

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Aline Beatriz Mahler Pereira

Estudo da função do receptor de peptídeos formilados 2 (FPR2) no tabagismo: foco na
transição epitelial mesenquimal

Uberaba

2022

Aline Beatriz Mahler Pereira

Estudo da função do receptor de peptídeos formilados 2 (FPR2) no tabagismo: foco na transição epitelial mesenquimal

Tese de doutorado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração I Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de doutorado.

Orientador: Prof^o. Dr. Alexandre de Paula Rogério

Uberaba

2022

Catálogo na fonte:
Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

P489e	<p>Pereira, Aline Beatriz Mahler Estudo da função do receptor de peptídeos formilados 2 (FPR2) no tabagismo: foco na transição epitelial mesenquimal / Aline Beatriz Mahler Pereira. -- 2022. 49 f. : il., graf.</p> <p>Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022 Orientador: Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogerio</p> <p>1. Sistema respiratório. 2. Transição epitelial-mesenquimal. 3. Células epiteliais. I. Rogerio, Alexandre de Paula. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 612.2</p>
-------	---

Aline Beatriz Mahler Pereira

Estudo da função do receptor de peptídeos formilados 2 (fpr2) no tabagismo: foco na transição epitelial mesenquimal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de concentração I - Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogério

Uberaba, 3 de fevereiro de 2022.

Banca Examinadora

Dr. ALEXANDRE DE PAULA ROGÉRIO – Orientador
UFTM

Dra. MARCIA ANTONIAZI MICHELIN
UFTM

Dr. DAVID NASCIMENTO SILVA TEIXEIRA
UFTM

Dra. LUANA PEREIRA BORBA DOS SANTOS
UFRJ

Dra. GIULIA MARIA PIRES DOS SANTOS FREITAS
UFRJ



Documento assinado eletronicamente por **ALEXANDRE DE PAULA ROGERIO, Professor do Magistério Superior**, em 03/02/2022, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCIA ANTONIAZI MICHELIN, Professor do Magistério Superior**, em 03/02/2022, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **DAVID NASCIMENTO SILVA TEIXEIRA, Professor do Magistério Superior**, em 03/02/2022, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giulia Maria Pires dos Santos Freitas, Usuário Externo**, em 03/02/2022, às 13:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luana Pereira Borba dos Santos, Usuário Externo**, em 03/02/2022, às 14:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0675618** e o código CRC **A0DC8878**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a oportunidade de poder concluir mais uma etapa acadêmica através desse trabalho e a oportunidade de aprender cada vez mais e contribuir com a pesquisa científica. Além disso, agradeço ao meu orientador Alexandre de Paula Rogerio que está comigo desde o mestrado e que sempre me acolheu e me ensinou da melhor forma possível. Aos meus pais, que desde sempre me apoiam nas minhas escolhas. E ao Leandro pela paciência, principalmente na reta final da defesa. Aos profissionais do laboratório, Rubens, Renata, Ana Paula e professor David que foram presentes no meu dia a dia. E a CAPES, pelo auxílio recebido para desenvolver o projeto.

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

RESUMO

Nas vias aéreas, a transição epitelial-mesenquimal (TEM) tem sido implicada na patogênese da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). O epímero da resorvina D1 (AT-RvD1) é conhecida por estar envolvida na resolução da inflamação e inibe a TEM induzida por TGF- β 1 em células A549. Nesse estudo, avaliamos o papel do epímero AT-RvD1 na TEM induzida por extrato de fumaça de cigarro (CSE) em células epiteliais brônquicas (BEAS-2B). A CSE aumentou a produção de TGF- β 1 e as expressões de marcadores mesenquimais (N-caderina, vimentina, SMAD2/3 e Slug). Além disso, CSE diminuiu a expressão de E-caderina, um marcador epitelial. Além disso, a CSE induziu um aumento na expressão do receptor de ROS e FPR2. Quando AT-RvD1 foi associado, houve restauração da expressão de E-caderina e redução da expressão de N-caderina, vimentina e SMAD2/3 e produção de TGF- β 1 em células BEAS-2B estimuladas por CSE. O epímero AT-RvD1 diminuiu os níveis de ROS e FPR2. Em conclusão, nossos resultados demonstram que AT-RvD1 diminuiu a TEM induzida por CSE ao restaurar a expressão de E-caderina e inibir a produção de TGF- β 1 e ROS e a expressão de N-caderina, vimentina e SMAD2/3. Juntos, esses resultados sugerem que AT-RvD1 tem potencial para controlar a transição epitelial-mesenquimal.

Palavras-chave: transição epitelial-mesenquimal; CSE; AT-RvD1.

ABSTRACT

In the airways, the epithelial-mesenchymal transition (EMT) has been implicated in the pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Aspirin-triggered resolvins D1 (AT-RvD1) is known to be involved in the resolution of inflammation and inhibits TGF- β 1-induced EMT on A549 cells. Here, we extend these results and evaluated the role of AT-RvD1 in EMT induced by cigarette smoke extract (CSE) on bronchial epithelial cells (BEAS-2B). CSE increased TGF- β 1 production and the mesenchymal markers (N-cadherin, vimentin, SMAD2/3 and Slug) expressions. In addition, CSE decreased E-cadherin expression, an epithelial marker. Furthermore, CSE induced an increase in ROS and FPR2 receptor expression. When AT-RvD1 was associated, there was restored the expression of E-cadherin and reduced expression of N-cadherin, vimentin and SMAD2/3 and TGF- β 1 production on BEAS-2B cells stimulated by CSE. In addition, AT-RvD1 decreased ROS and FPR2 levels. In conclusion, our results demonstrate that AT-RvD1 decreased CSE-induced EMT by restored the expression of E-cadherin and inhibited the TGF- β 1 and ROS production and expression of N-cadherin, vimentin and SMAD2/3. Together, these results suggest that AT-RvD1 has the potential to control epithelial-mesenchymal transition.

Keywords: epithelial-mesenchymal transition; CSE; AT-RvD1.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549: Célula epitelial adenocarcinoma alveolar humano

Akt: Proteína quinase B

AT-RvD1: Epímero resolvina D1

BEAS-2B: Célula epitelial brônquica humana

BOC2: N-terc-butiloxicarbonil-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe

CTGF: Fator de crescimento do tecido conjuntivo

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica

ELISA: Ensaio de imunoenzimático

ERK1/2: Sinalização extracelular regulada por quinase 1/2

fMLP: Tripeptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

FPR: Receptores de peptídeos formilados

FPR1: Receptores de peptídeos formilados 1

FPR2: Receptores de peptídeos formilados 2

FPR3: Receptores de peptídeos formilados 3

H358: Célula de câncer pulmonar

IL: Interleucina

IL-1: Interleucina-1

LXA₄: Lipoxina A₄

MMP-9: Metaloproteinase

MMPs: metaloproteinases

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

NF-κB: Fator de transcrição NF-kappa B

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PE: Ficoeritrina

PI3-K: Fosfoinosítido 3 quinase

RvD1: Resolvina D1

RvD2: Resolvina D2

S100A4: Proteína A4 de ligação de cálcio S100

SAA: Soro amiloide A

SAA1: Soro amiloide A1

SFB: Soro fetal bovino

Smad2: Mothers against decapentaplegic 2

Smad3: Mothers against decapentaplegic 3

Snail1: Zinc finger transcription factor 1

Snail2 e Slug: Zinc finger transcription factor 2

TEM: transição epitelial mesenquimal

TGF- β 1: Fator de crescimento tumoral beta 1

Twist1: Twist-related protein 1

Zeb1: Zinc finger E-box-binding homolog 1

Zeb2: Zinc finger E-box-binding homolog 2

α -SMA: Alfa actina de músculo liso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito do cigarro nas células epiteliais e nos fibroblastos

Figura 2: Classificação das transição epitelial mesenquimal

Figura 3: Marcadores epiteliais e mesenquimais

SUMÁRIO

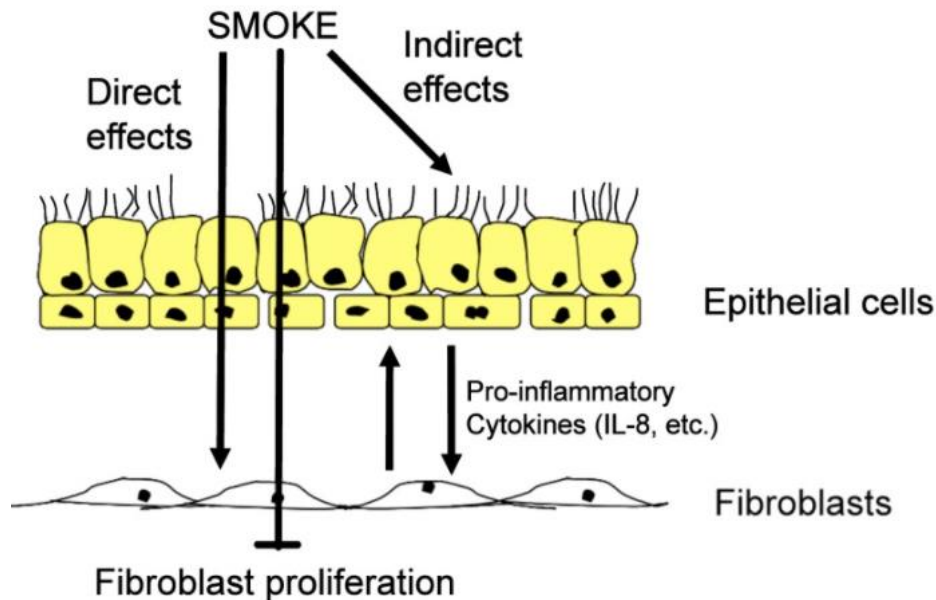
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 METODOLOGIA.....	22
APÊNDICE B – Comprovante submissão artigo.....	25
APÊNDICE C - Participação dos coautores no artigo.....	26

1 INTRODUÇÃO

Os riscos do tabagismo à saúde são bem documentados e mesmo assim uma proporção substancial de homens e mulheres nos países desenvolvidos continuam habitualmente a fumar cigarros. Para piorar a situação, as taxas de prevalência de tabagismo estão em ascensão nos países em desenvolvimento, portanto são esperados aumentos nas taxas de morbidade e mortalidade (Peto *et al.*, 1999; Sealock, Sharma, 2021). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 8 milhões de pessoas morrem de doenças associadas ao tabagismo a cada ano. Mais de 7 milhões dessas mortes resultam do uso direto desse produto, enquanto cerca de 1,2 milhão é o resultado de não-fumantes expostos ao fumo passivo. A OMS afirma ainda que cerca de 80% dos mais de um bilhão de fumantes do mundo vivem em países de baixa e média renda onde o peso das doenças e mortes relacionadas ao tabaco é maior (WHO, 2020). Das numerosas doenças relacionadas ao tabagismo o câncer de pulmão é o mais letal e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é a mais comum (Houghton, 2013). A fumaça do cigarro, além de conter substâncias carcinogênicas que alteram a apoptose e proliferação celular (Aoshiba *et al.*, 2003), contém substâncias com potencial oxidativo e pró-inflamatório (Crapo, 2003). O tabagismo, especialmente em fumantes crônicos, induz a ativação e o recrutamento de células hematopoiéticas como os neutrófilos para as vias aéreas. Além disso, induz a ativação de células estruturais como as células epiteliais brônquicas (Kou *et al.*, 2011; Strzelak *et al.*, 2018). O epitélio das vias aéreas além da função na manutenção da condução de ar para os alvéolos e proteção do pulmão contra patógenos, alérgenos e partículas inaladas, modula a resposta imune natural e adaptativa determinando assim a intensidade e a qualidade da resposta inflamatória pulmonar (Lambrecht, Hammad, 2012; Wohnhaas *et al.*, 2021). A exacerbação do processo inflamatório induzido pela fumaça do cigarro pode provocar alterações significativas na expressão de genes em células epiteliais das vias aéreas podendo contribuir para o desenvolvimento e a progressão de doenças como o câncer do pulmão e a DPOC (Bozinovski *et al.*, 2016). Além das células epiteliais, os fibroblastos são também ativados durante o tabagismo. Em repostas as repetidas exposições à fumaça do cigarro ocorre a ativação de uma resposta fibroblástica desregulada e exagerada ocasionando depósitos excessivos de componentes da matriz extracelular podendo causar fibrose e remodelamento das vias aéreas de pacientes com DPOC (Figura1) (Krimmer *et al.*, 2012;

Salazar, Herrera, 2011; Zhou-Suckow *et al.*, 2017; Jensen *et al.*, 2012). Interessante, os sobrenadantes de culturas de células epiteliais brônquicas contêm fatores que estimulam ou inibem a proliferação de fibroblastos (Thompson *et al.*, 1995). Da mesma forma, os fibroblastos, através de secreção de fatores de crescimento, regulam a diferenciação de células epiteliais (Skibinski *et al.*, 2007) induzindo, por exemplo, a transição epitelial mesenquimal (TEM), processo no qual as células epiteliais adquirem características mesenquimais do tipo fibroblasto (Pain *et al.*, 2014). Durante o processo da ativação da TEM ocorre a redução da expressão de proteínas epiteliais tais como a E-caderina e citoqueratina (proteínas envolvidas na adesão e no contato célula-célula) e aumento da expressão de proteínas mesenquimais tais como N-caderina e vimentina (proteínas envolvidas na migração de células). Além disso, ocorre alteração na expressão de componentes da matriz extracelular (fibronectina e colágeno) e de enzimas tais como as metaloproteinases (MMPs) favorecendo a migração e invasão celular (Hay, 2005; Ikenouchi *et al.*, 2003; Ozdamar *et al.*, 2005).

Figural- Efeito do cigarro nas células epiteliais e nos fibroblastos

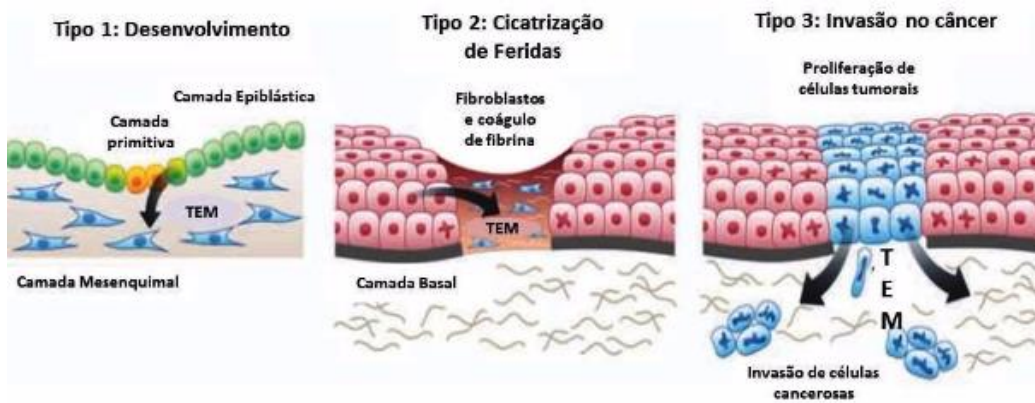


Fonte: Jensen, *et al.*, 2012.

A TEM pode ser classificada em três categorias com diferenças funcionais: Tipo I (associado com a embriogênese); Tipo II (associado à cicatrização fisiológica e ao desenvolvimento de fibrose patológica) e Tipo III (associado com câncer e metástase) (Figura 2) (Lesseps, Brown, 1974; Lovisa, 2021; Scanlon *et al.*, 2013). Durante a

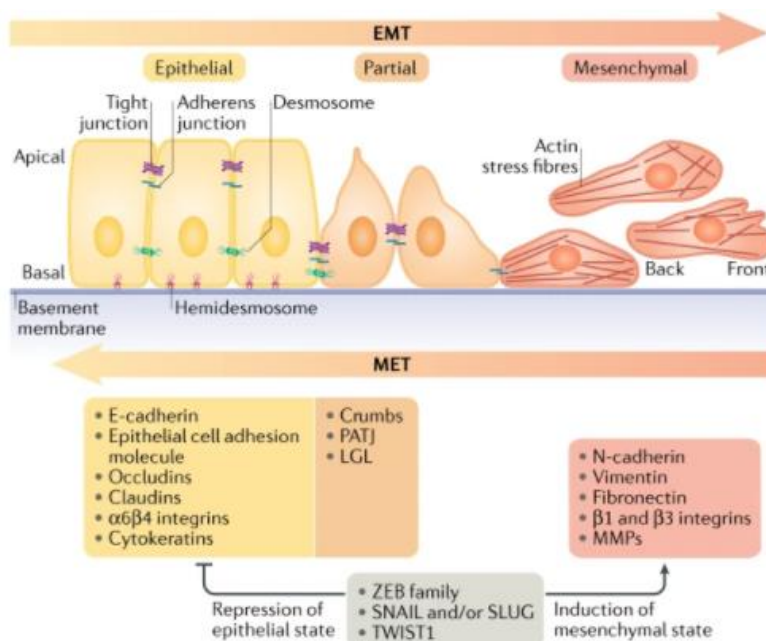
exacerbação e cronificação do processo inflamatório assim como nas agressões crônicas do epitélio a TEM do Tipo II pode ser continuamente ativada ocasionando a fibrose tecidual como observado, por exemplo, na fibrose idiopática pulmonar (Selman, Pardo, 2003; Yeung, Yang, 2017; Selman *et al.*, 2004). Vários fatores podem induzir a TEM como o fator de crescimento de fibroblasto-2, IL-1 e o fator de crescimento tumoral (TGF)- β 1 (Pain *et al.*, 2014; Willis, Borok, 2007). Estes fatores ativam fatores de transcrição como Smad2 (*mothers against decapentaplegic 2*), Smad3, Twist1 (*Twist-related protein 1*), Zeb1 (*zinc finger E-box-binding homolog 1*), Zeb2, Snail1 (*zinc finger trascription fator 1*), Snail2 (conhecido também como Slug) e fator de transcrição NF-kappa B (NF- κ B) que modulam a TEM (Figura 3) (Pain *et al.*, 2014; Peinado *et al.*, 2007; Nowrin *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Dongre; Weinberg, 2019).

Figura 2- Classificação das transição epitelial mesenquimal



Fonte: Scanlon *et al.*, 2013.

Figura 3- Marcadores epiteliais e mesenquimais



Fonte- Dongre; Weinberg, 2019.

A correlação da TEM com o aumento do potencial metastático de células tumorais de vários tipos de cânceres como o câncer de pulmão é amplamente conhecida (De Craene, Berx, 2013). Apesar disto somente nos últimos anos as pesquisas estão associando a TEM como um fator de risco no desenvolvimento da fibrose das vias aéreas em pacientes como a DPOC. A expressão gênica de TGF- $\beta 1$, indutor de TEM, é significativamente maior no epitélio das vias aéreas de indivíduos fumantes com DPOC quando comparados com os indivíduos controles (Takizawa *et al.*, 2001). Além disso, nos pacientes com DPOC foi observado uma correlação positiva entre a expressão de TGF- $\beta 1$, histórico de tabagismo (anos e quantidade de cigarro por dia) e o grau de obstrução das vias aéreas. Estudos *in vitro* com células epiteliais alveolares de ratos (linhagem RLE-6TN) e camundongos (AT2) assim como células epiteliais alveolar de carcinoma humano (A549) demonstraram a indução da TEM após tratamento com TGF- $\beta 1$ (Willis, Borok, 2007; Kasai *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Willis *et al.*, 2006). Além do TGF- $\beta 1$, o extrato da fumaça do cigarro também induziu a TEM em células epiteliais brônquicas (linhagem BEAS-2B) e células epiteliais alveolares tumorais (linhagem A549 e H358) humanas (Zhang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2014; Veljkovic *et al.*, 2011). O extrato da fumaça do cigarro induziu redução da expressão de marcadores epiteliais (E-caderina e citoqueratina), aumento da expressão de proteínas mesenquimais (fibronectina, α -SMA e/ou vimentina) assim como o aumento da produção de MMP-9

e/ou colágeno I. Além disso, induziu a ativação de fatores de transcrição (Smad3, NF- κ B e Slug) (Zhang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2014; Veljkovic *et al.*, 2011).

Em biópsias endobrônquicas das vias aéreas de fumantes fisiologicamente normais, fumantes e ex-fumantes com DPOC foi observado aumento dos biomarcadores da TEM (redução da expressão de E-caderina e aumento da expressão de MMP-9 e S100A4, uma proteína de fibroblasto) quando comparados com indivíduos controles (Sohal *et al.*, 2011). No entanto, estas alterações foram mais evidentes em fumantes com DPOC. Em outro estudo, Milara *et al.*, 2013 demonstraram que os marcadores mesenquimais como α -actina de músculo liso, vimentina e colágeno do tipo I estavam aumentados e os marcadores epiteliais como a E-caderina e citoqueratina estavam reduzidos nas células epiteliais brônquicas de fumantes com DPOC em comparação com indivíduos não-fumantes. Estes autores sugeriram que a TEM pode potencialmente estar associada à fibrose pulmonar (TEM do tipo II) e a progressão do câncer de pulmão e metástase (TEM do Tipo III) em pacientes com DPOC (Milara *et al.*, 2013).

Interessante, a nicotina, o principal componente ativo e viciante do cigarro, induziu também a TEM em linhagem de células epiteliais brônquicas primárias humanas e do carcinoma pulmonar humano (A549) através da ativação de Zeb1 e Zeb2 (Dasgupta *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2013; Pillai, Chellappan, 2012). Foi demonstrado que a indução de TEM pela nicotina foi dependente do seu receptor nicotínico de acetilcolina subunidade $\alpha 7$ (Pillai, Chellappan, 2012).

Os receptores de peptídeos formilados (FPR) estão envolvidos na modulação do câncer e da resposta inflamatória da DPOC, dentre outras doenças (Bozinovski *et al.*, 2012; Li, Ye, 2013). Estes receptores foram primeiramente encontrados em neutrófilos (Hoyle, Freer, 1984; Migeotte *et al.*, 2006) e posteriormente em várias células como as células epiteliais brônquicas, demonstrado por nosso e outros grupos (Bozinovski *et al.*, 2012; Migeotte *et al.*, 2006; Rogerio *et al.*, 2012). Os receptores FPRs pertencem à família de receptores acoplados a proteína G com genes agrupados no cromossomo 19q13.3 que codificam três receptores: FPR1, FPR2 e FPR3 (Boulay *et al.*, 1990). Os peptídeos formilados como, por exemplo, o tripeptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) foram os primeiros agonistas descritos destes receptores (Migeotte *et al.*, 2006). Estes peptídeos, liberados tanto por bactérias Gram-negativas quanto durante o processo de degeneração celular (Carp, 1982), induzem o recrutamento de leucócitos, a produção

de citocinas, secreção de enzimas lisossomais, geração de mediadores lipídicos e produção de espécies reativas de oxigênio (Migeotte *et al.*, 2006). Interessante, diferentes agonistas do receptor FPR2 demonstram efeitos opostos. Por exemplo, enquanto o soro amilóide A (SAA; proteína de fase aguda hepática associada ao processo inflamatório) (Bozinovski *et al.*, 2012) é pró-inflamatório (Migeotte *et al.*, 2006), a lipoxina A₄, as resolvinas (como a RvD1) e seus epímeros (como o AT-RvD1), mediadores lipídicos endógenos produzidos durante o processo de resolução da inflamação, são anti-inflamatórios (Serhan *et al.*, 2015; Dalli *et al.*, 2016). Existem vários mecanismos que podem explicar a versatilidade do receptor FPR2, como por exemplo, a ligação diferencial dos agonistas em domínios específicos do receptor. O SAA liga-se nos loops extracelulares I e II, enquanto a lipoxina A₄, as resolvinas e seus epímeros ligam-se no loop extracelular III do receptor FPR2 (Bena *et al.*, 2012; Nacht *et al.*, 1976; Scott, 1991). Além disso, a ligação dos agonistas do receptor FPR2 (pró- ou anti-inflamatórios) podem induzir diferentes alterações conformacionais no receptor o que permite a ativação de diferentes vias de sinalização (fosfolipases, quinases, dentre outros) (Scott, 1991; Galvão *et al.*, 2021).

A expressão dos receptores FPRs foi baixa nos tecidos neoplásicos quando comparado com os tecidos peritumorais circundantes em biopsias pulmonares de pacientes com câncer de pulmão (Cattaneo *et al.*, 2015). No entanto, a expressão do receptor FPR2 está aumentada nas células epiteliais brônquicas de pacientes com DPOC quando comparados com os indivíduos controles (Bozinovski *et al.*, 2012). Além disso, o SAA (agonista pró-inflamatório de FPR2), potente quimiotático para neutrófilos, está presente em alta concentração nas vias aéreas de pacientes com DPOC (Bozinovski *et al.*, 2012). O SAA induz a liberação de mediadores pró-inflamatório em células epiteliais brônquicas tanto de linhagem celular (BEAS-2B) quanto primárias (isoladas de pacientes com DPOC) (Bozinovski *et al.*, 2012). Em corroboração com estes resultados, pacientes com DPOC demonstraram baixa capacidade biosintética para a produção de lipoxina A₄ (agonista anti-inflamatório) favorecendo a exacerbação do processo inflamatório (Balode *et al.*, 2012). Em outro estudo, a RvD1 reduziu a produção de mediadores pró-inflamatórios em fibroblastos isolados do pulmão de indivíduos saudáveis estimulados com extrato da fumaça do cigarro (Hsiao *et al.*, 2013). A RvD1 reduziu também o recrutamento de neutrófilos para o pulmão e a produção de citocinas pró-inflamatórias no lavado broncoalveolar de camundongos expostos à fumaça de cigarro (Hsiao *et al.*, 2013).

Além do receptor FPR2, o receptor FPR1 também demonstrou importantes funções na modulação da resposta inflamatória induzida pela fumaça do cigarro. Camundongos com deleção gênica do receptor FPR1 demonstraram redução do processo inflamatório provocado pela fumaça do cigarro (Cardini *et al.*, 2012). A estimulação do receptor FPR1 por WKYMVm, um agonista pró-inflamatório, induziu a proliferação de células epitelial do câncer de pulmão humano (Calu-6) através da fosforilação do receptor do fator crescimento epidermal (EGFR), da ativação da via de sinalização Src e do fator de transcrição STAT3 (Cattaneo *et al.*, 2011).

Prevete *et al.*, 2015 demonstraram que o fMLP (agonista pró-inflamatório de receptores FPRs) induziu a TEM em células epiteliais do câncer gástrico (MKN28, AGS e MKN45) através do aumento da expressão gênica de vimentina e dos fatores de transcrição Twist2, Slug, Snail e Zeb1 (Prevete *et al.*, 2015). Em outro estudo *in vitro*, utilizando linhagem de células epiteliais do túbulo proximal de rim humano (HK-2), foi demonstrado que a LXA₄ (agonista seletivo do receptor FPR2) reduziu a TEM induzida pelo fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) via redução da ativação de Ras, MEK, ERK1/2, PI3-K e Akt. No entanto, a LXA₄ não reduziu a ativação de TEM induzida pelo TGF- β 1 (Wu *et al.*, 2010). Diferente da LXA₄, a RvD1 e RvD2 reduziram a ativação de TEM induzida pelo TGF- β 1 em linhagens de células de câncer pulmonar humano (A549, H838, H1299 e H1703) (Yang *et al.*, 2019). Estas resolvinas reduziram a expressão de marcadores mesenquimais como N-caderina, α -SMA e vimentina via redução da ativação dos fatores de transcrição de Zeb1 e Snail1. Estes efeitos foram dependentes dos receptores FPR2 (Lee *et al.*, 2013). AT-RvD1 inibiu a TEM em células do carcinoma pulmonar humano (A549) estimuladas com TGF- β aumentando a expressão de E-caderina e reduzindo a expressão de vimentina (de Oliveira *et al.*, 2015).

Nosso grupo estuda, ao longo dos anos, os efeitos dos agonistas e das funções dos receptores FRP2 em diversos modelos experimentais. Por exemplo, RvD1 e/ou do AT-RvD1 demonstraram efeitos anti-inflamatórios no modelo experimental de inflamação alérgica das vias aéreas induzida pela ovalbumina (Rogerio *et al.*, 2012) e de lesão aguda pulmonar induzida por ácido (Eickmeier *et al.*, 2013). Nosso grupo demonstrou também que o AT-RvD1 reduziu a produção das quimiocinas CCL2 e IL-8 assim como a ativação de STAT6 e STAT1 em células epiteliais brônquicas (linhagem celular BEAS-2B) estimuladas com a IL-4 e o lipopolissacarídeo, respectivamente. Estes efeitos foram

dependentes do receptor FPR2, uma vez que o antagonista (BOC2) deste receptor reverteu os efeitos anti-inflamatórios do AT-RvD1 (de Oliveira *et al.*, 2015).

No presente projeto, pretende-se estender os estudos do receptor FPR2, com um foco na modulação da TEM em células epiteliais brônquicas humanas (linhagem BEAS-2B) estimuladas com extrato da fumaça do cigarro e tratadas com o epímero da resolvina (AT-RvD1).

2 JUSTIFICATIVA

O tabagismo é umas das mais sérias preocupações na área da saúde podendo causar doenças com significativas taxas de morbidade e mortalidade. O tabagismo favorece o aumento de agonistas pró-inflamatórios do receptor FPR2 favorecendo o desenvolvimento do processo inflamatório nas vias aéreas de pacientes com DPOC. O processo de “transição epitelial mesenquimal (TEM)” foi reconhecido como potencial fator do desenvolvimento da fibrose e do remodelamento das via aéreas na DPOC. Interessante, os receptores FPRs também modulam a ativação da TEM, o qual foi reconhecido como potencial fator do desenvolvimento da fibrose nas vias aéreas de pacientes com DPOC. Enquanto o agonista pró-inflamatório dos receptores FPRs (fMLP) estimula a TEM, agonistas anti-inflamatórios (LXA₄, RvD1 e RvD2) reduzem o aumento da TEM induzido por CTGF e/ou TGF- β 1. Uma vez que o papel da TEM em patologias das vias aéreas ainda não está bem descrito, as pesquisas para o entendimento dos mecanismos envolvidos na modulação da TEM são necessários, tanto para a identificação de alvos terapêuticos quanto para a prevenção e/ou o tratamento da fibrose, do remodelamento das vias aéreas e do câncer de pulmão em indivíduos fumantes, principalmente aqueles com DPOC. Sendo assim, este estudo pode favorecer a melhor compreensão da função do receptor FPR2 na modulação da TEM associada ao tabagismo podendo no futuro auxiliar no desenvolvimento de drogas a serem utilizadas para o tratamento de doenças das vias aéreas como a DPOC.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Investigar o efeito do epímero da resolvina (AT-RvD1) na modulação da TEM em células epiteliais brônquicas humanas (BEAS-2B) estimuladas com o extrato da fumaça do cigarro.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Após o tratamento ou não com o agonista anti-inflamatório (AT-RvD1), as células epiteliais brônquicas (BEAS-2B) estimuladas com extrato da fumaça do cigarro serão avaliados os seguintes parâmetros:

3.2.2 Avaliar a expressão do receptor FPR2 nas células epiteliais;

3.2.3 Avaliar a expressão gênica (SMAD2);

3.2.4 Avaliar a produção de TGF- β 1;

3.2.5 Avaliar a expressão de marcador epitelial (E-caderina) e mesenquimal (N-caderina, vimentina, SLUG e SMAD2/3).

4 METODOLOGIA

4.1 Preparação do extrato da fumaça de cigarro

Cigarros comerciais (Marlboro®) foram utilizados neste estudo. O extrato da fumaça do cigarro foi preparado como descrito por Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2012). Brevemente, a fumaça de um cigarro foi borbullhada em kitassato contendo 25 mL de PBS através do uso de vácuo. O extrato da fumaça do cigarro foi ajustado para o pH 7,4 e posteriormente filtrado em filtro de 0,22 µm. Este extrato foi considerado como 100%. Depois, realizou uma diluição do mesmo para a realização dos experimentos e a absorbância das amostras diluídas foi medida por espectrofotometria a 320 nm para padronizar a concentração do extrato em cada experimento independente.

4.2 Citotoxicidade celular

A citotoxicidade das células foi realizada através do ensaio colorimétrico com o sal de tetrazolium (MTT – [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium]), de acordo com (Jang *et al.*, 2014). As células epiteliais brônquicas (1×10^5 cel/poço) foram cultivados em placa de 96 poços na ausência ou na presença do CSE (1% e 2,5%) durante 24 horas a temperatura de 37°C em estufa de CO₂ a 5%. O volume final de cada poço foi ajustado para 180 µL com meio de cultura D-MEM/F-12 acrescido de soro fetal bovino (10%) e 1% de antibióticos (penicilina, estreptomicina e gentamicina). Em seguida foi adicionado 20µL de MTT e incubados por 4 horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. O sal resultante (formazan) dessa metabolização foi solubilizado com a adição de 100µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) puro (Sigma) para dissolver os cristais. Agitou-se então a placa em um agitador de placa por 10 minutos e após 5 minutos para a estabilização da cor, foi realizado a leitura da absorbância em um comprimento de onda de 570 nm em leitor de ELISA (Turner Biosystems – Modulus Microplate).

4.3 Células epiteliais brônquicas e estimulação com o extrato da fumaça do cigarro

A linhagem de células epiteliais brônquicas humanas (BEAS-2B; ATCC, Rockville, MD) foi cultivada em meio de cultura conforme especificações dos

fabricantes. As células (1×10^5 cel/mL) foram incubadas em placas de 96 poços na ausência ou presença de extrato da fumaça de cigarro (1%) e as análises foram realizadas 48 h após a estimulação (Wang *et al.*, 2013).

4.4 Tratamento com AT-RvD1

As células epiteliais brônquicas foram tratadas com AT-RvD1 (100 nM) (Liu *et al.*, 2016) 30 minutos antes da estimulação com o extrato da fumaça do cigarro.

4.5 Expressão do receptor FPR2, E-caderina e N-caderina

O estudo da expressão gênica do receptor FPR2, da proteína epitelial E-caderina e da proteína mesenquimal N-caderina nas células epiteliais brônquicas foi realizado através de citometria de fluxo (Li, Ye, 2013; Nishioka *et al.*, 2015).

4.6 Expressão do receptor FPR2 nas células epiteliais brônquicas

A expressão do receptor FPR2 na superfície das células epiteliais brônquicas foi realizada por citometria de fluxo (Norling *et al.*, 2012).

4.7 Quantificação de TGF- β 1

A detecção de TGF- β 1 no sobrenadante de cultura das células epiteliais foi realizada através de ensaio imunoenzimático de acordo com as instruções dos fabricantes (R&D System ou BD Pharmingen).

4.8 Avaliação da expressão das proteínas epiteliais e mesenquimais

A expressão da proteína epitelial (E-caderina) e mesenquimal (N-caderina, vimentina, SLUG e SMAD2/3) foi determinada por citometria de fluxo (Shen *et al.*, 2014; Prevede *et al.*, 2015).


4.9 Avaliação da expressão gênica SMAD2

A determinação da expressão gênica (SMAD2) foi realizada através do ensaio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (Li , Ye, 2013; Nishioka et al., 2015).

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média. A avaliação dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey ou com o teste t de Student. Valores de P menores do que 0,05 serão considerados estatisticamente significativos.

APÊNDICE B- Comprovante submissão artigo

Toxicology Letters  **Editorial Manager**

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • POLICIES

Role: Author Username: alexandre.rogerio@ufm.edu.br

Pages will be taking a 4-hour maintenance period starting Wednesday, January 12th at 6:00pm ET. Please note you may experience slowness or site connectivity issues during this time. Please be sure to save your work.

Submissions Being Processed for Author Alexandre Paula Rogerio

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Results per page: 10

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission View Reference Checking Results		Aspirin-triggered RVD1 (AT-RVD1) modulates epithelial-mesenchymal transition on bronchial epithelial cells stimulated with cigarette smoke extract	Jan 10, 2022	Jan 10, 2022	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Results per page: 10

<< Author Main Menu

APÊNDICE C- Participação dos coautores no artigo

Jhony Robison de Oliveira

- Ajudou na padronização do extrato da fumaça do cigarro.

Henrique Ismarsi de Souza

- Ajudou na coleta de alguns experimentos.

Gustavo Cintra Gouveia

- Ajudou na padronização da cultura celular.

Bruno Sada Salerno

- Ajudou na padronização da cultura celular.

Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

- Ajudou no PCR.

Fernanda Bernadelli de Vito

- Ajudou com a aquisição dos dados de citometria.

Hélio Moraes de Souza

- Ajudou no PCR.

Paulo Roberto da Silva

- Disponibilizou kits de ELISA.

Bruce David Levy

- Cedeu o mediador lipídico AT-RvD1 para a realização dos experimentos.

Alexandre de Paula Rogério

- Orientador do projeto.