

PAPEL DA ANEXINA A1 NO MELANOMA PRIMÁRIO: ESTUDO *IN VIVO* E EM ESFERÓIDES

Sarah Eloísa Esteves Conceição

Pablo Rhasan dos Santos Scharf

Prof^a. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

sarah.eloisa@unifesp.br

Objetivos

O presente projeto investigou a participação da AnxA1 na formação do melanoma primário e na organização das células de melanoma para a formação do esferoide.

Métodos e Procedimentos

Células de melanoma murino B16F10 foram cultivadas em meio DMEM High suplementado com 10% de soro fetal bovino. Esferoides foram formados pelo método da agarose (10.000 células/poço em placas de 96 poços). Os tratamentos dos esferoides incluíram o peptídeo mimético Ac2-26, AnxA1 recombinante (AnxA1r), o agonista de FPR1 N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e os antagonistas seletivos CsH (FPR1) e WRW4 (FPR2). Ensaio complementares envolveram quantificação da expressão de AnxA1 por citometria de fluxo, clonogenicidade e migração (*wound healing*). Os resultados obtidos foram analisados pela Anova seguido de testes específicos empregando o programa Prism v8.

Resultados

Esferoides de B16F10 apresentaram maior expressão intracelular de AnxA1 em relação às culturas 2D, sugerindo seu papel na organização e manutenção morfológica celular

(Figura 1). O tratamento com peptídeo Ac2-26 mimético à porção terminal da AnxA1 aumentou a área e diâmetro dos esferoides apenas na concentração de 10 μ M, enquanto AnxA1r e doses menores de Ac2-26 não tiveram efeito (Figura 2). A inibição de FPR1 pelo antagonista farmacológico CsH reduziu o tamanho dos esferoides, ao passo que o bloqueio de FPR2 (WRW4) não alterou a morfologia (Figura 3). Já a ativação de FPR1 por fMLP diminuiu a compactação dos esferoides de forma concentração-dependente (Figura 4).

As análises subsequentes, que visaram avaliar a participação da AnxA1 e do receptor FPR1 nos eventos celulares envolvidos na formação dos esferoides mostraram que somente o tratamento com Ac2-26 aumentou a clonogenicidade, enquanto fMLP e CsH não apresentaram efeito (Figura 5). No entanto, os tratamentos com Ac2-26 ou fMLP aumentaram a migração celular e o tratamento com CsH reduziu a migração celular (Figura 5).

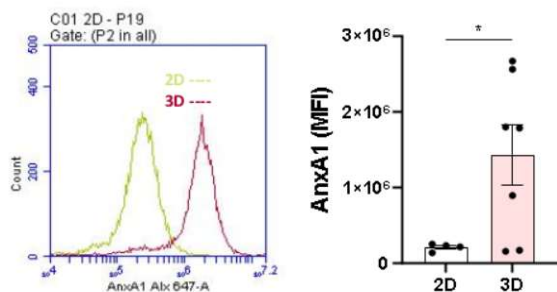


Figura 1. Análise por citometria de fluxo da síntese de AnxA1 intracelular em células B16F10 cultivadas em monocamada (2D) e em esferoides 3D.

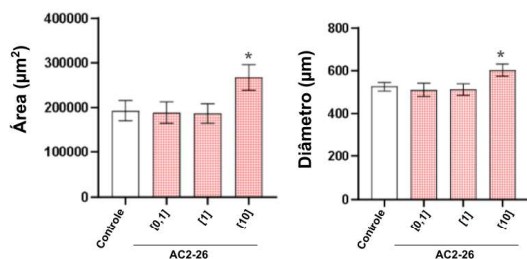


Figura 2. Análise da área e do diâmetro dos esferoides de B16F10 tratados com Ac2-26 (0,1;1 e 10 μM).

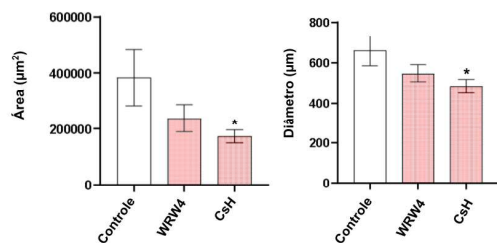


Figura 3. Análise da área e do diâmetro de esferoides de B16F10 tratados com CsH e WRW4.

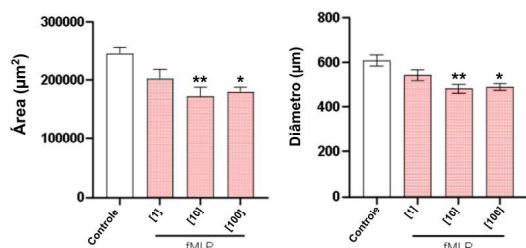


Figura 4. Análise da área e do diâmetro dos esferoides tratados com fMLP (1 nM, 10 nM e 100

nM) na morfologia e dimensão de esferoides de células B16F10.

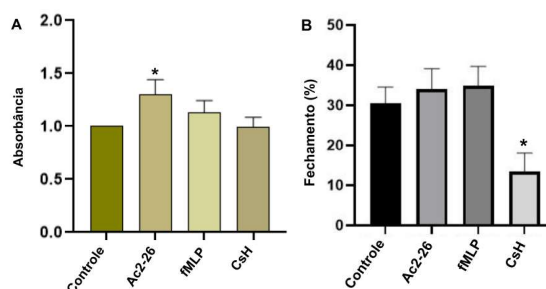


Figura 5. (A) Análise de clonogenicidade de células B16F10 não tratadas, tratadas com Ac2-26 (10 μM), fMLP (10 nM) ou ciclosporina H (0,1 μL). (B) Análise quantitativa da migração celular de B16F10 tratadas com Ac2-26, fMLP e CsH (0,1 μL) com base no percentual de fechamento da área do wound após 20 horas.

Conclusões

Os dados aqui apresentados mostram que a AnxA1 intracelular pode ter papel fundamental na organização tridimensional dos esferóides, e que os efeitos mediados pelo receptor FPR1 são complexos, e refletem os dados já mostrados na literatura quanto a complexidade dos efeitos dependente das diferentes interações de ligantes ao FPR1 (Araújo et al., 2021; Sandri et al., 2023).

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Sandra H P Farsky concebeu e planejou o estudo; Sarah E.E. Conceição e Pablo R. S Scharf realizaram os experimentos e análise dos dados. Todos os autores aprovaram a versão final do resumo.

Referências

Araújo, T.G. et al. Annexin A1 as a Regulator of Immune Response in Cancer. *Cells*. 2021 Aug 30;10(9):2245. doi: 10.3390/cells10092245.

Sandri, S. et al. Role of Annexin A1 Secreted by Neutrophils in Melanoma Metastasis. *Cells*, v. 12, n. 3, p. 425–425, 27 Jan 2023.