolvidas em quimiotaxia linfocítica e de células dendríticas, além de participarem no controle da migração celular. Já as quimiocinas inflamatórias são reguladas por estímulos pró-inflamatórios e ajudam a coordenar e adaptar frente a respostas imunes (Yingying et al., 2017). Portanto, as quimiocinas e seus receptores são alvos importantes para a modulação das respostas do hospedeiro em condições fisiopatológicas e para a intervenção terapêutica de doenças humanas (Cavalheiro et al., 2006). Há duas divisões de citocinas: a primeira é chamada de beta-quimiocinas, as quais estimulam principalmente os monócitos, mas também os basófilos, células *natural killer* (NK), eosinófilos e linfócitos-T (Tabela 1). O outro grupo de quimiocinas é a CXC, conhecidas como as alfa-quimiocinas (Tabela 2), as quais estimulam principalmente a quimiotaxia de neutrófilos (Palomino et al., 2006).

Tabela 1. Beta-Quimiocinas, seus receptores e função imune.

Quimiocina	Receptor	Função imune
CCL1	CCR8	Tráfego de Th2 e Treg
CCL2	CCR2	Tráfego de monócito
CCL3	CCR1, CCR5	Migração macrófago NK; interação célula T/DC
CCL4	CCR5	Migração macrófago NK; interação célula T/DC
CCL5	CCR1, CCR3, CCR5	Migração macrófago NK; interação célula T/DC
CCL6	Desconhecido	Desconhecida
CCL7	CCR2, CCR3	Mobilização de monócito
CCL8	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	Resposta Th2
CCL9	Desconhecido	Desconhecida
CCL10	Desconhecido	Desconhecida
CCL11	CCR3	Migração de eosinófilo e basófilo
CCL12	CCR2	Tráfego de monócito
CCL13	CCR2, CCR3, CCR5	Resposta Th2
CCL14	CCR1	Desconhecida
CCL15	CCR1, CCR3	Desconhecida

CCL16	CCR1, CCR2, CCR5	Desconhecida
CCL17	CCR4	Resposta Th2, migração de célula Th2, Treg e <i>homing</i> (endereçoamento) para pulmão e pele
CCL18	CCR8	Resposta Th2, marcador AAM e <i>homing</i> (endereçoamento) para pele
CCL19	CCR7	Célula T/DC com <i>homing</i> (endereçoamento) para linfonodo
CCL20	CCR6	Resposta Th17, célula B e DC com <i>homing</i> (endereçoamento) para tecido linfoide associado ao intestino
CCL21	CCR6, CCR7	Célula T e DC com <i>homing</i> (endereçoamento) para linfonodo
CCL22	CCR4	Resposta Th2, migração de célula Th2, migração de T reg
CCL23	Desconhecido	Desconhecida
CCL24	CCR3	Migração de eosinófilo e basófilo
CCL25	CCR9	<i>Homing</i> (endereçoamento) de célula T para intestino, migração de timócito
CCL26	CCR3, CX3CR1	Migração de eosinófilo e basófilo
CCL27	CCR10	Célula T com <i>homing</i> (endereçoamento) para pele
CCL28	CCR3, CCR10	Célula T e plasmócitos de IgA com <i>homing</i> (endereçoamento) mucosa

Fonte: Murphy et al (2015).

Quadro 2. Alfa-Quimiocinas, seus receptores e função imune.

Quimiocina	Receptor	Função imune
CXCL1	CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL2	CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL3	CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL4	Desconhecido	Pró-coagulante
CXCL5	CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL6	CXCR1, CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL7	CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL8	CXCR1, CXCR2	Tráfego de neutrófilos
CXCL9	CXCR3	Resposta Th1, tráfego de Th1, CD8 e NK
CXCL10	CXCR3	Resposta Th1, tráfego de Th1, CD8 e NK
CXCL11	CXCR3	Resposta Th1, tráfego de Th1, CD8 e NK
CXCL12	CXCR4	<i>Homing</i> (endereçoamento) para medula óssea

CXCL13	CXCR5	Posicionamento de célula B e Tfh no linfonodo
CXCL14	Desconhecido	<i>Homing</i> (endereçoamento) de macrófago para a pele
CXCL15	Desconhecido	Desconhecida
CXCL16	CXCR6	Migração e sobrevivência de NKT e ILC
CXCL17	Desconhecido	Desconhecida
XCL1	XCR1	Apresentação cruzada por CD8+ DC
XCL2	XCR2	Apresentação cruzada por CD8+ DC
CX3CL1	CX3CR1	Migração de NK, monócito e célula T

Fonte: Murphy et al. (2015).

Diversos estudos têm relatado o envolvimento das quimiocinas em processos dinâmicos de homeostasia, elucidando que as famílias de quimiocinas atuam em papéis importantes na rede regulatória, dentre elas destaca-se a CXCL12, a qual é expressa continuamente em medula óssea derivada do estroma celular, promove proliferação de células B, além da imigração de precursores hematopoiéticos durante a embriogênese da medula óssea (Matsukawa et al., 2000). Em contrapartida, evidências crescentes demonstram que as quimiocinas e seus receptores estão também associados com o crescimento tumoral e o desenvolvimento de metástases (Li et al., 2012), entre elas encontra-se a CCL3 e CCL5, esta última constatada como uma importante quimiocina do desenvolvimento tumoral. A presença de diferentes quimiocinas e de seus receptores em tecidos neoplásicos tem sido relatada, no entanto, o papel de CCL5 no desenvolvimento neoplásico oral permanece amplamente desconhecido. Se por um lado existem relatos acerca da importância da produção desta quimiocina para a indução de respostas imunes eficazes contra tumores (Hanahan et al., 2012), existem também associações com a progressão tumoral e formação de metástases (Long et al., 2012; Kato et al., 2013; Wang et al., 2015). Já a quimiocina CCL3 é uma citocina quimiotática crucial para o recrutamento de células inflamatórias em condições patológicas e homeostáticas. Essa proteína pode estimular a progressão tumoral por promover a acumulação leucocítica, angiogênese e crescimento tumoral. A expressão da CCL3 e seus receptores CCR1 e CCR5 foi demonstrada em carcinoma de células escamosas orais, porém seu papel não foi completamente definido (da Silva JM, Moreira Dos Santos TP, Sobral LM et al, 2017).

Dessa forma, estudos adicionais acerca do papel da via CCR5/CCL são necessários para elucidar quais quimiocinas favorecem ou inibem a progressão dos

diferentes tipos de cânceres e, para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas de combate ao câncer. Algumas quimiocinas podem iniciar ou potencializar a resposta imunológica do hospedeiro contra a implantação tumoral ou ainda inibir a neovascularização. Entretanto, pode haver uma ação contrária, favorecendo o crescimento neoplásico e a metastatização, por aumento da proliferação celular, estimulando a mobilidade e migração celular ou potencializando a angiogênese no tecido tumoral (Wang et al., 1998; Balkwill, 2004; Obermajer et al., 2011).

Embora diferentes estudos tenham identificado a expressão da quimiocina CCL5 em diferentes tipos de cânceres tais como pulmão, próstata, ovário, mama, melanoma, osteossarcoma e CEC oral e de pele (Long et al., 2012; Kato et al., 2013; Huang et al., 2009; Luboshits et al., 1999; Niwa et al., 2001; Wang et al., 2015; Serrels et al., 2015; Chuang et al., 2009), é reduzido o número de trabalhos que buscaram esclarecer os mecanismos pelos quais esta quimiocina influencia o desenvolvimento tumoral (Karnoub et al., 2007; Lv et al., 2013; Long et al., 2015). Por meio da ativação de diferentes vias celulares como, por exemplo, a ativação de NF- κ B, esta quimiocina induziu a invasão celular via aumento da produção de MMP-2 e -9 (Long et al., 2012; Kato et al., 2013) e, a progressão tumoral e formação de metástases através da indução de transição epitelial-mesenquimal (Klymkowsky et al., 2009; Long et al., 2015). Além disso, os níveis de CCL5 também foram associados à aquisição de resistência ao tratamento com tamoxifen e progressão do câncer de mama (Niwa et al., 2001; Yi et al., 2013). Assim sendo, podemos concluir que a maior expressão de CCL3 e CCL5 em CEC orais, embora deva ser mais amplamente avaliada, poderá ser um importante fator preditivo ao prognóstico destes pacientes.

4 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi comparar a expressão das quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5, CCL19, CCL21 e CXCL12 e de seus receptores CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 e CXCR4 entre linhagens celulares de CEOs e uma linhagem de queratinócitos normais e não-transformados humanos, e determinar os efeitos de CCL5 na proliferação das linhagens celulares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de Células

Este estudo utilizou as linhagens celulares HGK, SCC-9, SCC-15, SCC-25, HSC-3 e SCC-9 ZsGreen LN-1 (Tabela 3). A linhagem HGK (human gingival keratinocyte) representa queratinócitos espontaneamente imortalizados mas não transformados, apresentando um comportamento de uma célula normal. As linhagens de CEO de língua SCC-9 (CRL-1629), SCC-15 (CRL-1623) e SCC-25 (CRL-1628) foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA) e a linhagem HSC-3 (JRCB 0623) foi obtida da *Health Science Research Resources Bank* (Osaka, Japão). A linhagem metastática SCC-9 ZsGreen LN-1, derivada das células SCC-9, foi estabelecida em nosso laboratório a partir de modelo xenográfico em camundongos nudes que desenvolveram metástases em linfonodos axilares após injeção ortotópica da linhagem tumoral SCC-9 (Agostini et al., 2014). As células HGK foram cultivadas em meio para queratinócitos humanos (Keratinocyte-SFM, Invitrogen, EUA) acrescido de extrato de pituitária bovino, fator de crescimento epidérmico (rEGF) e antibióticos (Invitrogen, EUA). As linhagens SCC-9, SCC-15, SCC-25 e SCC-9 ZsGreen LN-1 foram cultivadas em meio de cultura contendo partes iguais de meio de Eagle modificado por Dulbecco's DMEM) e meio F-12 (DMEM/F-12; Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, Campinas), 400 ng/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, EUA) e antibióticos. A linhagem HSC-3 é cultivada no mesmo meio de cultura que as outras linhagens de câncer, mas acrescido de 50 mg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, EUA). Todas as linhagens foram mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C e são livres de contaminação com micoplasma.

Tabela 3. Nome e origem das linhagens celulares e meios de cultura utilizados.

Linhagem	Meio de Cultura	Origem
HGK	Keratinocyte-SFM	Gengiva normal
SCC-9	DMEM/F12	CEO de língua
SCC-15	DMEM/F12	CEO de língua
SCC-25	DMEM/F12	CEO de língua
HSC-3	DMEM/F12	CEO de língua
SCC-9 ZsGreen LN-1	DMEM/F12	Metástase linfonodal de CEO

4.2 Análise da Expressão Gênica por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)

A expressão das quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5, CCL19, CCL21 e CXCL12 e de seus receptores (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 e CXCR4) foi determinada por ensaios de qRT-PCR.

4.2.1 Isolamento de RNA Total

Células cultivadas em frascos de 25 cm² com 60% de confluência foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 400 g por 3 min. Posteriormente, os precipitados celulares foram incubados com 700 µl do reagente Trizol (Invitrogen, EUA) e mantidos por 5 min em temperatura ambiente. Após adição de 140 µl de clorofórmio em cada tubo, uma agitação vigorosa por 15 s foi realizada. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 min a 9000 g a temperatura de 4°C. A fase aquosa da solução foi transferida para tubos novos e 350 µl de álcool isopropanol foi adicionado para precipitação do RNA. A mistura foi homogeneizada, incubada em temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 9000 g a 4°C por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 700 µl de 75% etanol gelado. Após nova centrifugação a 6000 g a 4°C por 5 min, o precipitado foi seco, ressuspenso em água livre de DNases e de RNases e estocado a -80°C até o momento de sua utilização.

4.2.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado com Oligo-dT (0,5 mg/ml; Invitrogen, EUA) e a enzima SuperScript II RT (Invitrogen, EUA). Dois µg de RNA total foram incubados com enzima a DNase I AmpGrade, (Invitrogen, EUA) por 15 min à temperatura ambiente para eliminação de contaminação por DNA genômico. A enzima foi então inibida por meio da adição de 1 µl de EDTA a 25 mM pH 8 (Invitrogen, EUA) e levada ao termociclador para aquecimento a 65°C por 10 min. Seguiu-se com a adição de 1 µl de Oligo-dT (0,5 mg/ml; Invitrogen, EUA) e 1 µl da mistura de dNTPs a 10 mM (Invitrogen, EUA). Após incubação por 5 min a 65°C, e posterior resfriamento das amostras em gelo por 1 min, adicionou-se 4 µl de 5x tampão de síntese (200 mM Tris-HCl pH 8,4 e 500 mM KCl), 2 µl DTT a 0,1 mM e 1 µl da enzima RNaseOUT (Invitrogen, EUA), e a amostra voltou ao termociclador por mais 2 min a 42°C. Por fim, 1 µl da enzima SuperScript II RT (Invitrogen, EUA) foi adicionada aos tubos e os mesmos foram incubados em termociclador por 50 min a 42°C e 15 min a 70°C.

4.2.3 Reação de qRT-PCR

Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas pelo método de quantificação relativa ao gene normalizador PPIA. As reações foram preparadas em triplicatas usando o sistema de detecção SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inglaterra) e corridas no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) em um volume final de 25 µl. Resumidamente, 1 µl do cDNA resultante foi amplificado na reação contendo 12,5 µl de SYBR Green máster mix (Applied Biosystems, EUA), 9,5 µl de água livre de DNases e de RNases e 1 µl de cada primer em uma concentração final de 200 nM (Tabela 4). As condições de amplificação foram 2 min a 50°C para a ativação da enzima AmpErase, 10 min a 95°C para a ativação da enzima AmpliTaq gold DNA polymerase, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 s e 1 min a 60°C para pareamento dos primers e extensão. Ao final da amplificação, uma etapa adicional de dissociação foi realizada (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s, iniciando-se em 95°C) para a geração de uma curva de dissociação (curva de *melting*) necessária para confirmação da especificidade da amplificação. A quantificação da expressão foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Rodrigues et al., 2017).

Tabela 4. Pares de primers que foram utilizados nos ensaios de qRT-PCR.

Gene	Primer Sense (5'-3')	Primer Antisense (5'-3')
CCL3	CCAAAGCCACCAGACTGACA	GCCGATCACAGCCCTGAA
CCL4	TGGGTCCAGGAGTACGTGTATG	CCCTGAAGACTTCCTGTCTCTGA
CCL5	GGTCAAGGATGCCAAAGAGAGA	GCCGGGAGTCATACAGGAAA
CCL19	TTCCCCAGCCCCAACTCT	TCACAGACAGGCAGCAGTCTTC
CCL21	GGAAGATTCCCGCCAAGGT	TGGAGCAGCCTAAGCTTGGT
CXCL12	GCCGCCACTGCCTTCA	GGAGCCCACAGAGCCAATC
CCR1	GCTCTCCCAGCCAGGTTCT	TCTCTATCCCAAGTGGCTGTGA
CCR3	TGCTGTGTTTGCCCTTCGA	TGACGATGCTGGTGATGACA
CCR4	CAATACTGTGGGCTCCTCCAA	GGTGGACTGCGTGTAAGATGAG
CCR5	GGCAGTTCTCCAGGCTATTTGT	GGAGGCCAAAGACACAGATCA
CCR7	GCTCCAGGCACGCAACTTT	GACCACAGCGATGATCACCTT
CXCR4	CAGTGGCCGACCTCCTCTT	GTTTGCCACGGCATCAACT
PPIA	GCTTTGGGTCCAGGAATGG	GTTGTCCACAGTCAGCAATGGT

4.3 Análise da Proliferação Celular

A análise da proliferação celular foi realizada pelo método de incorporação de bromodeoxiuridina (BrDU) ao DNA. Para isso, células foram plaqueadas na concentração de 3×10^3 células por poço placas de 96 poços e cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24 h de cultivo na ausência de FBS para promoção do sincronismo celular, a proliferação celular foi induzida pelo cultivo com meio contendo 0, 1 ou 3 ng/ml da proteína CCL5 recombinante (Sigma-Aldrich, EUA). Transcorridas 24 h de indução da proliferação celular, adicionou-se BrDU (Cell Proliferation ELISA BrdU Colorimetric, Roche Applied Science, Germany) na diluição de 1:10. Após 2 h de incorporação, o meio de cultura foi removido e seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante. A placa foi então levada para leitura da absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 370 nm com correção em 492 nm.

4.4 Análise Estatística

Todos os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes e expressos como média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas, análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA) e o nível de significância empregado será de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Expressão das quimiocinas nas linhagens celulares de CEO

Inicialmente, por meio de qRT-PCR, nós caracterizamos a expressão das quimiocinas nas linhagens de CEO e utilizamos a linhagem de queratinócitos não transformados humanos HGK para comparação. Na linhagem SCC-9, a expressão de CCL5 foi significativamente maior comparado a linhagem HGK ($p < 0,05$; Fig. 1A). As expressões de CCL3 e CCL4, que foram menores na SCC-9 em relação a HGK, e de CCL19, CCL21 e CXCL12, que foram maiores, não alcançaram diferenças estatisticamente significantes (Fig. 1A). Os níveis de expressão de todas as quimiocinas foram menores na linhagem SCC-15 em comparação a linhagem HGK, com um nível estatisticamente menor para CCL4 ($p < 0,05$; Fig. 1B). Em relação ao perfil de expressão da linhagem SCC-25, observamos que as expressões de CCL3, CCL4, CCL19, CCL21 e CXCL13 forma menores, mas não estatisticamente significantes, que a linhagem HGK e a expressão de CCL5 foi estatisticamente maior ($p < 0,05$; Fig. 1C). Apenas CCL3 e CCL4

demonstraram níveis estatisticamente diferentes de expressão na linhagem HSC-3 (Fig. 1D). As expressões fora, significativamente menores nas células HSC-3 em comparação a linhagem HGK ($p < 0,05$). Os níveis de CCL5 foram maiores e de CCL19, CCL21 e CXCL13 foram menores, mas nenhum atingiu o patamar de significância (Fig. 1D). Em relação a linhagem SCC-9 ZsGreen LN-1, CCL4 não apresentou níveis detectáveis de expressão, CCL5 e CXCL13 foram significativamente mais expressos ($p < 0,05$) e CCL3, CCL19 e CCL21 foram menos expressos, embora não estatisticamente diferentes (Fig. 1E).

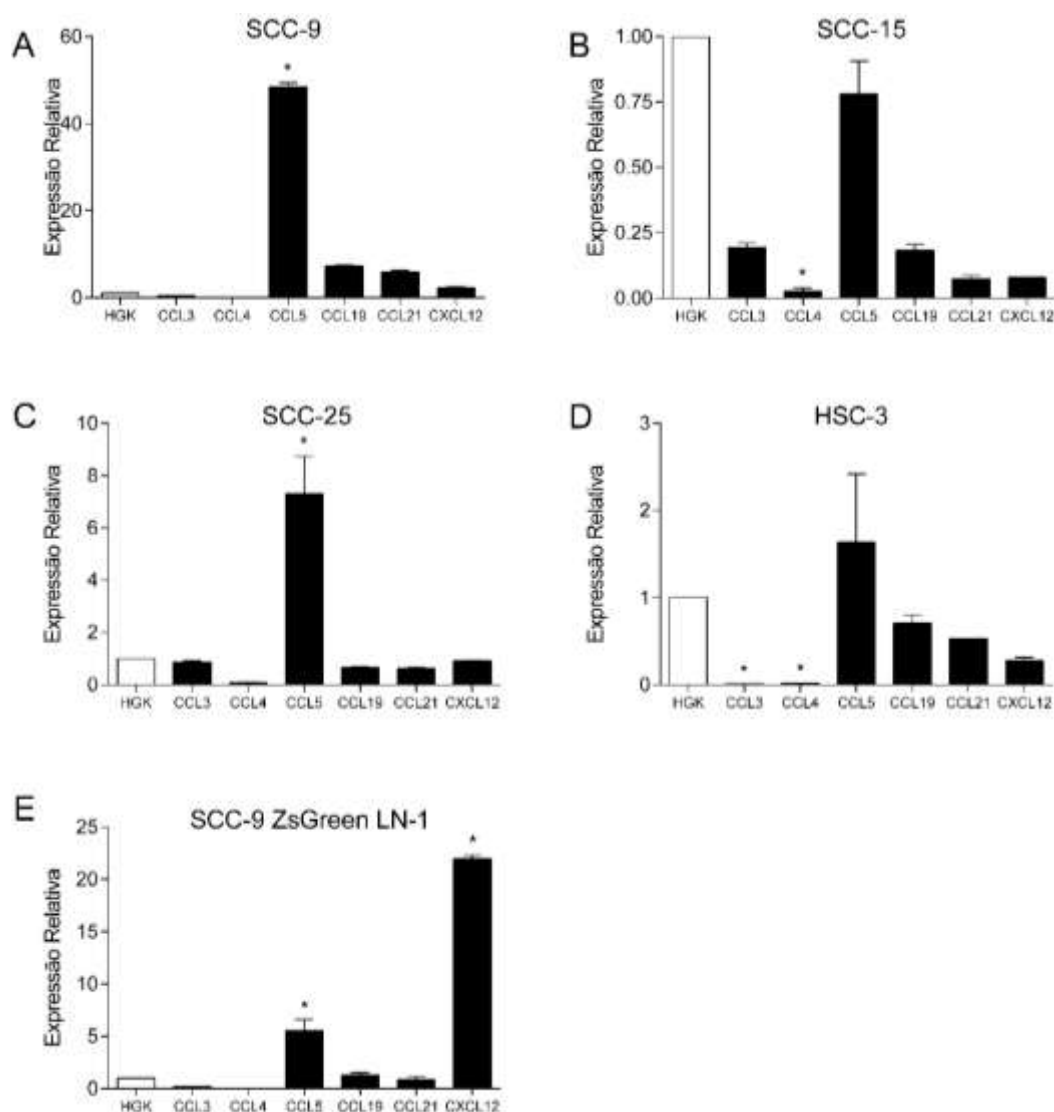


Figura 1. Análise da expressão das quimiocinas nas linhagens HGK e de CEO por qRT-PCR. Expressão relativa das quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5, CCL19, CCL21 e CXCL12 nas linhagens celulares de CEO em relação a linhagem HGK. (A) SCC-9, (B)

SCC-15, (C) SCC-25, (D) HSC-3 e (E) SCC-9 ZsGreen LN1. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. $*p < 0,05$

5.2 Expressão dos receptores de quimiocinas nas linhagens de CEO

Em relação a análise dos receptores, os resultados revelaram que a expressão de CCR1 foi significativamente elevada ($p < 0,05$) na linhagem SCC-9 em comparação com a linhagem HGK (Fig. 2A). Embora a linhagem SCC-9 também tenha apresentado elevadas expressões de CCR3, CCR4 e CCR5, as diferenças em comparação com HGK não foram estatisticamente significantes (Fig. 2A). As expressões de CCR7 e CXCR4 foram menores na linhagem SCC-9 em comparação a linhagem HGK (Fig. 2A). Os resultados revelaram que a linhagem SCC-15 apresentou níveis reduzidos de expressão para todos os receptores de quimiocinas avaliados em relação a linhagem HGK (Fig. 2B), com os níveis para CCR3, CCR7 e CXCR4 atingindo o patamar de significância ($p < 0,05$). Por outro lado, a linhagem SCC-25 demonstrou níveis de expressão elevados para os receptores CCR4 e CCR5 quando comparada a linhagem HGK, mas apenas para CCR4 o nível de significância foi atingido ($p < 0,05$; Fig. 2C). Com um comportamento muito modo similar à linhagem SCC-15, a linhagem HSC-3 apresentou níveis de expressão mais baixos para todos os receptores em comparação a linhagem HGK, com níveis significativamente menores para CCR7 e CXCR4 ($p < 0,05$; Fig. 2D). A análise da linhagem SCC-9 ZsGreen LN-1 demonstrou níveis de expressão de CCR5 significativamente maiores quando comparada com a linhagem HGK ($p < 0,05$; Fig. 2E). A expressão de CCR1 foi muito similar e as expressões de CCR3, CCR4, CCR7 e CXCR4 foram menores na SCC-9 ZsGreen LN-1 em comparação a HGK (Fig. 2E).

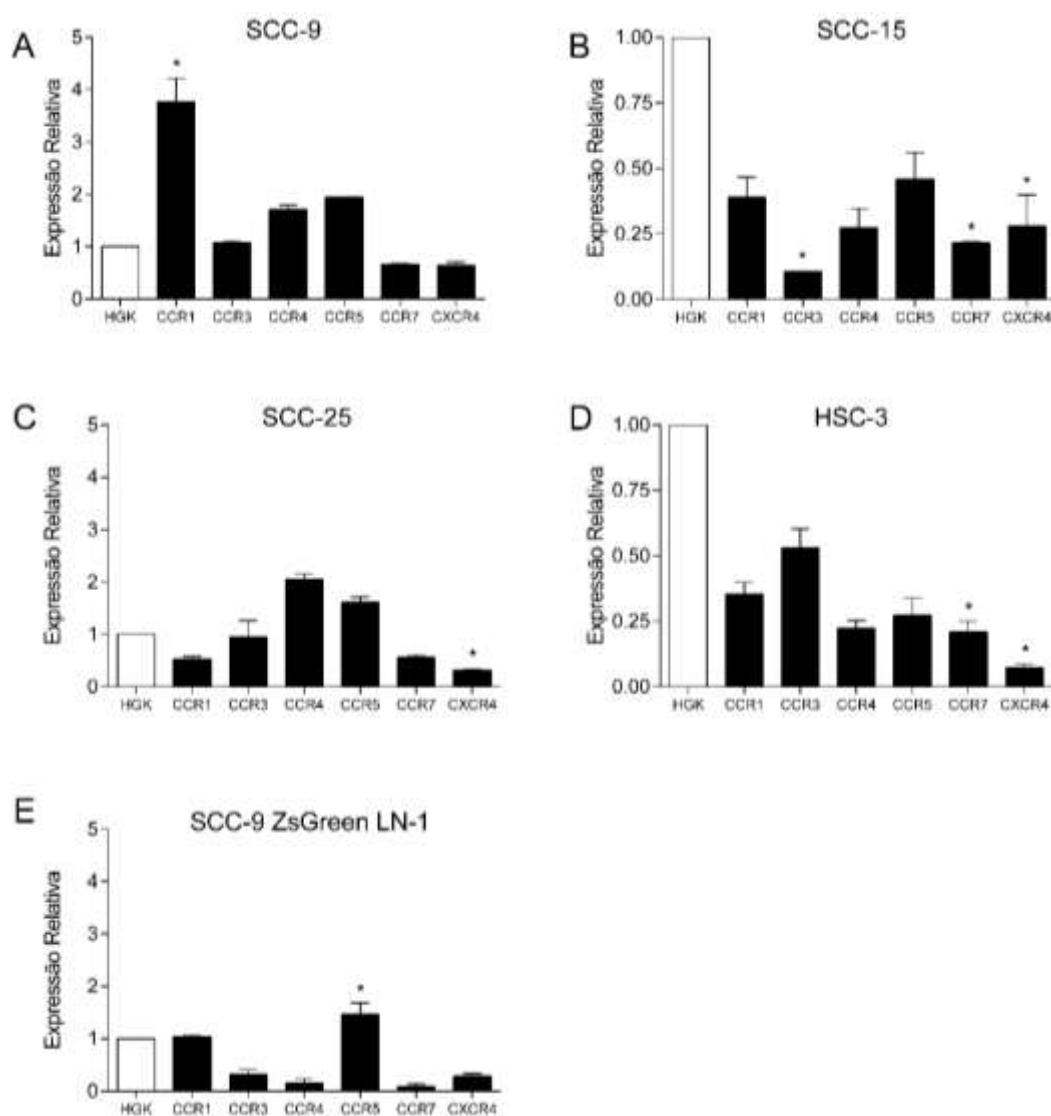


Figura 2. Análise da expressão dos receptores de quimiocinas nas linhagens de queratinócitos normais e celulares de CEO. Os níveis de expressão dos receptores de quimiocinas CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 e CXCR4 foram analisados nas linhagens celulares de CEO SCC-9 (A), SCC-15 (B), SCC-25 (C), HSC-3 (D) e SCC-9 ZsGreen LN1 (E). Os valores são relativos a expressão na linhagem HGK e representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$

5.3 Efeito de CCL5 na proliferação celular

Após a caracterização do padrão de expressão das quimiocinas e seus receptores nas linhagens neoplásicas, nós caracterizamos os efeitos de diferentes concentrações (0, 1 e 3 ng/ml) de CCL5 na indução da proliferação celular. Os resultados revelaram que o tratamento com CCL5 recombinante induziu a proliferação das células SCC-9 na

concentração de 3 ng/ml ($p < 0,05$) em relação ao controle sem tratamento com CCL5 (Fig. 3A). Na linhagem SCC-15 foi observado uma indução significativa na proliferação celular após o tratamento com CCL5 em ambas as concentrações ($p < 0,01$; Fig. 1B), sem diferença na capacidade de indução entre as concentrações de 1 ou 3 ng/ml de CCL5 (Fig. 1B). Na linhagem SCC-25, apenas a concentração de 3 ng/ml ($p < 0,05$) foi capaz de induzir significativamente a proliferação celular (Fig. 1C). Interessantemente, nas condições do estudo, CCL5 não foi capaz de modular a proliferação das células HSC-3 (Fig. 1D). No entanto, a proliferação da linhagem SCC-9 ZsGreen LN-1 foi significativamente induzida por CCL5 em ambas as concentrações ($p < 0,05$ para 1 ng/ml e $p < 0,01$ para 3 ng/ml; Fig. 1E).

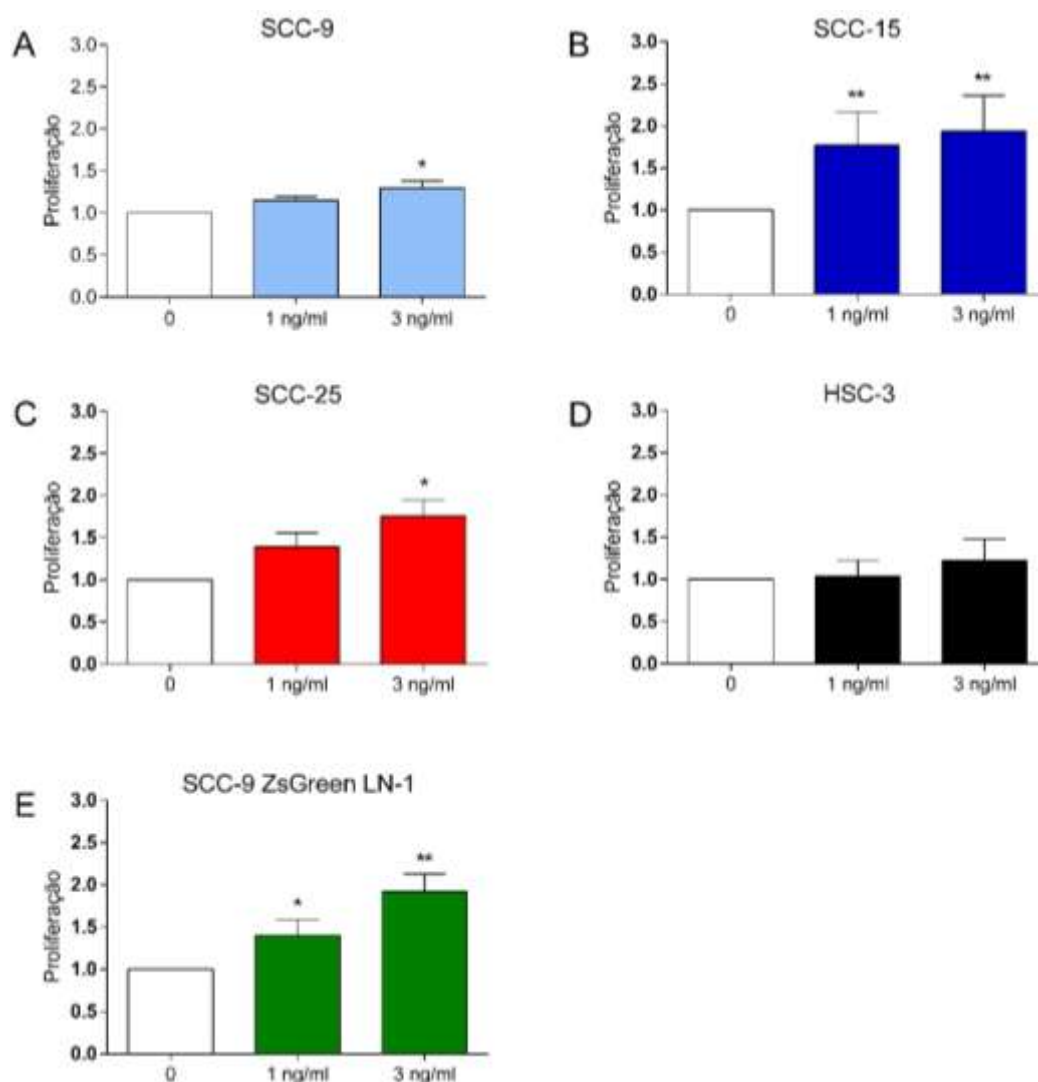


Figura 3. CCL5 indução a proliferação celular na maioria das linhagens de CEO. Células foram incubadas com concentrações de CCL5 recombinante (0, 1 ou 3 ng/ml) por 24 h, seguido por análise da proliferação celular por meio do índice de incorporação de

bromodeoxiuridina (BrDU) pelas linhagens de CEO SCC-9 (A), SCC-15 (B), SCC-25 (C), HSC-3 (D) e SCC-9 ZsGreen LN1 (E). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico e a terapia de muitos tumores foram aprimorados nas últimas décadas, impactando positivamente na cura e sobrevida dos pacientes. Contudo, para o CEO a sobrevida global permanece baixa, fazendo com que este tumor seja associado ainda a uma alta taxa de mortalidade. O tratamento e o prognóstico do CEO são propostos de acordo com o estadiamento clínico (sistema TNM), mas tem sido observado que pacientes com o mesmo estágio clínico do tumor, recebendo abordagens terapêuticas similares, apresentam evoluções diferentes, evidenciando que o sistema TNM nem sempre é efetivo e novos marcadores terapêuticos e prognósticos (adjuvantes do TNM) são imperativos para o sucesso no tratamento do CEO. As características agressivas do CEO são dependentes das interações entre as células neoplásicas e os componentes do microambiente tumoral (Bagordakis et al., 2016; Dourado et al., 2018). Na verdade, as células neoplásicas estão em permanente interação com o microambiente, particularmente como os fibroblastos associados ao câncer (CAF), células imunes e células endoteliais. Além disso, as células malignas são capazes de modificar a estrutura do seu citoesqueleto e expressar receptores de membrana que facilitam estas interações. A expressão desregulada dos receptores de quimiocinas é uma dessas modificações que favorecem as interações e estão intimamente relacionadas à progressão e metástase do câncer (da Silva et al., 2016). Compreender a relevância clínica e biológica destas interações moleculares é essencial para o desenvolvimento de novas terapias baseadas no bloqueio do eixo quimiocinas-receptores celulares.

Embora nossos resultados tenham demonstrado uma grande variabilidade nos níveis de expressão das quimiocinas e receptores de quimiocinas nas diferentes linhagens celulares de CEO, uma tendência de superexpressão de CCL5 e CCR5 foi observada na maioria das linhagens celulares. Adicionalmente, o tratamento das células tumorais com a proteína recombinante induziu significativamente a proliferação celular independente dos níveis de expressão do ligante e de seu receptor. Nós demonstramos recentemente que a expressão de níveis elevados de CCR5 é associado com um maior risco para o desenvolvimento de metástases linfonodais e um pior prognóstico em pacientes com

carcinoma de células escamosas da cavidade oral e orofaringe (González-Arriagada et al., 2018). O papel do eixo CCL5/CCR5 no desenvolvimento tumoral, especificamente no CEO, permanece parcialmente conhecido. Se por um lado existem relatos acerca da importância da produção desta quimiocina para a indução de respostas imunes eficazes contra tumores (Hanahan et al., 2012), existem também associações da ativação do eixo CCL5/CCR5 e a progressão tumoral e formação de metástases (Long et al., 2012; Kato et al., 2013; Wang et al., 2015). Por meio da ativação de diferentes vias celulares, incluindo por exemplo a ativação de NF- κ B, o eixo CCL5/CCR5 induz a invasão celular via aumento da produção de MMP-2 e MMP-9 (Long et al., 2012; Kato et al., 2013) e a progressão e formação de metástases por meio da indução de transição epitelial-mesenquimal (Klymkowsky et al., 2009; Long et al., 2015). Em concordância com nossos resultados, Aldinucci et al. (2014) demonstraram que CCL5 estimulou a proliferação de células neoplásicas. Estes autores associaram a proliferação celular com o estímulo da via mTOR, que promoveu o aumento da expressão de ciclina D1, cMyc e Dad-1 (Aldinucci et al., 2014). Além disso, os níveis de CCL5 também foram associados à aquisição de resistência ao tratamento com tamoxifen e a progressão do câncer de mama (Niwa et al., 2001; Yi et al., 2013). Em CEO, foi relatado que o eixo CCL5/CCR5 promove a motilidade de células CEO via aumento da produção de MMP-9, sugerindo seu papel na metástase (Chuang et al., 2009). Além disso, polimorfismos no gene *CCR5* foram associados ao aumento do risco de carcinoma de células escamosas orais (Mandal e Mittal, 2011).

CXCR4 é o receptor de quimiocina mais estudado em CEOC de cabeça e pescoço com papel crucial na transição epitelial-mesenquimal (Onoue et al., 2006), e nossos resultados demonstraram uma maior expressão nas linhagens SCC-15 e HSC-3. A recente meta-análise revelou que CXCR4 é um marcador de prognóstico desfavorável e um possível alvo terapêutico em cânceres de diferentes origens (Chen e Zhong, 2015). Um aumento gradual e progressivo na expressão do CXCR4 foi observado em leucoplasias orais, CEO e CEO metastáticos, sugerindo um papel para CXCR4 no desenvolvimento do CEO a partir dos estágios mais iniciais (Xia et al., 2012). CCL19 e CCL21 são os ligandos para o CCR7. Na literatura, há relatos de associação entre a expressão de CCL19/CCL21/CCR7 e metástase linfonodal e pior prognóstico em cânceres da região de cabeça e pescoço (Tsuzuki et al., 2006; Xia et al., 2015), entretanto um estudo recente não encontrou esta associação (Al-Jokhadar et al., 2017). No câncer de mama, a

expressão de CCR7 nos componentes do microambiente tumoral está associada à progressão tumoral e pior prognóstico (Sonbul et al., 2017). Recentemente foi demonstrado CCR7 promove metástase linfonodal por meio da regulação do VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) (Yu et al., 2017). Embora os resultados da literatura apontam CCR7 e seu ligantes como importantes para o desenvolvimento e progressão tumoral, nossos dados mostraram que as linhagens SCC-15 e HSC-3 superexpressam CCR7, mas as outras duas linhagens (SCC-25 e SCC-9 ZsGreen LN-1) apresentam níveis menores de expressão que a linhagem celular controle de referência.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que quimiocinas e seus receptores de superfície podem contribuir para o desenvolvimento e progressão dos CEO. Particularmente a maior expressão de CCL5 e CCR5 em células de CEO pode induzir a proliferação tumoral, resultando na expansão e progressão tumoral, embora outros estudos amplos devam ser realizados para confirmação dos nossos resultados. Os resultados do presente projeto somado com os dados recentemente publicados por nós (González-Arriagada et al., 2018), onde demonstramos que a expressão de CCR5 é um indicador de metástase linfonodal e de um pior prognóstico, revelam um importante papel para o eixo CCL5/CCR5 no CEO com possíveis implicações para a prática clínica, facilitando a definição de um prognóstico correto e identificando novas terapias-alvo.

7 CONCLUSÕES

Os resultados de estudo apontam para um perfil específico e intrínseco de cada linhagem celular em relação a expressão das quimiocinas e de seus receptores celulares. Contudo, uma tendência de superexpressão de CCL5 e CCR5 foi observada entre as diferentes linhagens celulares e CCL5 foi capaz de induzir de maneira consistente a proliferação das células tumorais.

8 REFERÊNCIAS

- Aldinucci D, Colombatti A. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. 2009; 220(2): 418-426.
- Agostini M, Amoêdo ND, Salo T, Coletta RD, Graner E., Mol Cancer Ther, et al. The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. 2014 Mar;13(3):585-95.

Alitalo A, Detmar M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene*. 2012; 31: 4499-4508.

Anders HJ, Romagnani P, Mantovani A. Pathomechanisms: homeostatic chemokines in health, tissue regeneration, and progressive diseases. *Trends Mol Med*. 2014; 20(3):

Bagan JV, Scully C. Recent advances in oral oncology 2008; squamous cell carcinoma aetiopathogenesis and experimental studies. *Oral Oncol*. 2009; 45(7): 45-48.

Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(7): 540-550.

Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease Yingying Le^{1, 2}, Ye Zhou¹, Pablo Iribarren¹ and Ji Ming Wang¹, 2017 2004; (2):95-104

Chinn SB, Myers JN. Oral cavity carcinoma: current management, controversies, and future directions. *J Clin Oncol*. 2015;33:3269-76.

Chen Q, Zhong T. The association of CXCR4 expression with clinicopathological significance and potential drug target in prostate cancer: a meta-analysis and literature review. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:5115-5122.

Chuang JY, Yang WH, Chen HT, Huang CY, Tan TW, Lin YT, Hsu CJ, Fong YC, Tang CH. CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells. *J Cell Physiol*. 2009 Aug;220(2):418-26.

Chung MK, Min JY, So YK, Ko YH, Jeong HS, Son YI, Baek CH. Correlation between lymphatic vessel density and regional metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Head Neck*. 2010; 32(4): 445-451.

Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, Tuluc M. Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Semin Oncol*. 2014; 41(2): 217-234.

Falaki F, Dalirsani Z, Pakfetrat A, Falaki A, Saghravanian N, Nosratzahi T, Pazouki M. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: a retrospective study and review of literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(4): 473-477.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-386.

Ferris RL, Kraus DH. Sentinel lymph node biopsy versus selective neck dissection for detection of metastatic oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2012; 29(7): 693-698.

González-Arriagada WA, Lozano-Burgos C, Zúñiga-Moreta R, González-Díaz, Coletta RD. Clinicopathological significance of chemokine receptor (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 and CXCR4) expression in head and neck squamous cell carcinomas. 2018 Sep; 47(8):755-763. doi: 10.1111/jop.12736.

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. 2014; 32:659-702

Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, Karavidas K, Jay A, Sandison A, Thomas GJ, Kalavrezos N, Hopper C. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol*. 2010; 20: 2-9.

Kato T, Fujita Y, Nakane K, Mizutani K, Terazawa R, Ehara H, Kanimoto Y, Kojima T, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. CCR1/CCL5 interaction promotes invasion of taxaneresistant PC3 prostate cancer cells by increasing secretion of MMPs 2/9 and by activating ERK and Rac signaling. *Cytokine*. 2013; 64(1): 251-257.

Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP, Coletta RD. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. *Oral Oncol*. 2008; 44(5): 509-517.

Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med*. 2010; 16(3): 133–144.

Legler DF, Uetz-von Allmen E, Hauser MA. CCR7: Roles in cancer cell dissemination, migration and metastasis formation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014; 54:78-82.

Li P, Liu F, Sun L, Zhao Z, Ding X, Shang D, Xu Z, Sun C. Chemokine receptor 7 promotes cell migration and adhesion in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck by activating integrin $\alpha\beta 3$. *Int J Mol Med*. 2011; 27(5): 679-687.

Mañes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gómez-Moutón C, Jiménez-Baranda S, Garzón A, Lacalle RA, Harshman K, Ruíz A, Martínez-A C. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *J Exp Med*. 2003; 198(9): 1381-1389.

Marsh D, Suchak K, Moutasim KA, Vallath S, Hopper C, Jerjes W, Upile T, Kalavrezos N, Violette SM, Weinreb PH, Chester KA, Chana JS, Marshall JF, Hart IR, Hackshaw AK, Piper K, Thomas GJ. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J Pathol.* 2011; 223(4): 470-481.

Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Evanoff HL, Kunkel SL. Pivotal role of the CC chemokine, macrophage-derived chemokine, in the innate immune response. *J Immunol.* 2000;164:5362-5368.

Mediators Inflamm. 2014; 2014:292376.

Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001; 410(6824): 50-56.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52(1):145-76

Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med.*

Nitta Y, Hida K, Kitamura T, Higashino F, Ohga N, Fukushima K, Shindoh M. Phenotype of tumor lymphatic vessels is a prognostic factor in human tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2011; 2(1): 79-83.

Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K, Edwards RP, Kalinski P. PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer Res.* 2011; 71(24): 7463-7470.

Onoue T, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Yoshida H, Sato M. Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2006;29:1133-1138

Oliveira JB, Notarangelo LD, Fleisher TA. Applications of flow cytometry for the study of primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008; 8(6): 499-509.

Rentoft M, Coates PJ, Loljung L, Wilms T, Laurell G, Nylander K. Expression of CXCL10 is associated with response to radiotherapy and overall survival in squamous cell carcinoma of the tongue. *Tumour Biol.* 2014; 35(5):4191-4198.

Rodrigues PC, Sawazaki-Calone I, Ervolino de Oliveira C, Soares Macedo CC, Dourado MR, Cervigne NK, et al. Fascin promotes migration and invasion and is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Aug 19;8(43):74736-74754.

Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov I, Gabikian P, Lesniak, MS. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget*. 2013; 4(12): 2171-2185.

Scully C, Bagan JV. Recent advances in oral oncology 2008; squamous cell carcinoma imaging, treatment, prognostication and treatment outcomes. *Oral Oncol*. 2009; 45(6):

Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Tecle H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR, Saltiel AR. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med*. 1999; 5(7): 810-816.

Shah FD, Begum R, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN, Patel PS. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian J Clin Biochem*.

Shang ZJ, Liu K, Shao Z. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2009; 45: 480–485.

Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R. The Global Incidence of Lip, Oral Cavity, and Pharyngeal Cancers by Subsite in 2012. *CA Cancer J Clin* 2017; 7(1):51-64

Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 68(6): 1270-1275.

Soudry E, Preis M, Hod R, Hamzany Y, Hadar T, Bahar G, Strenov Y, Shpitzer T. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. *Clin Otolaryngol*. 2010; 35(4): 307-312.

Wang JM, Deng X, Gong W, Su S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods*. 1998; 220(1-2): 1-17.

Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes. *Oral Oncol.* 2010;46:407-10.

Wolff HA, Rolke D, Rave-Fränk M, Schirmer M, Eicheler W, DoerXer A, et al. Analysis of chemokine and chemokine receptor expression in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell lines. *Radiat Environ Biophys.* 2011; 50:145–154.

Zlotnik A. Chemokines and cancer. *Int J Cancer* . 2006; 119(9): 2026–2029.

ANEXOS

ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO

TCC Henrique Tonelli			
RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE			
20%	17%	6%	3%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS
FONTES PRIMÁRIAS			
1	pct.capes.gov.br Fonte da Internet		5%
2	www.bv.fapesp.br Fonte da Internet		3%
3	www.repositorio.ufrn.br:8080 Fonte da Internet		1%
4	repositorio.unesp.br Fonte da Internet		1%
5	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno		1%
6	repositorio.ufrn.br Fonte da Internet		1%
7	bdtd.ibict.br Fonte da Internet		1%
8	www.repositorio.ufc.br:8080 Fonte da Internet		1%

ANEXO 2 – INICIAÇÃO CIENTÍFICA



VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo	2014/25783-0
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo
Situação	Encerrado
Vigência	01/05/2015 a 30/04/2016
Beneficiário	Henrique Tonelli
Responsável	Ricardo Della Coletta
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em :	14/06/2016
---------------------	------------

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 2	06/05/2016	Aprovado

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Responsável
Comunicamos que o Relatório Científico relativo ao processo acima referido foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.
A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador, sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o bolsista, o qual receberá uma cópia desta mensagem.
Para visualizar o parecer, por favor, acesse o Sistema SAGe (www.fapesp.br/sage), clique no menu Processos/Meus Processos e em Mais Informações/Despachos.
Atenciosamente,
Carlos Henrique de Brito Cruz Diretor Científico da FAPESP

Frases para o Responsável
Não há frases associadas.

Transcrição de Parecer para o Responsável**Parecer do Relatório Científico**

O relatório mostra que aluno desempenhou todas as atividades propostas e agora apresenta relatório com os resultados analisados e discutidos. Os resultados apresentados mostraram que o tratamento com CCL5 recombinante em diferentes doses resulta em aumento da proliferação celular na maioria das diferentes linhagens de carcinoma epidermóide oral testadas. Os autores argumentam que essa expressão aumentada poderá (após aprofundamento nas análises) ser um fator preditivo no prognóstico dessa neoplasia oral. Durante a o período da IC, o aluno apresentou queda de rendimento escolar e encontra-se abaixo do rendimento da sua turma (0.7596 do alunos contra 0.7905 da turma) e aproximadamente entre o grupo de 40% com pior rendimento da classe. No entanto, o aluno foi aprovado em todas as disciplinas cursadas por nota e frequência. O orientador se mostra satisfeito com o desempenho do aluno tanto na pesquisa e atividade laboratorial quanto em seu desempenho acadêmico. Não há publicações relacionadas a esse projeto de IC.

Frases para Termo de Outorga

Não há frases associadas.

Relatório Científico 2 (Aprovado)

Compromisso	10/05/2016
Período Relacionado	10/10/2015 a 30/04/2016
Situação	Atendido