

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Marcelo de Oliveira Fonseca

**Efeitos de altas concentrações de cortisol em culturas em monocamada e 3d
de linhagens HEP-2 e L929**

São José dos Campos
2021

Marcelo de Oliveira Fonseca

**Efeitos de altas concentrações de cortisol em culturas em monocamada e 3d
de linhagens HEp-2 e L929**

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares.

São José dos Campos
2021

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Fonseca, Marcelo de Oliveira
Efeitos de altas concentrações de cortisol em culturas em monocamada e 3d de linhagens HEP-2 e L929 / Marcelo de Oliveira Fonseca; orientadora, Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares. - São José dos Campos, SP, 2021.
1 CD-ROM, 71 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências


1. Engenharia Biomédica. 2. Hidrocortisona. 3. Neoplasias. 4. Células Hep G2. I. Pacheco Soares, Orientadora: Profa. Dra. Cristina, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Marcelo de Oliveira Fonseca, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 18 de Novembro de 2021.



Autor(a) da Obra

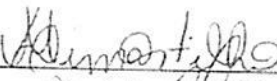
Data da defesa: _____/_____/_____

MARCELO DE OLIVEIRA FONSÊCA

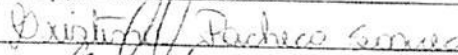
“EFEITOS DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE CORTISOL EM CULTURAS
MONOCAMADA E 3D DE LINHAGEM HEP – 2 E L929.”

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

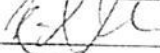
PROF.^a DR.^a MAIARA LIMA CASTILHO



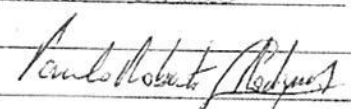
PROF.^a DR.^a CRISTINA PACHECO SOARES



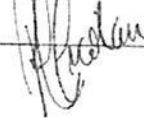
PROF. DR. NEWTON SOARES DA SILVA



PROF. DR. PAULO ROBERTO GRANGEIRO RODRIGUES - Unitau



PROF.^a DR.^a RENATA AMADEI NICOLAU



Prof.^a Dr.^a Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 02 de julho 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a orientação sempre inestimável da Dra. Cristina Pacheco Soares que, de maneira simples e autêntica, sempre me ensinou mais do que apenas ciência. Uma pessoa amável, cuidadosa, e ao mesmo tempo genial.

Agradeço da mesma forma o colega de laboratório Bruno Godoi, pelo companheirismo e auxílio, assim como minha esposa Fernanda Cardoso Fraga Fonseca, sem a qual pouco faria sentido.

Da mesma forma, agradeço a instituição de fomento CAPES pelo financiamento deste estudo e por me possibilitar concluí-lo, pela bolsa PROSUC e à UNIVAP.

Por último, faço desta tese uma homenagem a meus pais, que mesmo sem terem tido a possibilidade de concluir sequer o Ensino Fundamental, batalharam e muitas vezes se humilharam para que eu e meus irmãos pudéssemos ter uma educação de qualidade. Vocês conseguiram.

Efeitos de altas concentrações de cortisol em culturas em monocamada e 3D de linhagens HEP-2 e L929

RESUMO

Ao longo do século XX, o câncer se tornou uma das doenças mais letais entre as enfrentadas pela humanidade, levando anualmente centenas de milhares de pessoas à morte, mesmo com a franca evolução dos tratamentos e dos métodos diagnósticos. Frente a esse panorama, cada vez mais estudos relacionam a doença à influência de fatores emocionais, seja em sua gênese ou em seu prognóstico. O cortisol é descrito como o principal hormônio do estresse no corpo humano. Os corticoides podem aumentar a proliferação celular e as espécies reativas de oxigênio que contribuem para o dano ao DNA, e a exposição prolongada ao estresse pode contribuir para que os tecidos se tornem insensíveis ao cortisol. Este estudo explora a influência do cortisol no desenvolvimento de células tumorais, particularmente em células humanas de carcinoma da laringe humana (HEP-2). Para tanto, as células HEP-2 foram expostas a concentrações crescentes de cortisol (hidrocortisona) por 24 ou 48 horas, e o ensaio de proliferação de citotoxicidade (ensaio de MTT) (ensaio de cristal violeta) e cultura 3D imunomarcada para fibronectina e FAK foram realizados. O grupo tratado com hidrocortisona apresentou aumento significativo da atividade mitocondrial, enquanto o grupo tratado para avaliação pelo cristal violeta apresentou comportamento semelhante ao grupo de controle. O presente estudo concluiu também que a administração de hidrocortisona em esferóides tumorais de linhagem HEP-2 afetou a estabilidade da matriz extracelular, o que sugere uma possível relação entre a substância e uma maior chance de metastização, caso o ambiente tumoral adequado esteja presente, sendo esse seu principal achado. Os resultados apresentados demonstram a influência de corticoides em células tumorais. Concluiu-se que a administração de hidrocortisona em esferóides tumorais de linhagem HEP-2 afeta a estabilidade da matriz extracelular, o que sugere uma possível relação entre a substância e uma maior chance de metastização, caso o ambiente tumoral adequado esteja presente. Embora alguns casos tenham favorecido o uso de corticosteroides em pacientes com câncer, uma análise mais detalhada é necessária antes de prescrevê-los.

Palavras-chave: Cortisol. Stress. Câncer. 3D. HEP-2. L929.

Effect of high concentrations of cortisol in monolayer and 3D cultures of HEP-2 and L929 cells

ABSTRACT

Throughout the 20th century, cancer has become one of the most lethal diseases faced by humanity, annually leading hundreds of thousands of people to death, even with the frank evolution of treatments and diagnostic methods. Faced with this panorama, more and more studies relate the disease to the influence of emotional factors, either in its genesis or in its prognosis. Cortisol is described as the main stress hormone in the human body. Corticosteroids can increase cell proliferation and reactive oxygen species that contribute to DNA damage, and prolonged exposure to stress can contribute to tissues becoming insensitive to cortisol. This study explores the influence of cortisol on tumor cell development, particularly human laryngeal carcinoma (HEp-2) cells. Therefore, HEp-2 cells were exposed to increasing concentrations of cortisol (hydrocortisone) for 24 or 48 hours, and the proliferation cytotoxicity assay (MTT assay) (crystal violet assay) and 3D culture immunolabeled for fibronectin and FAK were done. The group treated with hydrocortisone showed a significant increase in mitochondrial activity, while the group treated for evaluation by crystal violet showed a similar behavior to the control group. The present study also concluded that the administration of hydrocortisone in tumor spheroids of the HEp-2 lineage affected the stability of the extracellular matrix, which suggests a possible relationship between the substance and a greater chance of metastasis, if the appropriate tumor environment is present. this is your main finding. The results presented demonstrate the influence of corticosteroids on tumor cells. It was concluded that the administration of hydrocortisone in tumor spheroids of the HEp-2 cells line affects the stability of the extracellular matrix, which suggests a possible relationship between the substance and a greater chance of metastasis if an adequate tumor environment is present. Although some cases have favored the use of corticosteroids in cancer patients, a more detailed analysis is needed before prescribing them.

Keywords: Cortisol. Stress. Cancer. 3D. HEP-2. L929.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Metabolismo do cortisol	16
Figura 2 – Imagens de microscopia de fluorescência.	38
Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura dos esferoides de células HEP-2 – Tratados (C e D) e não tratados (A e B). A e C aumento 350X e B e D de 1,00K.....	39
Figura 4 – Fotomicrografias de imunomarcção dos esferoides 24h.....	41
Figura 5 – Fotomicrografias de imunomarcção dos esferoides 48h.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Teste MTT linhagem HEp-2.	31
Gráfico 2 – MTT Linhagem L929.....	32
Gráfico 3 – Cristal Violeta HEp-2.....	33
Gráfico 4 – Cristal Violeta L929.....	34
Gráfico 5 – Intensidade de Marcação Imunoquímica para proteína HSP27.....	35
Gráfico 6 – Marcadores DAPI, FAK e Fibronectina incubados em esferoides por 24h.	40
Gráfico 7 – Marcadores DAPI, FAK e Fibronectina incubados em esferoides por 48h.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Soro Albumina Bovina
MTT	Atividade Metabólica Mitocondrial
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
µL	Microlitro
µM	Micromola
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ATP	Adenosina Trifosfato
CTCs	Células tumorais circulantes
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Fator De Crescimento Epidêmico
EMT	Transição Epitélio-Mesenquimal
FAK	Quinase de Adesão Focal
FN	Fibronectina
HEp-2	Carcinoma Epidermoide de Laringe
HMDS	Hexametildisilazano
HSPs	Proteínas de Choque Térmico
L929	Linhagem celular de fibroblasto de camundongo
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase da Matriz
mRNA	Ácido Ribonucleico Mitocondrial
MTT	brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
PBS	Solução Salina tamponada com fosfato
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TNFα	Fator de Necrose Tumoral alfa
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	Revisão de literatura	12
2.1	O câncer e suas principais características.....	12
2.2	O estresse e o estresse psicológico	13
2.3	O estresse e o cortisol	15
2.4	Estresse e alterações celulares	17
2.5	Cultura 3D por levitação magnética	18
2.6	Proteínas de choque térmico e câncer	19
2.7	Proteína quinase de adesão focal (FAK) e fibronectina	21
3	HIPÓTESES	23
4	OBJETIVOS	24
4.1	Objetivo Geral.....	24
4.2	Objetivos Específicos.....	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.1	Culturas de células	25
5.2	Incubação com hidrocortisona	25
5.3	Atividade Metabólica Mitocondrial (ensaio de MTT)	25
5.4	Ensaio de cristal violeta	26
5.5	Cultura 3D.....	26
5.6	Microscopia Eletrônica de Varredura	27
5.7	Imunomarcção	28
5.7.1	Células em Monocamada (2D) Imunomarcadas para HSP-27 e HSP-70	28
5.7.2	Células em Cultura 3D Imunomarcadas para Proteína Quinase de Adesão Focal (FAK) e Fibronectina	29
5.8	Análise Estatística	30
6	RESULTADOS	31
6.1	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL	31
6.1.1	Linhagem HEP-2.....	31
6.1.2	Linhagem L929	32
6.2	Avaliação do crescimento populacional celular	32
6.2.1	Cristal Violeta (Crescimento Celular) - Linhagem HEP-2.....	33
6.2.2	Cristal Violeta - Linhagem L929.....	34
6.3	MARCAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE Proteínas de choque térmico em monocamada, linhagem HEP-2	35
6.4	Microscopia eletrônica de varredura dos Esferoides	38
6.5	Microscopia de fluorescência dos esferoides para DAPI, FAK e Fibronectina. 40	
7	DISCUSSÃO	43
7.1	Atividade mitocondrial.....	43
7.2	Crescimento populacional por meio de cristal violeta	44
7.3	Proteínas de choque térmico	46
7.4	Microscopia eletrônica de varredura em esferoide	48
7.5	Microscopia de fluorescência de esferoide para proteínas de adesão (Fibronectina; FAK e DAPI).....	49
8	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Câncer é a denominação para um conjunto de patologias que envolvem a proliferação anormal das células do organismo, que podem invadir tecidos adjacentes ou mesmo órgãos distantes do seu ponto de desenvolvimento.

Segundo a *Internacional Agency for Research on Cancer* (2021), uma importante característica associada ao câncer se refere a sua gênese multifatorial, o que em outras palavras significa que o desenvolvimento e a proliferação das células doentes podem ser desencadeados por fatores diversos, como ambientais, genéticos ou infecção viral, assim como pela exposição a substâncias químicas descritas como cancerígenas.

Toda a sintomatologia e as características relacionadas ao câncer, tais como sequelas ou recidivas, associam-se às duras e desgastantes formas de tratamento, seja radioterapia, quimioterapia ou cirurgia, causando apreensão ao paciente e a seus familiares (MUTSAERS *et al.*, 2020; CHOI *et al.*, 2019; BROEMER *et al.*, 2021; FRIEDRICH *et al.*, 2007).

Sob essa perspectiva, tanto a sintomatologia relacionada à doença quanto as características relacionadas a suas formas de tratamento (radioterapia, quimioterapia e cirurgia) interferem significativamente na rotina e na qualidade de vida dos pacientes, em muitos casos caracterizando importantes agentes estressores (MUTSAERS *et al.*, 2020).

Dessa forma, faz-se necessária a investigação de aspectos como a colaboração de quadros de estresse no agravamento da doença ou em alterações de seu prognóstico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção serão apresentados alguns fundamentos que embasaram esta pesquisa, tais como as características do câncer, as alterações celulares associadas ao estresse psicológico e sua relação com a manifestação dessa condição, assim como embasamentos teóricos para os procedimentos de cultura realizados.

2.1 O CÂNCER E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

Segundo Carvalho (2002), câncer ou enfermidades oncológicas são denominações utilizadas para descrever um grupo de doenças que se caracterizam pela anormalidade das células e por sua divisão excessiva.

Não se pode determinar uma única causa para o desenvolvimento de um câncer. Acredita-se que, para todos os tipos de câncer, existe uma etiologia multifatorial (HUGUES, 1987 *apud* CARVALHO, 2002).

Na ocorrência da doença, vários fatores têm sido apontados como contribuintes, tais como “a predisposição genética, a exposição a fatores ambientais de risco, o contágio por determinados vírus, o uso do cigarro, a ingestão de substâncias cancerígenas e muitos outros” (TRICHOPOULOS; LI; HUNTER, 1996 *apud* CARVALHO, 2002, p. 155).

Acredita-se na possibilidade de contribuições de fatores psicológicos no desenvolvimento do câncer, dado aos efeitos de estados emocionais na modificação hormonal e desta na alteração do sistema imunológico (BOVBJERG, 1990).

A partir dessas possibilidades, estudos buscam relacionar ou mensurar possíveis influências de aspectos psicológicos e sociais no desenvolvimento e possível agravamento de patologias oncológicas (OGINSKA-BULIK; MICHALSKA, 2020; VAN MONTFORT *et al.*, 2020).

Figueiredo (2005) descreve que o recebimento da confirmação de diagnóstico de câncer é vivenciado pelo paciente como uma situação limite, podendo desencadear alterações significativas em seu estado emocional, causando interferências no tratamento e no processo de restabelecimento e podendo ocasionar, muitas vezes, a aceleração da doença.

Da mesma forma, o diagnóstico de câncer provoca usualmente um efeito devastador, pois culturalmente está associado à ideia de morte.

Nos casos em que há uma terminalidade declarada pelos médicos, o paciente terá que adaptar-se à situação de pouco tempo de vida, levando-o ao “processo de luto” em relação à própria existência, assim como ao desenvolvimento ou à acentuação de sintomas relacionados ao estresse, processo esse descrito por Kübler-Ross (1998) e Van Montfort *et al.* (2020).

Partindo desses estudos, aponta-se a possibilidade de interferência dos fatores psicológicos no desenvolvimento ou no agravamento do câncer, tornando as questões relacionadas aos quadros de estresse e ao estado emocional desses pacientes cada vez mais relevantes, buscando assim contribuir para investigações que objetivem identificar os mecanismos biológicos associados a essas influências.

2.2 O ESTRESSE E O ESTRESSE PSICOLÓGICO

O termo estresse foi empregado pelo fisiologista austríaco Hans Selye, em 1936, para designar uma "síndrome geral de adaptação" (MARTINELLI *et al.*, 2020).

Segundo Straub (2005), a palavra estresse, algumas vezes, é utilizada para descrever uma “situação ou estímulo ameaçador e, em outras, para descrever a resposta a um evento ou situação ameaçadora (síndrome geral de adaptação)” (STRAUB, 2005, p. 116).

Para Straub (2005), a síndrome geral de adaptação é uma resposta do organismo frente a um perigo, que prepara o corpo para fugir ou lutar (reação de luta ou fuga). Esse sistema de resposta emergencial parece muito funcional e adaptativo e, sem dúvida, foi essencial para a sobrevivência de nossos antepassados na época em que os seres humanos enfrentavam inúmeras ameaças físicas, como possíveis ataques de animais selvagens.

Embora atualmente estejamos mais expostos a estressores psicológicos quando comparados a nossos ancestrais, as reações do corpo não mudaram: “ele ainda reage ao estresse de hoje como se estivéssemos enfrentando um impasse com um animal selvagem” (STRAUB, 2005, p. 118). O autor explica que

A reação do corpo ao estresse é constituída por três fases (reação de alarme, fase de adaptação e fase de exaustão). Reação de alarme é essencialmente a mesma que a resposta de “luta ou fuga”. A força da reação de alarme depende do grau em que o evento é percebido como uma ameaça. Quando uma situação estressante persiste, a reação do corpo progride para a fase 2, a fase de adaptação, onde a excitação fisiológica permanece alta, à medida que o corpo tenta adaptar-se a uma emergência,

restabelecendo-se. Uma manifestação desse *déficit* é que as pessoas ficam irritadas, impacientes e cada vez mais vulneráveis a problemas de saúde. Se a situação estressante persistir e a resistência não for mais possível, o corpo entra na fase final, a fase de exaustão. Nesse ponto, as reservas de energia do corpo são exauridas. Se o estresse continuar podem ocorrer doenças e deterioração física, ou até mesmo a morte (STRAUB, 2005, p. 118).

Dessa forma, a resposta ao estresse está relacionada a componentes psicológicos (envolvendo emoções, comportamentos e pensamentos) e fisiológicos (envolvendo sintomas de excitação corporal).

A resposta ao estresse depende, em grande medida, da forma como o indivíduo filtra e processa a informação e sua avaliação sobre as situações ou estímulos a serem considerados como relevantes, agradáveis, aterrorizantes, etc. Essa avaliação determina o modo de responder diante da situação estressora e a forma como o mesmo será afetado pelo estresse. Podemos então distinguir quatro componentes: 1) avaliação inicial automática da situação ou estímulo, também conhecida como reação afetiva, em que o sujeito avalia inicialmente o potencial de ameaça para si. Essa avaliação global afetiva determina um padrão de respostas do tipo defesa ou conferência e orientação. Quando a situação ou estímulo é percebido como ameaçador, então uma resposta de defesa é ativada. Porém, se a avaliação for de não ameaça, a resposta de conferência e orientação é a escolhida, e o sujeito se prepara para recolher mais informações. As respostas de conferência e orientação ou de defesa irão provocar diferentes respostas fisiológicas; 2) avaliação da demanda da situação ou avaliação primária, em que o sujeito avalia a situação estressora, não por seu significado intrínseco, mas de acordo com sua história pessoal e seu aprendizado e experiências prévias. Nessa fase, o relevante é como o sujeito vivencia a situação de estresse; 3) Avaliação das capacidades para lidar com a situação estressora ou avaliação secundária, quando o sujeito avalia a situação em relação às suas capacidades e recursos de enfrentamento para manejá-la, e; 4) organização da ação ou seleção da resposta, a partir das avaliações anteriormente descritas, em que o sujeito elabora suas respostas às demandas percebidas (LABRADOR *et al.*, 1994 *apud* MARGIS *et al.*, 2003, p. 65-74).

As respostas podem ser exclusivas para a situação alvo, ou pode não haver resposta disponível para o indivíduo, que resolverá arriscar uma nova resposta ou tolerar passivamente a situação estressora. “Os recursos comportamentais e fisiológicos a serem mobilizados dependem, em grande medida, dessa escolha” (MARGIS *et al.*, 2003, p. 67).

Nas respostas fisiológicas, o sujeito irá reagir com comportamentos potentes de luta ou fuga. Para isso, fazem-se necessárias “alterações cardiovasculares, constituindo em elevação da pressão arterial, taquicardia, vasoconstrição na pele e nas vísceras e vasodilatação nos músculos estriados, bem como hiperventilação” (RIBEIRO; KAPCZINSK, 2000 *apud* MARGIS *et al.*, 2003, p. 68).

Entre os problemas de saúde relacionados ao estresse (STRAUB, 2005) podemos encontrar patologias e sintomas como bruxismo, sensação de asfixia, erupções na pele, vômitos, cansaço, tremores musculares, hipertensão, batimentos cardíacos rápidos ou irregulares, suores e problemas estomacais, entre outros.

Da mesma maneira, segundo o autor, podemos encontrar alterações psicológicas e comportamentais, como pensamentos ansiosos, dificuldade de memória, raiva, fadiga, incapacidade de relaxar, depressão, redução da concentração, inquietação, problemas para dormir, punhos cerrados, temperamento agressivo, fuga das tarefas, choro, entre outros.

Outro fator importante na análise da relação entre estresse e problemas de saúde seria que, com a mudança no padrão de estresse, observam-se mudanças no padrão dos sintomas. Em outras palavras, a relação é proporcional: “quanto maior a exposição ao estressor, mais intensa a sintomatologia” (RUETER *et al.*, 1999 *apud* MARGIS *et al.*, 2003, p. 71). Essas características dizem respeito, inclusive, ao fato de eventos estressantes interferirem indiretamente no surgimento dos transtornos de ansiedade e depressivos (RUETER *et al.*, 1999 *apud* MARGIS *et al.*, 2003).

2.3 O ESTRESSE E O CORTISOL

Quando se consideram os efeitos neurofisiológicos do estresse, pode-se mencionar como o principal deles a hiperfunção do sistema nervoso simpático e do sistema endócrino, mais particularmente da glândula suprarrenal. Observa-se que o aumento dos níveis de estresse se relacionará com a ativação do sistema endócrino, tendo como resultado a maior liberação de hormônios, como o cortisol, pela glândula supra-renal.

Partindo desse raciocínio, Brandão (1995) relaciona diretamente momentos de distresse (estresse negativo) ao aumento dos níveis de cortisol, como um possível fator fisiológico para quadros de estresse.

Da mesma maneira, estudos demonstram que o cortisol também pode interagir com outros hormônios, como o Glucagon, assim como com a excitação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) por meio da síntese de Epinefrina (E) (COHEN *et al.*, 1997).

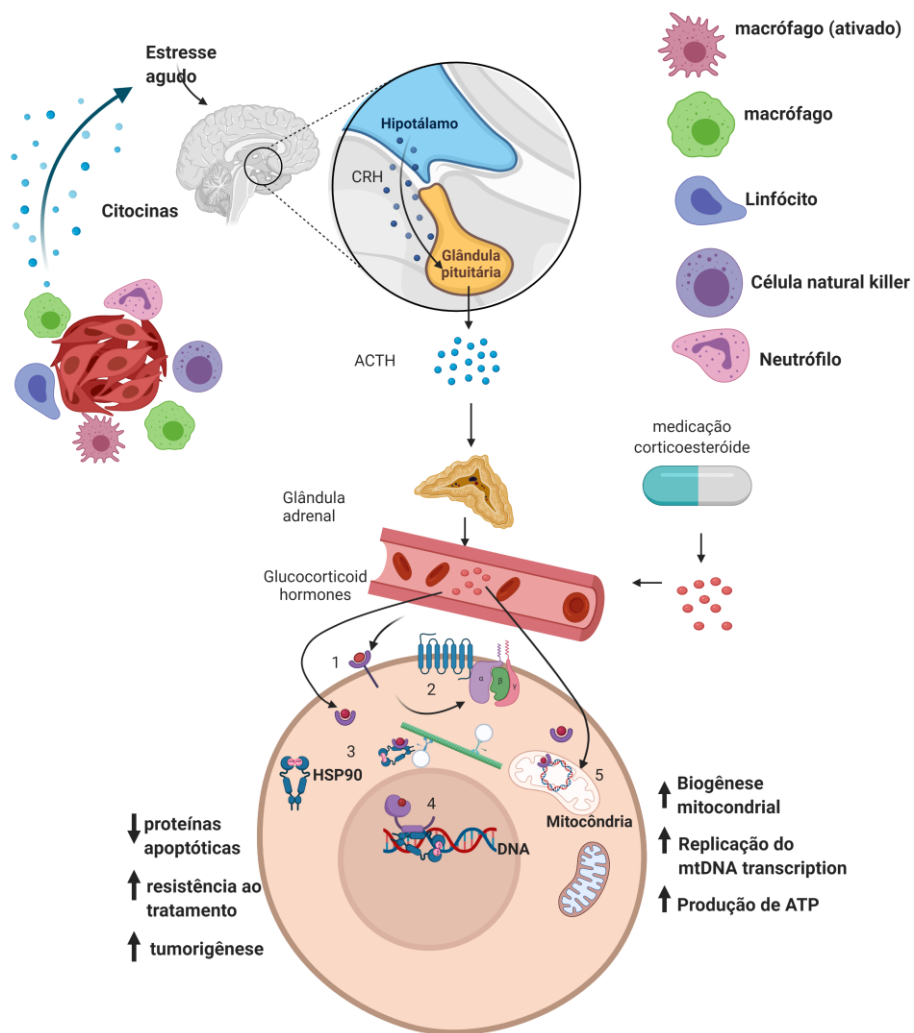
A desregulação dos níveis de cortisol, sintoma associado a quadros de estresse, também tem sido avaliada como contribuinte para fatores relacionados a

morbidade, severidade e mortalidade no processo de doenças, dentre elas inúmeros tipos de enfermidades oncológicas, como a progressão em tumores mamários (MCEWEN, 1998; SEPHTON *et al.*, 2000).

Um importante exemplo dessa ação pode ser observado no trato gastrointestinal, onde o cortisol em excesso pode estimular a secreção gástrica de forma a provocar a ulceração da mucosa gástrica, frequentemente associada ao desenvolvimento de tumores do trato gastrointestinal. (SHELBY; KATHRYN, 2001).

A Figura 1 representa parte da cascata neuroendócrina associada aos efeitos do cortisol, seja esse produzido naturalmente ou administrado via medicamentosa, como no caso da medicação corticosteroide, e de sua interação com inúmeras células imunitárias, como explica Tofoli (2013).

Figura 1: Metabolismo do cortisol



Fonte: Cohen *et al.* (1997). Elaborado pelo autor.

Inúmeros estudos abordam os efeitos do cortisol sobre o sistema imunológico, ora auxiliando em seu funcionamento adequado frente a situações de sobrevivência, ora reduzindo sua resposta e influenciando o desenvolvimento de patologias (SOARES; ALVES, 2006).

É comprovado que essa substância em altas doses apresenta ação imunossupressora, efeito causado pela interrupção da síntese proteica, principalmente das imunoglobinas. Esse efeito se manifestará principalmente na concentração de populações de células periféricas, sendo populações de macrófagos, linfócitos e eosófilos (SOARES; ALVES, 2006).

Estudos de Sapolsky, Romero e Munk (2000) relataram como altas doses de cortisol levam à atrofia do tecido linfóide do timo, do baço e ao surgimento de nódulos linfáticos, assim como ao aumento de apoptose em linfócitos (FUKUZUKA *et al.*, 2000; HOFFMAN-GOETZ; ZAJCHOWSK, 1999), fatores diretamente relacionados à imunossupressão. Quanto à função imune do cortisol, pode-se citar a diminuição de citocinas, que por sua vez inibem a atividade de células como as TH1 e TH2, levando logo à supressão de respostas imunes relacionadas às células T (RABIN, 1999).

Embora esteja relacionado a quadros patológicos, o cortisol também realiza inúmeras funções em nosso organismo em seu estado saudável, dentre as quais podemos citar a manutenção da produção de glucose, bem como a facilitação do metabolismo lipídico. Outras funções incluem ações anti-inflamatórias e de regulação imunológica, renal e muscular (SOARES; ALVES, 2006).

2.4 ESTRESSE E ALTERAÇÕES CELULARES

Segundo estudos de Reiche, Nunes e Morimoto (2004), Sephton *et al.* (2000), Spiegel e Giese-Davis (2003), Price *et al.* (2001) e Lillberg *et al.* (2003), existem hoje comprovações claras de que fatores psicológicos, como quadros depressivos e suporte social, influenciam na progressão tumoral. Dessa maneira, inúmeros estudos relacionaram fatores associados a estresse com biologia tumoral, destacando-se aqueles que abordaram os efeitos dos glicocorticoides e suas relações com a biologia das células tumorais.

Distelhorst (2002) demonstrou a relação entre os glicocorticoides na indução de apoptose de linfócitos. Da mesma forma, Herr *et al.* (2003) e Wu *et al.* (2004)

demonstraram a ativação de genes que protegem células tumorais dos efeitos da quimioterapia *in vivo* e *in vitro* por meio da ação dos glicocorticóides.

Outro fator observado pode ser encontrado nos estudos de Dave *et al.* (2000) e Clevenger *et al.* (2003), que demonstram o aumento de prolactina relacionado ao cortisol e sua consequente ação, promovendo o crescimento e a sobrevivência de tumores de mama.

É possível descrever, pelos estudos de Thaker *et al.* (2006), que quadros de estresse colaboram para o aumento de fatores de angiogênese em células tumorais por aumento de VEGF e, segundo os estudos de Ohm *et al.* (2003) e Gabriolovich *et al.* (1996), também comprometem o desenvolvimento de células T.

Outro ponto importante relacionando alterações dos níveis de cortisol e tumorigênese vem dos estudos de Rich *et al.* (2005), relacionando essas alterações ao aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em pacientes com câncer.

2.5 CULTURA 3D POR LEVITAÇÃO MAGNÉTICA

Nas chamadas culturas em três dimensões, as células podem ser agregadas por diferentes métodos, sendo os mais comuns por magnetismo, por levitação ou por impressão. A técnica escolhida para este estudo foi a de levitação magnética, conhecida como N3D, da empresa norte-americana Greiner. A escolha se fundamentou principalmente devido à técnica apresentar formação rápida dos modelos em 3D e fácil manuseio, associados à imitação do tecido nativo descrito por Friedrich *et al.* (2007).

Na técnica utilizada, as *nanoshuttles* consistem em pequenas esferas de ouro, óxido de ferro e epoli-L-lisina. Essas esferas magnetizam as células da amostra por acoplamento eletrostático às membranas celulares, que ocorreu durante a noite do primeiro dia de incubação. Após a incubação, as células magnetizadas apareceram salpicadas com nanopartículas escuras que ficaram aderidas à amostra, podendo ser observadas em microscopia. Porém, como sugerem os estudos de Souza *et al.* (2010) e Tseng *et al.* (2013), essas partículas são biocompatíveis, não apresentando efeito sobre o metabolismo celular nem proliferação ou inflamação, além de não apresentarem interferências em técnicas como fluorescência e western

blotting, segundo Castro-Chavez *et al.* (2013), Tseng *et al.* (2014) e Daquinag, Souza e Kolonin (2013).

Na cultura em 3D por levitação magnética com esferoides utilizando *nanoshuttles*, as células apresentam um crescimento tridimensional, que propicia a formação de zonas de heterogeneidade celular, e diferenças em gradiente de oxigenação, que refletem o microambiente tumoral *in vivo*, como descrito por Friedrich *et al.* (2007). Segundo Ekert *et al.* (2014), quando comparadas às culturas tumorais em monocamadas, as culturas 3D apresentam padrões de comportamento celular mais próximos aos tumores *in vivo*, o que torna essa técnica uma referência para os estudos de comportamento tumoral.

2.6 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E CÂNCER

Proteínas de choque térmico (HSPs) são um grupo de proteínas que funcionam para manter a homeostase celular em resposta a estressores como hipóxia, anoxia, alta temperatura, drogas e outros agentes químicos que induzem a desnaturação de proteínas. Facilitam o enovelamento das proteínas e mantêm as estruturas das proteínas que regulam o metabolismo celular, essenciais para a sobrevivência e a proliferação celular (ZOU *et al.*, 2014; PERAZELLA, 2003). As células cancerosas, por sua vez, sequestram os papéis protetores das HSPs durante a carcinogênese (GHANE SHAHRBAF; ASSADI, 2015).

As HSPs são classificadas com base nos pesos moleculares. Esta revisão concentrou-se nas HSPs mais estudadas, que são HSP27, HSP40, HSP60, HSP70 e HSP90. HSP27 (HSPB1) é um tipo de HSPs pequena (12–43 kDa), que funciona independentemente do ATP. Induzida por choque térmico, estressores ambientais e fisiopatológicos, a HSP27 forma complexos multiméricos e estabiliza proteínas desnaturadas ou agregadas, devolvendo-as à sua forma original (LIU *et al.*, 2012). Outras funções de HSP27 incluem interferência direta com a via apoptótica e regulação da dinâmica do citoesqueleto (CLEMONS; ANDERSON, 2006; CHOI *et al.*, 2019).

Considerando que sua função primária é promover a homeostase celular sob condições estressantes, a super-expressão de HSP27 está intimamente relacionada a tumorigênese, metástase e invasividade em vários cânceres, como carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, leucemia mieloide aguda pediátrica,

câncer de mama e câncer colorretal (ZHU *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2013; HOMAELI-SHANDIZ *et al.*, 2016; SCHWEIGER *et al.*, 2015).

O aumento da expressão de HSP27 também estimula a migração celular induzida pelo fator de crescimento epidérmico (EGF), a invasão e a atividade da metaloproteinase da matriz (MMP), bem como a expressão de marcadores de transição epitelial para mesenquimal (EMT) via ativação ou super-expressão de AKT, GSK3 β , e β -catenina (CORDONNIER *et al.*, 2015).

Além disso, a modulação do influxo de cálcio intracelular mediada por HSP27 aumenta a proliferação, a migração e a invasão de células cancerígenas colorretais (HUANG *et al.*, 2018).

Codificada por genes HSPA, a HSP70 consiste em 13 membros que desempenham papéis essenciais no enovelamento de proteínas, homeostase de proteínas e promoção da sobrevivência celular sob vários estresses (MURPHY, 2013).

Em células cancerosas, a HSP70 funciona para induzir sinais mitóticos e suprimir apoptose, bem como senescência induzida por oncogene (SHERMAN, 2010). A expressão aumentada de HSP70 foi indicada como um marcador de mau prognóstico para uma variedade de cânceres, incluindo câncer de mama, pulmão, ovário, colorretal, pancreático e glioblastoma (MURPHY, 2013; SHERMAN; GABAI, 2015; GRAF *et al.*, 2018; GUPTA *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2017; CHOI *et al.*, 2019).

Em relação ao grupo HSP70, cinco membros foram especialmente bem examinados em associação com câncer, que são os HSP70s induzíveis por estresse: HSP72 (HSPA1) e HSP70B (HSPA6) e HSP70s expressos constitutivamente, HSC70 (HSPA8), GRP75 / Mortalin (HSPA9), e GRP78 (HSPA5) (KAMPINGA *et al.*, 2009; ARISPE; MAIO, 2000).

Em células cancerosas super-expressas de HSP70, a HSP70 pode translocar-se para a membrana plasmática ou pode ser liberada extracelularmente, mediando as respostas imunes antitumorais (JEGO *et al.*, 2013).

Embora a função da HSP70 extracelular em relação à carcinogênese seja amplamente desconhecida, a forma extracelular pode oferecer uma vantagem adicional às células cancerosas, estimulando o sistema imunológico a remover as células indesejadas da circulação (MERCHANT; KORBELIK, 2011).

Curiosamente, a HSP70 extracelular forma o complexo de ativação com várias co-chaperonas, incluindo HSP90 α , Hop e HSP40, que juntas promovem a

migração e a invasão das células do câncer de mama por meio da atividade aumentada de MMP2 (NOORDHUIS *et al.*, 2004). A HSP70 também pode estar localizada na membrana endolisossômica de células cancerosas e serve para resistir à morte celular induzida por catepsina lisossomal (GYRD-HANSEN; NYLANDSTED; JAATTELA, 2004).

2.7 PROTEÍNA QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK) E FIBRONECTINA

Os tecidos são compostos por células ancoradas em uma matriz extracelular (MEC), formando uma rede proteica que mantém unidas as células vizinhas e facilita a comunicação célula a célula. Como um elemento estrutural, a MEC ajuda a orientar a polaridade das células e a fixá-las.

As interações das células com o ambiente extracelular regulam muitas funções celulares básicas, incluindo diferenciação, migração, crescimento celular e morte celular programada (apoptose). Muitos desses sinais da MEC, incluindo aqueles necessários para a sobrevivência celular, são retransmitidos para a maquinaria de sinalização intracelular por integrinas, receptores transmembrana heterodiméricos com especificidade de sobreposição para componentes ECM (DAMSKY; WERB, 1992; HYNES, 1992; HOWLETT *et al.*, 1995; MEREDITH; FAZELI; SCHWARTZ, 1993; GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999).

Entre os elementos envolvidos na adesão celular, podemos citar duas proteínas relacionadas com o estresse e o câncer: a proteínas quinase A ou de adesão focal (FAK) e a fibronectina.

A quinase de adesão focal (FAK) é uma tirosina quinase não receptora e uma proteína adaptadora, que regula principalmente a sinalização de adesão e a migração celular. No entanto, a FAK também pode promover a sobrevivência celular em resposta ao estresse. A FAK é comumente superexpressa em câncer e é considerada um alvo de alto valor para drogas. De acordo com Dawson *et al.* (2021), no cenário clínico o direcionamento de FAK será mais eficaz em combinação com outros agentes, de modo a reverter à falha de quimioterapias ou de terapias direcionadas, aumentando a eficácia de tratamentos imunológicos de tumores sólidos (DAWSON *et al.*, 2021).

Resumidamente, o envolvimento de receptores de integrina transmembrana com matriz extracelular (ECM) recruta FAK para locais onde as integrinas se agrupam, constituindo as denominadas 'adesões focais'.

A fibronectina (FN) desempenha um papel importante na patobiologia do câncer. Numerosos estudos forneceram possibilidades de direcionar a FN para a luta contra o câncer (ABDEL-GHANY *et al.*, 1998; CHANG *et al.*, 2012; BERNDORFF *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2017; MOSCHETTA *et al.*, 2012; CHENG; ABDEL-GHANY; PAULI, 2003).

O envolvimento da FN no câncer advém do acúmulo de evidências referentes à expressão de FN cancerígena, contribuindo de forma crítica para a malignidade do tumor, a metástase e o mau prognóstico dos pacientes, uma vez que estudos afirmam controversamente que a FN atua como um ligante ao endotélio em células tumorais sanguíneas para mediar e promover a colonização pulmonar e a metástase (ABDEL-GHANY *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 1999; CLARK *et al.*, 2000).

Vários autores também empregaram abordagens genéticas ou proteômicas para demonstrar que a expressão de FN em vários tipos de células tumorais está de fato experimental e clinicamente associada à malignidade tumoral, à metástase ou ao mau prognóstico (CHENG *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2009; REUTER *et al.*, 2009; STEFFENS *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2017; FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2014; KENNY *et al.*, 2014; NIKNAMI *et al.*, 2017).

Níveis mais elevados de expressão de FN no plasma, soro ou urina podem ser detectados em estágios finais e em pacientes com carcinoma de células renais metastático ou câncer colorretal, e podem servir clinicamente como excelentes biomarcadores de prognóstico não invasivos (HEGELE *et al.*, 2004; SAITO; NISHIMURA; KAMEOKA, 2008). Em linha com esse papel de promoção metastática, a FN é altamente expressa nas células tronco cancerígenas CTCs pancreáticas, que possuem um alto potencial metastático potencializado pela sinalização WNT (YU *et al.*, 2012).

3 HIPÓTESES

- A administração de cortisol causará um aumento do crescimento tumoral em células cancerosas.

- Dosagens mais altas de cortisol, administradas em células cancerosas, terão ação inibitória do crescimento, podendo exercer certo grau de letalidade.

- Tumores de linhagem HEp-2, inoculados com cortisol, avaliados em cultura 3D, apresentarão menor matriz celular e menor integridade.

4 OBJETIVOS

Nesta seção são descritos os objetivos: geral e específicos que nortearam esta pesquisa, gerados a partir do problema que se pretendeu investigar, a fim de corroborar ou não as hipóteses apresentadas.

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar possíveis influências da administração de diferentes níveis de cortisol no desenvolvimento de culturas de célula de carcinoma de laringe em cultura monocamada e 3D.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar as influências do cortisol (hidrocortisona), em diferentes dosagens, na proliferação celular, em períodos de 24 e 48 horas.
- Investigar possíveis diferenças no comportamento frente ao cortisol das linhagens de células HEp-2 e L929, buscando explicar possíveis alterações entre o comportamento em linhagens tumorais e saudáveis.
- Investigar os efeitos da incubação com cortisol em linhagens HEp-2 em modelo de cultura 3D.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são descritos e detalhados os materiais e métodos empregados nos procedimentos de investigação, relacionados à cultura, à incubação e à atividade metabólica das células estudadas, assim como sua análise estatística, com o fim de alcançar os objetivos propostos.

5.1 CULTURAS DE CÉLULAS

Células L929 (linhagem celular de fibroblasto de camundongo, provenientes do banco de células do Rio de Janeiro sob registro BCRJ 018), usadas como padrão para avaliação de citotoxicidade e HEP-2 (carcinoma epidermoide de laringe, provenientes do banco de células do Rio de Janeiro sob registro ATCC – CCL-23), foram cultivadas garrafas de cultura NUNC 25 cm² com meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico e antimicótico (Life Technologies), a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

5.2 INCUBAÇÃO COM HIDROCORTISONA

As células HEP-2 e L929 foram plaqueadas (1×10^5 células/mL) em microplacas de 24 poços, com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) para adesão celular, incubadas a uma temperatura de 37°C e atmosfera 5% CO₂, durante a noite. No dia seguinte, as células foram submetidas a tratamento com hidrocortisona 500 mg (nome comercial Androcortil, fabricante Teuto, Lote: 2596897), diluída em PBS, por períodos de 24 e 48 horas nas seguintes concentrações: 0,5 µM, 1,0 µM, 1,5 µM, 2 µM e 2,5 µM (ABDANIPOUR *et al.*, 2015; FONSECA *et al.*, 2019).

5.3 ATIVIDADE METABÓLICA MITOCONDRIAL (ENSAIO DE MTT)

Células HEP-2 e L929, submetidas ao tratamento com hidrocortisona nos períodos de 24 e 48 horas foram lavadas com PBS três vezes incubadas com MTT (0,5 mg / ml) por 1 hora a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Sobre os precipitados de formazana, o solvente orgânico DMSO (50 µL) foi adicionado a cada poço. A

placa é mantida sob agitação durante 10 minutos para solubilizar os cristais de formazana e a leitura da absorbância realizada em 570nm em espectrofotômetro Packard SpectraCount de 570 nm. Os dados obtidos foram plotados em gráfico pelo programa GraphPad 6.0.

Neste ensaio também foram utilizados dois grupos não tratados com hidrocortisona, o grupo intitulado controle (não tratado), em que as células tiveram seu processo de crescimento sem a administração de nenhuma dose de hidrocortisona, e o grupo intitulado morte celular, sendo essa induzida pela administração de solução de peróxido de hidrogênio a 10%.

5.4 ENSAIO DE CRISTAL VIOLETA

A coloração com cristal violeta é utilizada para inferir a densidade populacional, em um teste clonogênico. O método é descrito como colorimétrico para a determinação de células adequadas, conforme definido por Fernandes *et al.* (2010).

O cristal violeta, substância usada para o teste, atravessa células e membranas nucleares, ligando-se a DNA, RNA e proteínas e identificando células viáveis. Em seu contorno, a quantificação espectrofotométrica de células aderentes identifica indiretamente o número de células viáveis utilizadas neste estudo para medir a variação da população de linhagens celulares.

O HEp-2, submetido ao tratamento com cortisol nos horários citados, teve o meio de cultura retirado em seguida e incubado com 100 µL de cristal violeta por 3 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada duas vezes em água de torneira por imersão e incubada por 1 hora com 100 µL de DMSO. A leitura da absorbância realizada em 570nm em espectrofotômetro Packard SpectraCount de 570 nm.

5.5 CULTURA 3D

As culturas foram realizadas com o kit Bio-Assembler™ desenvolvido para placas de 24 poços (n3D Biosciences Inc., Houston, TX, EUA) (SOUZA-ARAÚJO *et al.*, 2020). Foram utilizadas NanoShuttles™ para incubação e placas de 24 poços, em uma proporção de 1 µL de NanoShuttles™ por 20.000 células incubadas a 37° C

e 5% de CO₂, por 18 horas. As células foram, a seguir, incubadas com 5 mL de tripsina por 5 min e lavadas por centrifugação (600 g / 5 min) com solução salina tamponada com fosfato (PBS). A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão de azul de Tripán (1% p / v em PBS), e a densidade de células foi ajustada para 10⁶ células / mL em meio DMEM, suplementado com 5% de soro fetal bovino.

As células HEp-2 conjugadas com NanoShuttles™ foram semeadas em uma placa *ultralow-attach* de 24 poços (ULA, Cellstar® Greiner Bio-one, Kremsmünster, Áustria) em 10⁵ células e um volume final de 400 µL /poço.

A cultura 3D foi obtida incubando-se as placas sob o campo magnético a 37°C e 5% de CO₂, utilizando-se inicialmente uma unidade de bioimpressão por três horas e, em seguida, a unidade de levitação durante todo o período de cultura. Esse procedimento permite o crescimento do esferoide celular. A placa de cultura 3D foi reabastecida com meio frasco a cada dois dias, até o uso do esferoide.

5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após 24 horas do tratamento com hidrocortisona, os esferoides foram fixados com uma solução de paraformaldeído a 4 % em PBS durante 60 minutos, para avaliação. A seguir, as células foram lavadas duas vezes com PBS para a remoção da solução fixadora e foi realizada a desidratação das amostras com incubação crescente de acetona a 30%, 50%, 75%, 90% e 100%, com tempo de exposição de 20 minutos para cada concentração.

Para a finalização da desidratação utilizou-se uma solução de acetona + HMDS (Hexametildisilazano – Sigma-Aldrich®) na proporção 1:1 por 30 minutos, e em seguida foi utilizado HMDS 100 % por mais 30 minutos, estando assim as amostras prontas para a metalização.

Posteriormente a toda a preparação para a Microscopia Eletrônica de Varredura, as amostras foram metalizadas com ouro no equipamento EMITECH K550X. A seguir, foi possível obter as imagens por microscopia eletrônica de varredura (EVO MA10) no Laboratório Multiusuário, localizado no IP&D (Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento) da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, *campus Urbanova*.

5.7 IMUNOMARCAÇÃO

Para a imunomarcação, as células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células por poço, em placas de 24 poços (NUNC), contendo lamínula redonda estéril em cada poço. Essas células permaneceram incubadas com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e antimicótico, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, 18 horas de incubação. Dois grupos foram utilizados, um grupo de controle (sem incubação) e um grupo incubado com 2,5 µM de hidrocortisona, nos períodos de 24 e 48 horas.

Para os cálculos da intensidade de fluorescência, foi utilizada a fórmula abaixo, de acordo com o protocolo do programa ImageJ e a fórmula para calcular a fluorescência celular total corrigida (CTCF).

Measuring cell fluorescence using ImageJ — The Open Lab Book v1.0 (theolb.readthedocs.io)

CTCF = Densidade Integrada (Área da célula selecionada x média da fluorescência de fundo).

O processo descrito conferiu os valores apontados nos Gráficos 5, 5A, 5B, Gráfico 6 e Gráfico 7, como Intensidade de fluorescência (AU), que representam unidades arbitrárias.

As imagens foram capturadas com o auxílio do microscópio de fluorescência Leica DMLB com sistema de captura de imagem Leica DFC 310 FX acoplada, localizado no IP&D (Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento) na UniVap, *campus* Urbanova, em São José dos Campos.

5.7.1 Células em Monocamada (2D) Imunomarcadas para HSP-27 e HSP-70

Logo após os períodos acima citados, foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-HSP27 (produzido em coelho, da Sigma-Aldrich®) e anti-HSP 70 (produzido em camundongo, da Invitrogen®), na diluição 1:1000. As células foram incubadas em temperatura ambiente por 1 hora com cada um dos anticorpos.

Ao término do período de incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas com PBS + soro albumina bovina (BSA) e incubadas com anticorpos secundários, anticoelho (FITIC) e anticamundongo (TRICT), na diluição 1:1000, por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Foram capturadas e utilizadas 16 imagens, divididas em grupos controle (24 e 48 horas) e tratados (24 e 48 horas) para DAPI, HSP27 e HSP70, acrescidas de 4 imagens de *overlay*. A captura das imagens foi realizada com o auxílio do microscópio de fluorescência Leica DMLB com sistema de captura de imagem e Leica DFC 310 FX acoplada, localizados no IP&D (Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento) na Univap, *campus* Urbanova em São José dos Campos.

Para os cálculos da intensidade de fluorescência foi utilizada a fórmula abaixo, de acordo com o protocolo do programa ImageJ.

Measuring cell fluorescence using ImageJ — The Open Lab Book v1.0 (theolb.readthedocs.io)

Fórmula para calcular a fluorescência celular total corrigida (CTCF).

CTCF = Densidade Integrada (Área da célula selecionada x média da fluorescência de fundo).

O processo descrito conferiu os valores apontados nos gráficos 5, 5A, 5B, Gráfico 6 e Gráfico 7, como Intensidade de fluorescência (AU), que representam unidades arbitrárias.

5.7.2 Células em Cultura 3D Imunomarcadas para Proteína Quinase de Adesão Focal (FAK) e Fibronectina

Após sete dias de cultura, os esferoides de células HEp-2 foram divididos em quatro grupos: (i) um grupo de controle, apenas com células e (ii) um grupo de tratamento, no qual as células foram incubadas com hidrocortisona (2,5 µM) por 24 e 48 horas em 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, os esferoides foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos, em temperatura ambiente.

As células foram então permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 em PBS por 10 minutos e então bloqueadas com 1% de BSA em PBS por 30 minutos. Posteriormente, os esferoides foram incubados com anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo contra anticorpo de fibronectina (1: 500 / 1h) e anticorpo monoclonal anti-humano de coelho contra FAK (1: 500 / 1h), e a seguir incubados com anticorpo secundário policlonal anticamundongo conjugado com FITC e o anticorpo secundário policlonal de cabra anticoelho conjugado com TRITC (todos os

anticorpos da Sigma Aldrich® Co). Os núcleos foram marcados com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol).

Quanto às imagens, essas foram capturadas com o auxílio do microscópio de fluorescência Leica DMLB com sistema de captura de imagem Leica DFC 310 FX acoplada, localizado no IP&D (Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento) na Univap, *campus* Urbanova em São José dos Campos. Foram capturadas 6 imagens (controle + tratado para DAPI, Fibronectina e FAK) para o período de 24 horas e outras 6 para o período de 48 horas

Para mensuração da intensidade de fluorescência foi utilizada a fórmula abaixo, de acordo com o protocolo do programa Image J.

Measuring cell fluorescence using ImageJ — The Open Lab Book v1.0 (theolb.readthedocs.io)

Fórmula para calcular a fluorescência celular total corrigida (CTCF).

CTCF = Densidade Integrada (Área da célula selecionada x média da fluorescência de fundo).

O processo descrito conferiu os valores apontados nos gráficos 5, 5A, 5B, Gráfico 6 e Gráfico 7, como Intensidade de fluorescência (AU), que representam unidades arbitrárias.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software GraphPad Prisma 6® foi usado para realizar análises estatísticas e gráficos. Os dados estão na forma de média e desvio padrão, comparados pelo teste ANOVA *two-way*, normalizados e analisados pelo teste de Dunnett's para os de MTT e Cristal Violeta e teste de Tukey para os experimentos de fluorescência. Os experimentos foram realizados em três repetições independentes com $n = 8$.

6 RESULTADOS

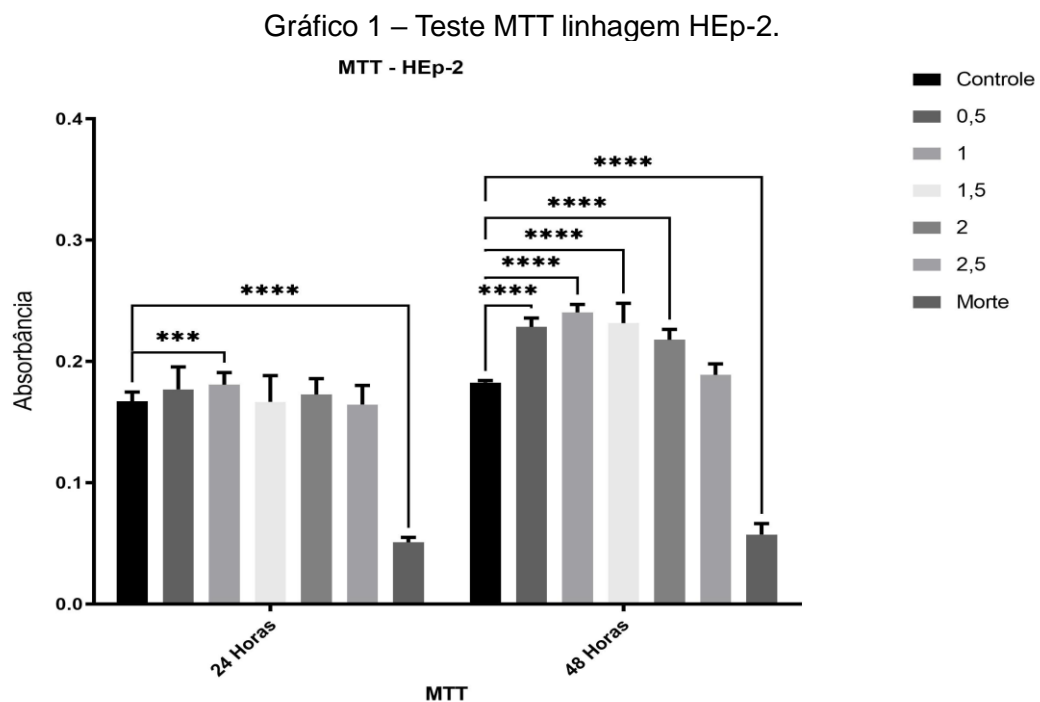
Nesta seção são apresentados, comentados e detalhados os resultados referentes aos procedimentos a que foram submetidas as células objeto de estudo, apresentados na seção anterior.

6.1 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL

A avaliação mitocondrial por MTT teve como objetivo mensurar possíveis influências da incubação com hidrocortisona, nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 μM , em cultura de células HEp-2 e L929, relacionando os possíveis achados aos resultados de densidade populacional então analisados.

6.1.1 Linhagem HEp-2

O Gráfico 1 revela os resultados da atividade mitocondrial da linhagem tumoral HEp-2 à incubação por período de 24 e 48 horas com hidrocortisona. São observadas 5 dosagens distintas da droga (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 μM), acrescidas de 2 grupos de controle, do grupo não tratado e do grupo de morte celular.

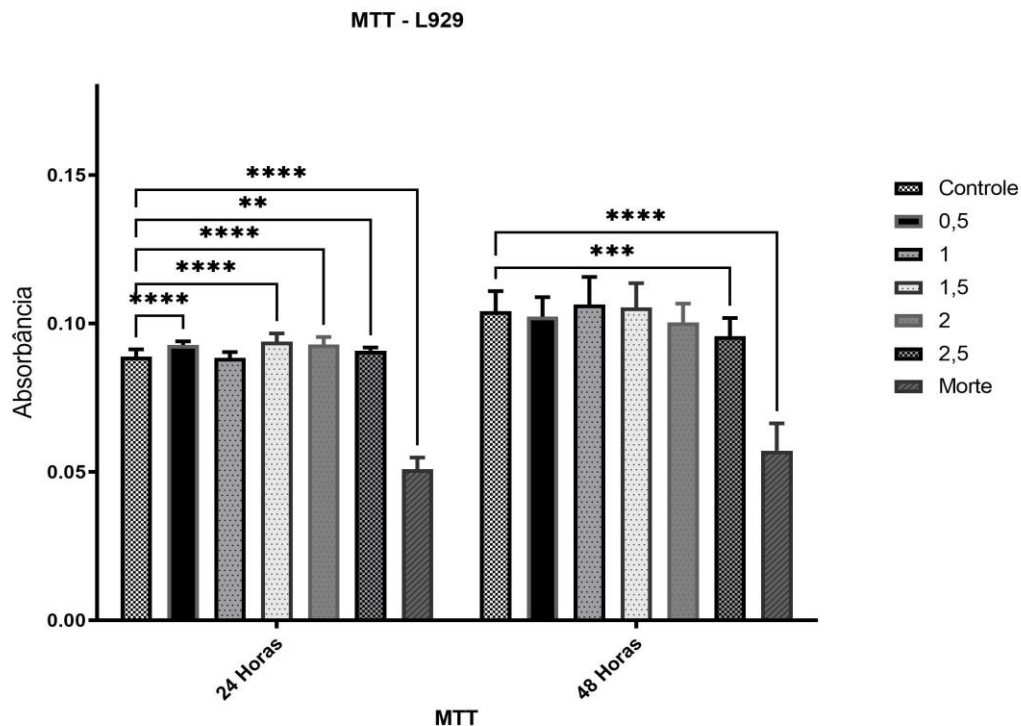


O Gráfico 1 representa a atividade mitocondrial da linhagem HEP-2, por meio do método MTT. Nele, novamente observamos a divisão dos grupos por dosagens de hidrocortisona, assim como por duração de incubação, ambas anteriormente descritas.

6.1.2 Linhagem L929

O Gráfico 2 revela os resultados da atividade mitocondrial da linhagem saudável L929 à incubação por período de 24 e 48 horas com hidrocortisona. São observadas 5 dosagens distintas da droga (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 μM), acrescidas de 2 grupos de controle, do grupo não tratado e do grupo de morte celular.

Gráfico 2 – MTT Linhagem L929.



Valores estatísticos de P foram de ** $P < 0,0027$; *** $P < 0,0005$ e **** $P < 0,0001$.

Fonte: elaborado pelo autor.

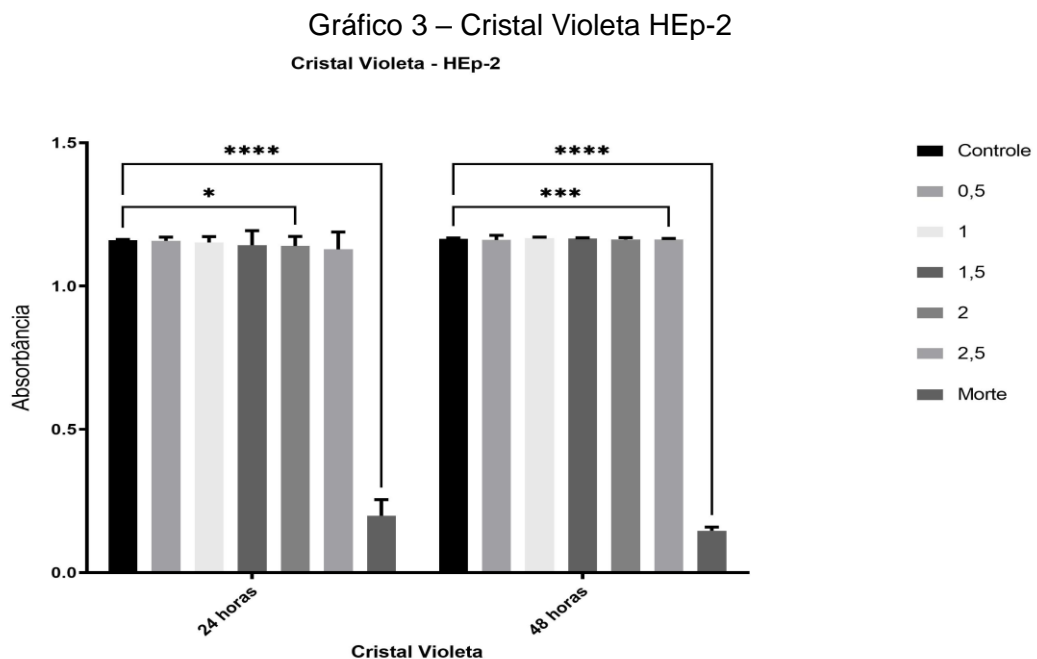
6.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO POPULACIONAL CELULAR

De forma geral, os dados encontrados demonstraram claramente uma interferência distinta entre as linhagens quanto à administração de hidrocortisona e a proliferação celular. Enquanto a linhagem tumoral HEP-2 não apresentou redução

populacional, a linhagem saudável apresentou ora redução, ora aumento populacional, como demonstrado nos gráficos seguintes.

6.2.1 Cristal Violeta (Crescimento Celular) - Linhagem HEp-2

O Gráfico 3 apresenta a dispersão populacional de crescimento da linhagem tumoral HEp-2 sob efeito das concentrações de 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 μM , acrescida do grupo de controle, sem qualquer indução, e do grupo de morte celular, induzida por peróxido de hidrogênio a 3%. A incubação por hidrocortisona também foi dividida em dois períodos distintos, sendo incubação por 24 horas e por 48 horas.



Valores estatísticos de P foram de * $P < 0,0219$; *** $P < 0,0006$ e **** $P < 0,0001$.

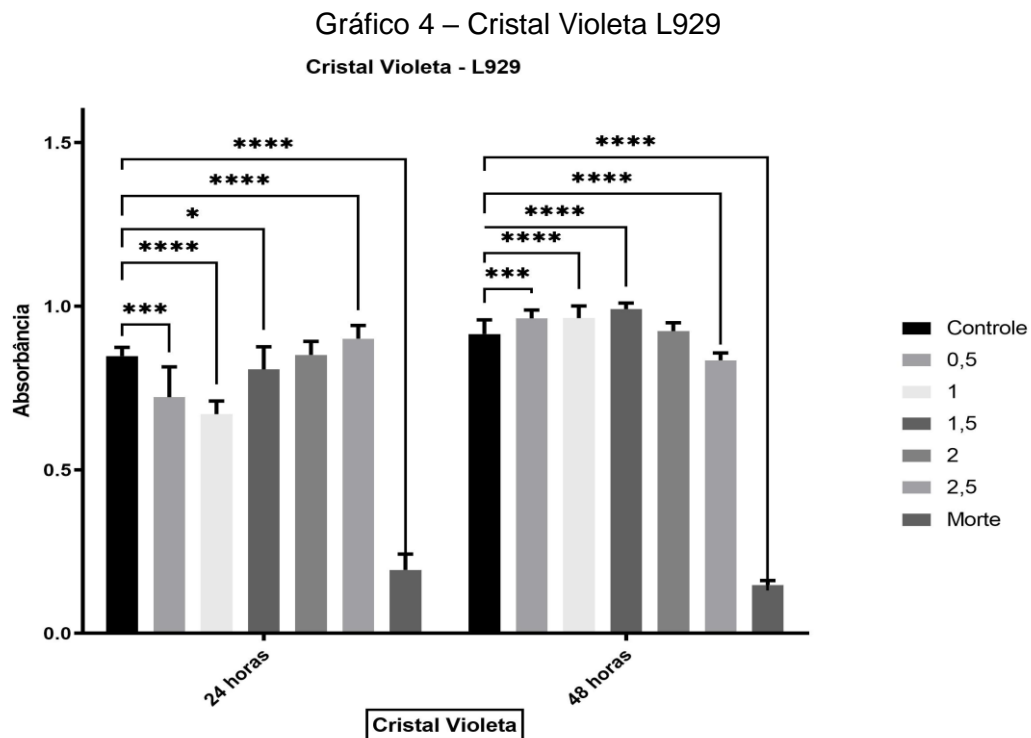
Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados descritos pelo Gráfico 3 revelam que, mesmo sob exposição a diferentes dosagens de hidrocortisona em dois períodos distintos, as linhagens não sofreram redução populacional, com exceção do grupo incubado a 2,0 μM por período de 24 horas, no qual se observou leve redução populacional (* $P < 0,0219$). Embora relevante, como o cálculo estatístico sugere, a pequena redução populacional poderia ser explicada por alguma variável externa não identificada, uma vez que ocorreu somente neste grupo, não apresentando correlação com os outros dados da mesma placa.

Quando comparados ao grupo de controle, não são observadas alterações significativas na proliferação celular no período de 24 horas. Entretanto, na comparação entre as concentrações, observa-se alteração significativa, de 0.5 μM para 2.5 μM ($p > 0.005$). A avaliação do período de 48 horas em comparação ao controle não apresenta alteração significativa.

6.2.2 Cristal Violeta - Linhagem L929

O Gráfico 4 descreve os achados quanto à população celular por meio de teste de cristal violeta, de linhagem L929, fibroblasto de tecido conjuntivo de camundongo.



Valores estatísticos de P foram de * $P < 0,004$; *** $P < 0,0003$; **** $P < 0,0001$ (para 24 horas) e **** $P < 0,0001$ e *** $P < 0,0006$ (para 48 horas).

Fonte: elaborado pelo autor.

Observam-se resultados dispersos por dosagem de cortisol utilizado para incubação, nas dosagens 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 μM de hidrocortisona, divididos em dois períodos de incubação, 24 e 48 horas, acrescidos de grupo de controle e de grupo de morte celular.

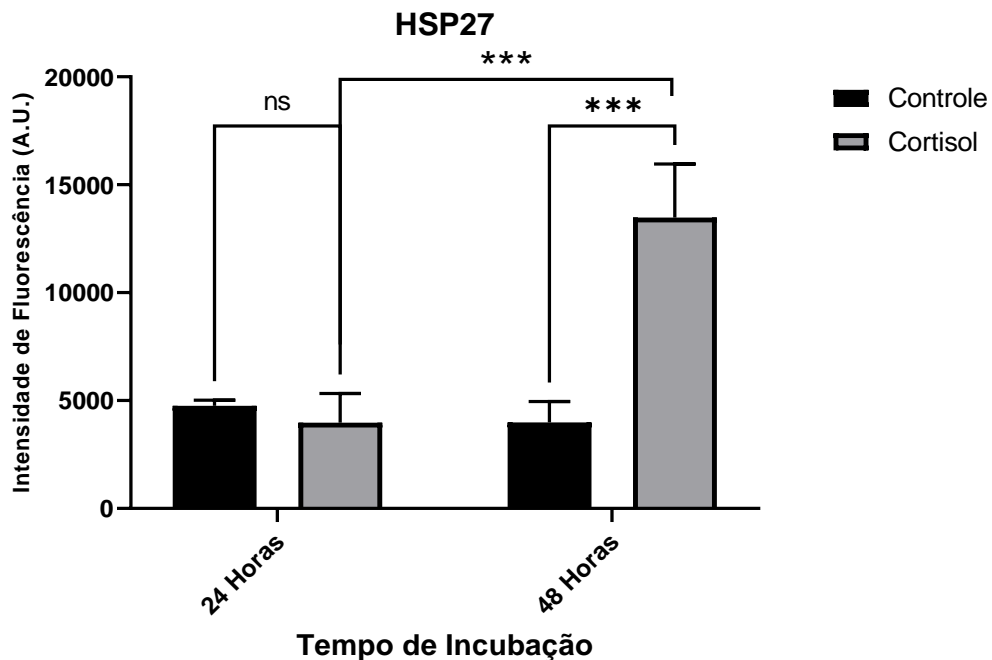
Observa-se redução populacional no período de 24 horas nas concentrações tratadas com 0,5; 1,0 e 1,5 μM , e aumento das populações em dosagens 2,0 e 2,5

μM , ainda em 24 horas. Já quanto ao período de 48 horas de incubação, observa-se redução de viabilidade somente na dosagem $2,5 \mu\text{M}$, enquanto em todas as outras observa-se leve aumento populacional, comparadas ao grupo de controle. Esses dados sugerem uma variação do efeito quanto à viabilidade celular dependente do tempo de exposição, assim como uma associação à dose dependente.

6.3 MARCAÇÃO IMUNOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EM MONOCAMADA, LINHAGEM HEP-2

Os Gráficos 5, 5A e 5B apresentam as marcações de fluorescência em cultura monocamada das proteínas de choque térmico HSP27, HSP 70 e DAPI em células HEP-2 incubadas com hidrocortisona ($2,5\mu\text{M}$), por período de 24 e 48 horas, respectivamente.

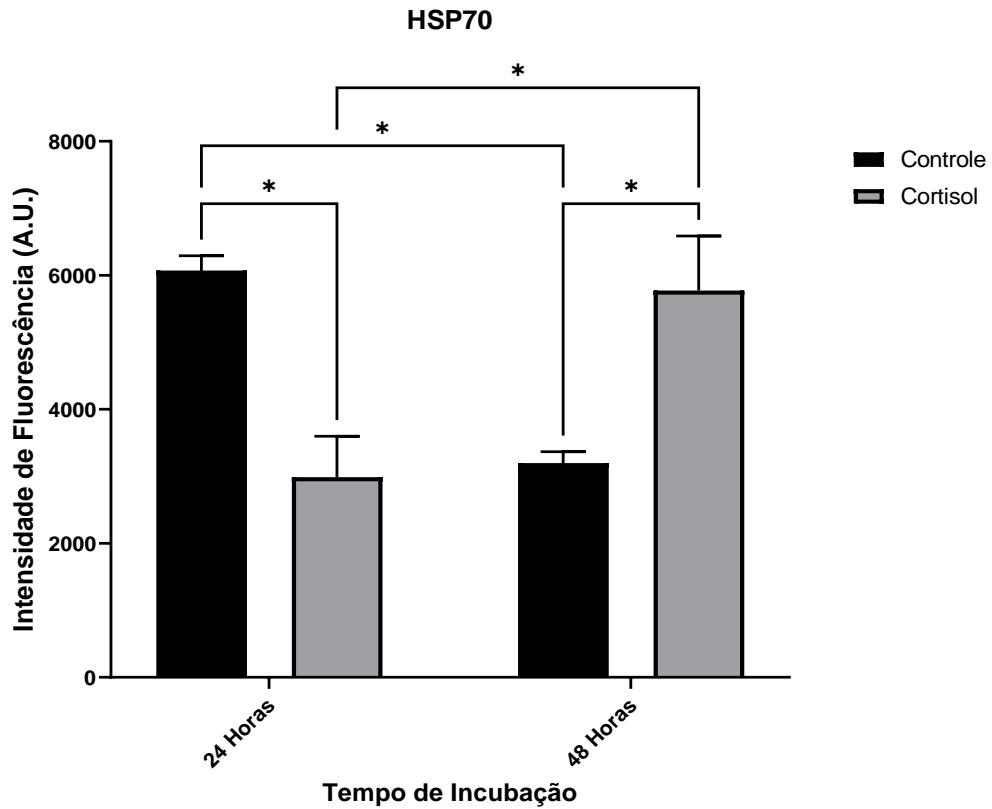
Gráfico 5 – Intensidade de Marcação Imunoquímica para proteína HSP27.



P * P<0,0005**

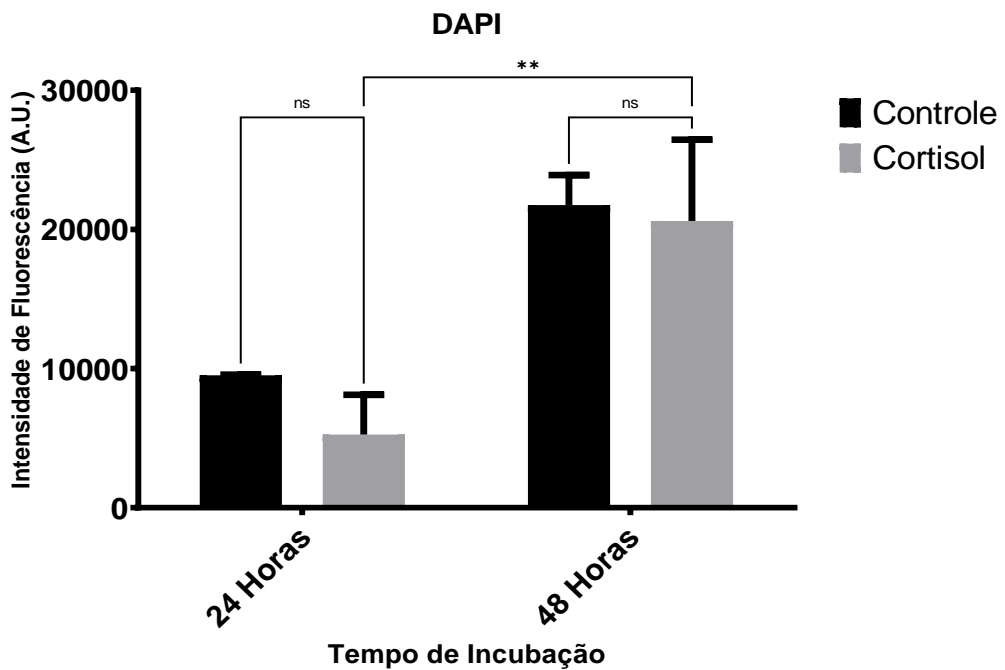
Fonte: elaborado pelo autor.

Gráfico 5A – Intensidade de Marcação Imunoquímica para proteína HSP 70.



Valor estatísticos de P * P<0,01
Fonte: elaborado pelo autor.

Gráfico 5B – Intensidade de Marcação Imunoquímica para DAPI.



Valor estatístico de P foi ** P<0,001.

Fonte: elaborado pelo autor.

Os Gráficos 5, 5A e 5B revelam os resultados da marcação de imunofluorescência para as proteínas de choque térmico HSP27 e HSP70 e para DAPI, por período de 24 e 48 horas de incubação, comparando grupos de controle e grupos tratados com hidrocortisona.

Vale ressaltar que os valores foram representados por unidades arbitrárias de coloração descritas em metodologia, que têm unicamente por objetivo quantificar a expressão das cores de cada marcador encontrados nas imagens de microscopia, processo descrito em métodos.

Como demonstrado nos Gráficos 5 e 5A e na Figura 2, a incubação com hidrocortisona apresentou resultados distintos sobre as chamadas proteínas de choque térmico, variando de acordo com a duração do período.

No período de 24 horas, pode-se notar redução dos marcadores de DAPI (Gráfico 5B) comparando-se os grupos tratado e de controle. Porém, por meio da análise estatística não foi possível encontrar significância.

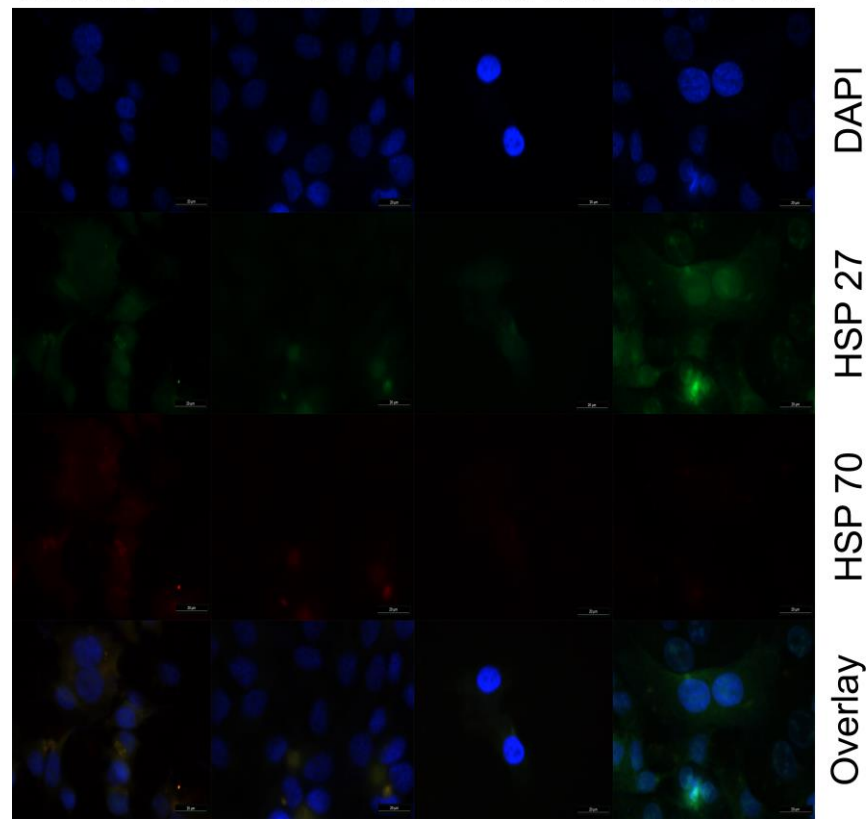
Quanto às marcações da proteína HSP27 (Gráfico 5), no período de 24 horas não se observaram alterações significativas de sua marcação, comparando os grupos tratado e de controle.

Por último, observa-se que os resultados relativos às marcações da proteína HSP 70 (Gráfico 5A), ainda em período de 24 horas de incubação, mostraram redução significativa desses marcadores (* $P < 0,01$), se comparados ao grupo de controle.

No que se refere ao período de 48 horas, pode-se notar que não houve alterações significativas em DAPI (Gráfico 5B); porém, observa-se significativo aumento, *** $P < 0,0005$ em valores estatísticos, em HSP27 (Gráfico 5) e leve aumento em HSP 70, * $P < 0,01$ em valores estatísticos (Gráfico 5A). Esses resultados são opostos aos encontrados em 24 horas, o que sugere novamente uma relação dependente do tempo de incubação, uma vez que só foi utilizada uma concentração de hidrocortisona.

Na Figura 2, podem ser observadas as imagens que deram origem aos gráficos acima discutidos.

Figura 2 – Imagens de microscopia de fluorescência.
 Controle-24H Controle-48H Cortisol-24H Cortisol-48H



Fonte: elaborado pelo autor.

6.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS ESFEROIDES

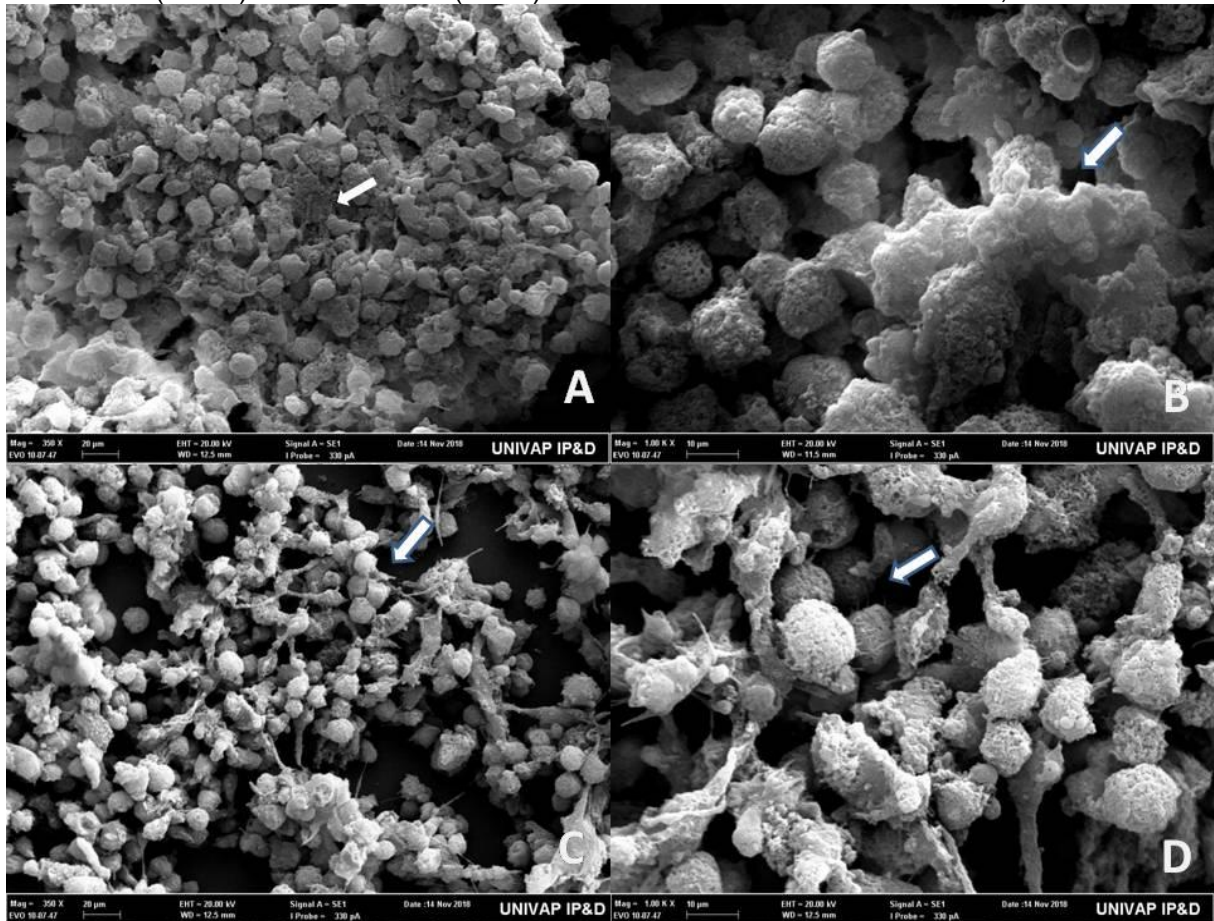
As imagens da Figura 3, a seguir, revelam os resultados da microscopia eletrônica de varredura dos esferoides de linhagem HEp-2, sendo A e B controle e C e D, tratados com hidrocortisona por 24 horas com 2,5 μ M. As imagens B e D tem aumento de 1,00 K e as imagens A e C 350X.

A Figura 3 (A e B) apresenta a microscopia eletrônica de varredura dos esferoides de células HEp-2 em grupo de controle (não tratado). Nas imagens podemos observar a formação esperada de elementos da MEC (matriz extracelular), sem a interferência da incubação com hidrocortisona.

Nota-se que a MEC está presente de forma significativa, favorecendo a formação de uma massa tumoral estável e bem delimitada, em que a interação célula-célula é evidente, denotando atividade tumoral que não sugere degradação da MEV, processo associado à formação metastática, como descreve Pereira *et al.* (2005).

Quanto ao crescimento normal dos tumores, é importante lembrar que muitas das alterações necessárias para a invasão e a metastização de tumores ocorrem após a alteração de genes específicos, como sugerem Niu, Huang e Zhang (2015). Dessa forma, não seria esperado que um tumor sem essas alterações apresentasse características de processo metastático, como alterações de MEC.

Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura dos esferoides de células HEP-2 – Tratados (C e D) e não tratados (A e B). A e C aumento 350X e B e D de 1,00K.



Fonte: elaborado pelo autor.

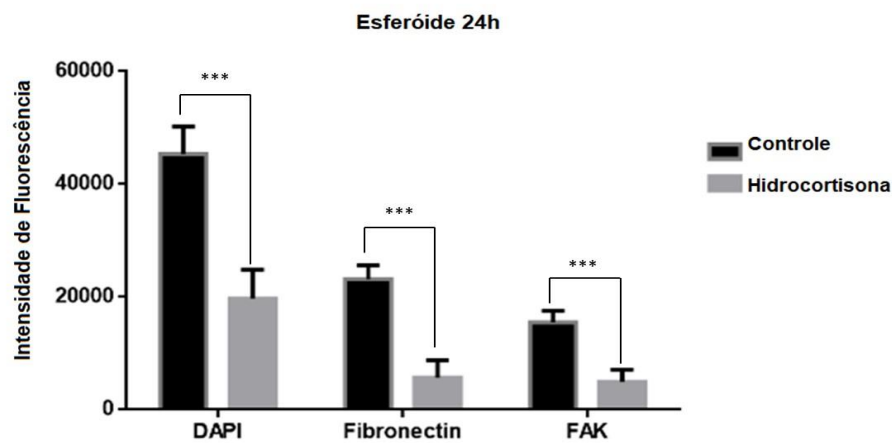
A Figura 3 (C e D) apresenta esferoides após incubação com hidrocortisona 2,5 μ M por 24 horas. Observa-se nesse grupo espaçamento entre as células, quando comparado ao grupo de controle.

Nas imagens, observa-se menor interação célula-célula, com espaços consideráveis na massa tumoral. Da mesma forma, é possível relatar um menor agrupamento de células nas imagens, denotando uma massa tumoral menos compacta e um possível impacto do tratamento na estabilidade da MEC, o que, novamente vale lembrar, apresenta associação com quadros metastáticos.

6.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DOS ESFERÓIDES PARA DAPI, FAK E FIBRONECTINA.

O Gráfico 6 revela os resultados encontrados na incubação com hidrocortisona (2,5µM) de esferóides marcados para DAPI, FAK e Fibronectina por 24 horas.

Gráfico 6 – Marcadores DAPI, FAK e Fibronectina incubados em esferóides por 24h.

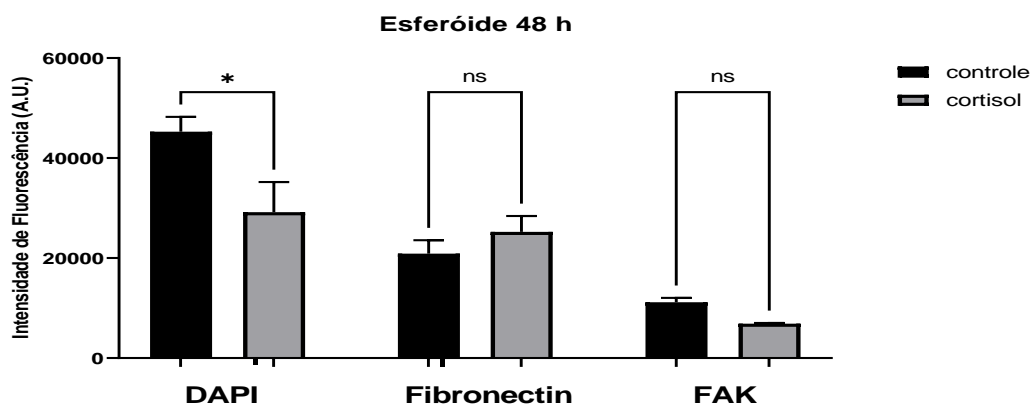


O valor estatístico de P foi de *** P<0,0005.

Fonte: elaborado pelo autor.

O Gráfico 7 revela os resultados encontrados na incubação com hidrocortisona (2,5µM) de esferóides marcados para DAPI, FAK e Fibronectina por 48 horas.

Gráfico 7 – Marcadores DAPI, FAK e Fibronectina incubados em esferóides por 48h.

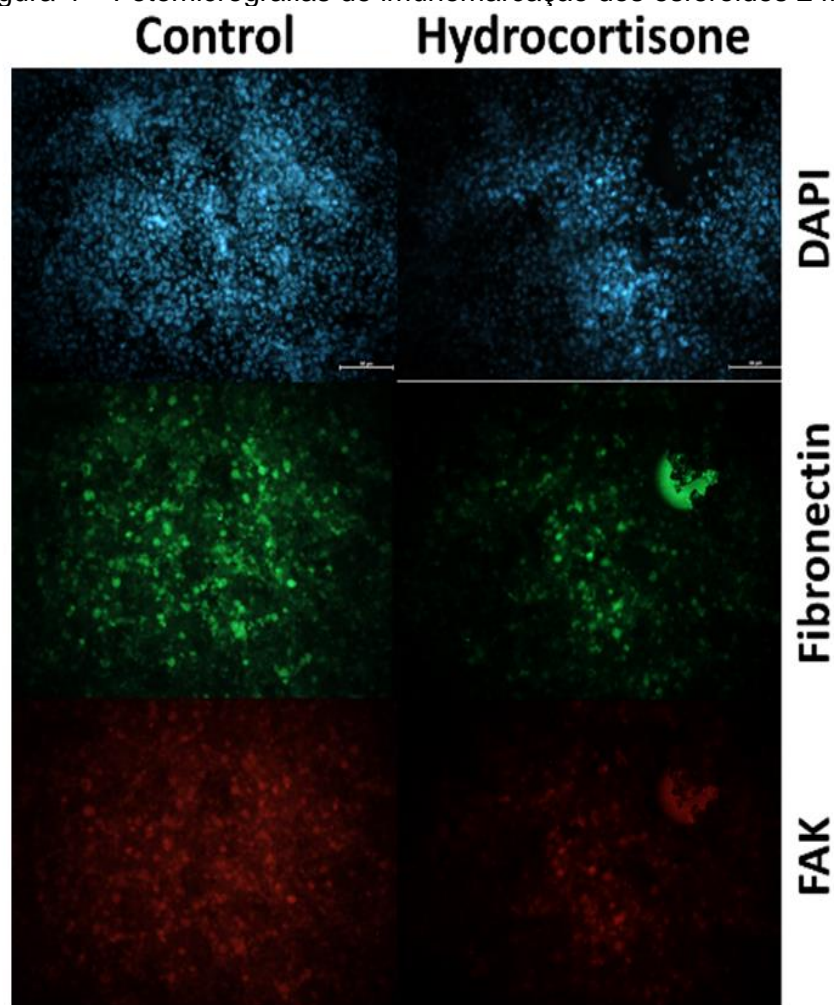


Sendo o valor de P expresso por * P<0,01

Fonte: elaborado pelo autor.

As Figuras 4 e 5, na sequência, apresentam as fotomicrografias de imunomarcção dos esferoides, com respectivamente 24 e 48 horas de incubação, sendo possível visualizar a marcação fluorescente para as proteínas FAK e fibronectina.

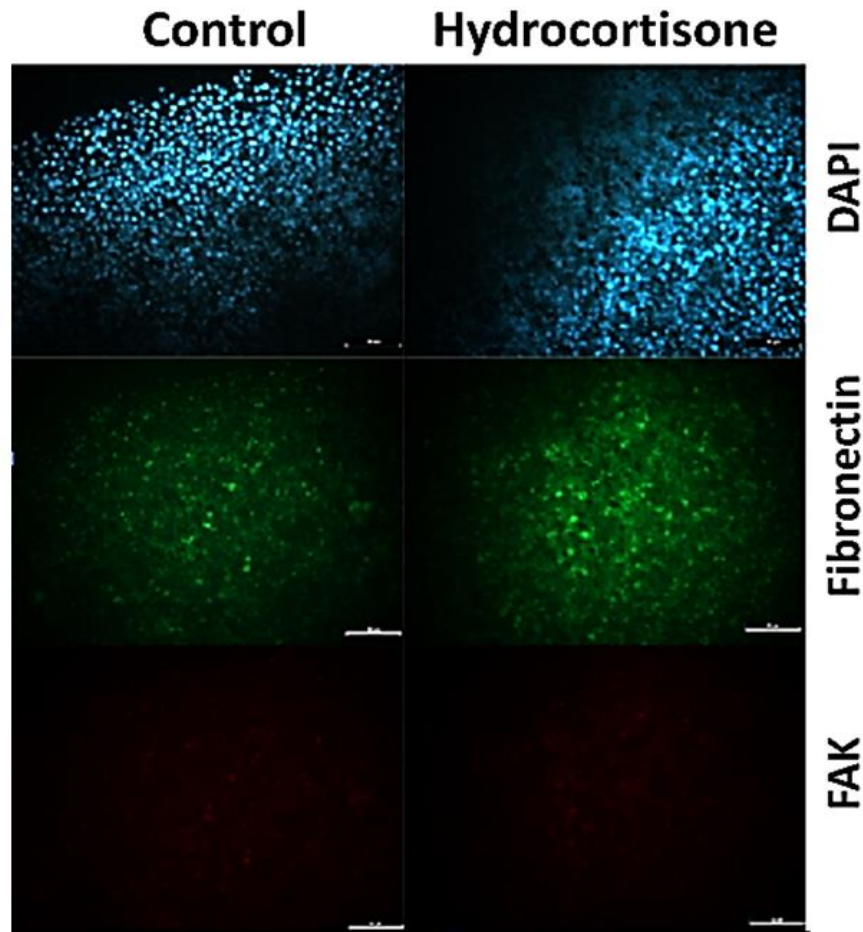
Figura 4 – Fotomicrografias de imunomarcção dos esferoides 24h.



Fonte: elaborado pelo autor.

A análise das proteínas de adesão ou proteínas de matriz celular, FAK e fibronectina demonstrou que os efeitos da incubação com hidrocortisona em esferoide se restringiram à exposição por período de 24 horas, sendo os resultados em 48 horas não significativos estatisticamente, como demonstrado nas Figuras 4 e 5.

Figura 5 – Fotomicrografias de imunomarcação dos esferoides 48h.



Fonte: elaborado pelo autor

Após 24 horas, foram encontradas reduções significativas dos valores de intensidade de coloração/fluorescência para fibronectina, representando redução superior a 50% dos valores observados no grupo de controle. Portanto, é possível afirmar que a incubação com hidrocortisona exerceu efeito significativo na redução de fibronectina nas primeiras 24 horas de incubação.

7 DISCUSSÃO

Após o detalhamento dos procedimentos de pesquisa e a apresentação dos resultados nas seções anteriores, nesta seção são discutidos os resultados da pesquisa.

7.1 ATIVIDADE MITOCONDRIAL

A investigação dos efeitos da incubação sob a atividade mitocondrial, como Oliveira *et al.* (2013) descrevem, se dá por sua importante participação nos processos de morte celular, assim como por sua clara importância no fornecimento de energia para as células e sua participação em importantes processos metabólicos.

Porém, como descrito no trabalho de Deus *et al.* (2014), importantes estudos têm demonstrado que, em inúmeras linhagens tumorais, a redução do metabolismo mitocondrial e a síntese de ATP via fosforilação oxidativa mitocondrial estão associadas à proliferação tumoral, fazendo com que o núcleo celular busque glicose em seu citoplasma para potencializar processos de mitose.

Essas evidências confrontam os achados do presente estudo em um primeiro momento, uma vez que quando se comparam população celular e atividade mitocondrial, na maioria dos grupos da linhagem HEP-2 existe uma relação entre aumento de atividade mitocondrial associada à manutenção das populações de célula.

Uma possível explicação para essa evidência pode estar relacionada às características multifatoriais envolvidas no fator proliferação e, possivelmente, na disponibilidade de glicose em citoplasma celular. Da mesma maneira, deve-se considerar que o aumento da atividade mitocondrial pode estar relacionado a outros processos celulares que também ocorrem no período de proliferação, como sugerem Silva e Ferrari (2011) quando descrevem a importância do metabolismo mitocondrial para a boa função celular, assim como que seu oposto estaria associado ao envelhecimento das células e a inúmeros problemas.

Prosseguindo na avaliação de atividade mitocondrial das linhagens estudadas, o Gráfico 2 descreve o comportamento mitocondrial da linhagem L929. Pode-se observar ocorreu diferença de atividade mitocondrial entre grupo de

controle e quatro dos grupos tratados, sendo valores estatísticos marcados por ** $P < 0,0027$; *** $P < 0,0005$ e **** $P < 0,0001$. Uma pequena redução da atividade mitocondrial foi observada na dosagem 2,5 μM em período de 48 horas (** $P < 0,0005$). Embora estatisticamente comprovada, pode-se sugerir que, em células saudáveis, a exposição ao cortisol não parece afetar de maneira contundente a atividade mitocondrial, ao menos nas dosagens estudadas.

Oliveira *et al.* (2013) descreveram em seu estudo que as atividades mitocondriais de células tumorais apresentam evidenciadas diferenças de comportamento se comparadas a células saudáveis. Esse fato pôde ser comprovado no presente estudo pela diferença de absorbância dos ensaios de MTT, em que esse valor se refere ao marcador utilizado para avaliar a atividade mitocondrial que, na linhagem saudável L929, permanece entre valores que vão de 0,0 a 0,15 (D.O densidade de observância), enquanto na linhagem tumoral Hep-2, encontram-se na faixa de 0,0 a 0.3 densidade de observância.

Portanto, os valores de atividade mitocondrial da linhagem tumoral são, mesmo em seu grupo de controle, superiores aos da linhagem saudável, guardadas as diferenças de cada tecido. Essa característica é representativa de como o metabolismo da linhagem tumoral apresenta sensíveis diferenças se comparado ao de linhagens não tumorais.

Assim, pode-se considerar que, em linhagem L929, as cinco dosagens utilizadas apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ao grupo de controle, e significativamente superiores ao grupo de morte celular.

7.2 CRESCIMENTO POPULACIONAL POR MEIO DE CRISTAL VIOLETA

A investigação voltada ao crescimento populacional das linhagens L929 e HEp-2 foi realizada por meio do teste de cristal violeta, que mensura a população celular pela marcação nuclear de células aderidas. A avaliação foi realizada com o intuito de aferir possíveis interferências da administração de hidrocortisona na proliferação celular, tema chave desta pesquisa.

Essa investigação se justifica pelas possíveis relações entre quadros de estresse caracterizados pelo aumento do cortisol circulante e a proliferação de células tumorais, assim como pela análise dos resultados deste estudo, em especial os encontrados no teste de MTT, em que foram observadas alterações.

Quanto aos resultados do teste de cristal violeta para a linhagem HEP-2, os dados descritos pelo Gráfico 3 revelam que, sob exposição a diferentes dosagens de hidrocortisona, nos períodos de 24 e 48 horas, nas células incubadas a 2,5 μM por período de 24 horas, foi observada leve redução populacional (* $P < 0,0219$). Sendo assim, não é possível afirmar que a linhagem em questão sofreu aumento populacional, embora o oposto também não tenha sido evidenciado.

Quanto aos valores de cristal violeta para linhagem L929, Gráfico 4, em análise inicial, observamos uma interferência das incubações com hidrocortisona no desenvolvimento populacional.

No primeiro período de 24 horas, nota-se que nas duas primeiras dosagens de hidrocortisona (0,5 e 1) ocorreu redução populacional da linhagem, evidenciada pela comparação com o grupo de controle em análise estatística (** $P < 0,0003$ e **** $P < 0,0001$). Essa redução não se comprovou estatisticamente nas dosagens 1,5; 2,0 μM por período de 24 horas (* $P < 0,004$), sendo a dosagem 2,5 μM novamente estatisticamente significativa (**** $P < 0,0001$).

Porém, quando são observados os resultados da incubação por 48 horas, verifica-se aumento populacional na dosagem de 1,5 μM , com diferença em relação ao controle comprovada por cálculo estatístico e redução de proliferação em dosagem 2,5, μM , também com relação demonstrada em ferramenta estatística (**** $P < 0,0001$). Portanto, é possível evidenciar que, no período de 48 horas, o fator dose foi suficiente para que a linhagem tumoral apresentasse dois comportamentos distintos, sendo ora proliferativo, ora de inibição.

Relacionando-se os dados de atividade mitocondrial e a alteração de população em linhagem L929, observa-se um fato importante: embora os valores de atividade mitocondrial não tenham sofrido alterações, quando analisados os valores referentes à viabilidade celular podemos observar que o número de células foi impactado pelas concentrações de hidrocortisona, como descrito acima. Tal achado pode ser relacionado aos resultados do estudo de Du *et al.* (2009), em que os pesquisadores descrevem o que chamaram de “efeitos bifásicos dos glicocorticóides” sobre a atividade mitocondrial de neurônios. Para os autores, a atuação dos glicocorticóides na dinâmica mitocondrial pode variar de acordo com a sua concentração.

Quando analisados e comparados esses achados com os resultados do mesmo método aplicado à linhagem tumoral HEP-2, evidencia-se uma clara

alteração de comportamento entre células saudáveis e células tumorais quando se avalia a população celular, o que sugere que não somente as diferenças de concentração e de tempo de exposição à hidrocortisona favorecem alterações na atividade mitocondrial e da viabilidade celular, como também se pode afirmar que essas interferências possivelmente são distintas entre linhagens saudáveis e tumorais.

Tal pressuposto levanta a hipótese de que células saudáveis, como a L929 usada em literatura para avaliação de cito toxicidade, tendem a ser mais sensíveis à exposição ao cortisol e, conseqüentemente, a quadros de estresse crônico se comparadas a células tumorais, principalmente se avaliado o período de 24 horas de exposição, em que a linhagem L929 pareceu sofrer maior impacto populacional quando comparada ao grupo de controle, nas dosagens 0,5 e 1,0 μM (sendo *** $P < 0,0003$ e **** $P < 0,0001$).

Esse maior impacto observado em período de 24 horas permite levantar a hipótese de que, embora essas células se mostrem sensíveis ao hormônio, parecem adaptar-se melhor no período de 48 horas, levando suas populações a níveis semelhantes aos encontrados no grupo de controle em três dos cinco grupos tratados.

A importância desses dados se refere principalmente à demonstração de uma diferença de resposta celular à incubação com cortisol, refletida aqui no aspecto da proliferação celular. De maneira clara se evidencia que a resposta proliferativa da linhagem saudável L929 e da linhagem tumoral HEP-2 são distintas quanto expostas ao cortisol.

Após a análise dos dados de cristal violeta e do teste de MTT encontrados na linhagem (HEP-2), foram observadas alterações que sugerem uma variação de população celular não clarificada.

Esses achados justificam maiores estudos comparativos da atividade mitocondrial e da proliferação celular em linhagem HEP-2, a fim de esclarecer possíveis influências nos dados populacionais dessa linhagem.

7.3 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

De acordo com Garrido *et al.* (2003), as proteínas de choque térmico HSP27 e HSP 70 apresentam importante relação com o processo de tumorigênese,

relacionada principalmente à resistência apoptótica desempenhada pela superexpressão das proteínas.

Quando observados os resultados em monocamada dos marcadores de fluorescência da proteína HSP27, verificou-se que após 24 horas de incubação não foram encontradas alterações; porém, após 48 horas de incubação os marcadores de fluorescência revelaram importante aumento de concentração da proteína.

O aumento da concentração de HSP27 após 48 horas de incubação deve ser considerado um importante achado, uma vez que, como demonstrado por Lee *et al.* (2007), o aumento da expressão de HSP27 em tumores de laringe é associado a um pior prognóstico do tratamento, com as células tumorais oferecendo resistência a quimioterápicos, como a cisplatina. Estudo semelhante de Aloy *et al.* (2008) demonstrou a relação entre a proteína HSP27 e a maior resistência apoptótica de algumas linhagens tumorais, mesmo quando expostas à radiação.

Embora estudos como os de Barr e Dokas (1999), Kozawa *et al.* (2002) e de Son *et al.* (2005) demonstrem as relações entre o aumento da expressão de HSP27 mediada por glicocorticóides em células saudáveis, não foram encontrados estudos que relatassem o aumento de expressão da proteína em células tumorais induzidas por glicocorticóides.

Quantos aos resultados voltados à intensidade de fluorescência das proteínas de choque térmico, o presente estudo não encontrou alterações significativas na proteína HSP70, independentemente do tempo de incubação. Esse resultado permite questionamentos sobre as possíveis relações entre os níveis de HSP70 em células tumorais com os glicocorticóides, uma vez que em células saudáveis o aumento de cortisol circulante induzido por quadros de estresse foi relacionado ao aumento de expressão da proteína, como relatado nos estudos de Basu, Kennedy e Iwama. (2003), Bei *et al.* (2013) e Benavides (2013).

É possível considerar que as ligações entre a expressão de proteínas de choque térmico HSP27 e HSP70 e os níveis de glicocorticóides ainda não foram totalmente compreendidas, principalmente quando se consideram linhagens tumorais como as HEP-2.

O presente estudo descreve o que poderia se relacionar a uma possível influência voltada à proteína HSP27 após 48 horas de incubação com hidrocortisona que, segundo os estudos de Lee *et al.* (2007) e Aloy *et al.* (2008), poderia representar importante aspecto prognóstico tumoral. Da mesma forma, este estudo

levanta dúvidas quanto à possível relação entre o cortisol e a expressão da proteína HSP70 em células tumorais.

7.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM ESFEROIDE

De acordo com Wernert (1997) e Liotta (1986), já é reconhecida a importância do estroma tumoral no comportamento biológico dos tumores, principalmente no que se refere aos processos metastáticos.

Estudos como os de Juhász *et al.* (2000) e Thomas, Lewis e Speight (1999) descreveram como a capacidade de destruição da membrana basal e de outros componentes da matriz extracelular estão diretamente relacionados ao potencial invasivo de tumores de cabeça e pescoço, apresentando relação com a formação de metástases e, conseqüentemente, o mau prognóstico do tratamento.

No que diz respeito aos tumores de cabeça e pescoço, Koivisto *et al.* (2000) relatam que as alterações na membrana basal e a alteração de proteínas da MEC estão relacionadas diretamente à invasão local e ao desenvolvimento de metástases nesses tumores. Segundo os autores, dentre as proteínas de matriz extracelular, a fibronectina teria papel importante nesse processo.

De acordo com Thomas, Lewis e Speight (1999), quando tumores epidermóides de cabeça e pescoço se desenvolvem, o tecido marginal passa por inúmeras alterações que incluem a lise do estroma e a degradação da MEC, o que corrobora o estudo de Rich e Read (2001), que descrevem ser esse um caminho preparatório para uma invasão tumoral. Segundo Wilson *et al.* (1999), o processo de interação entre as células tumorais se dá tanto na membrana basal quanto no estroma intersticial, influenciando na invasão tumoral.

De acordo com Shrestha *et al.* (1996), a MEC pode ter contribuição direta ou indireta no processo de formação tumoral, uma vez que apresenta componentes que podem ser descritos como moduladores de adesão, assim como moderadores de proliferação e de migração celular. A participação multifatorial da MEC na formação tumoral também fica expressa nos estudos de Wernert (1997) e Sottile (2004), quando a relacionam à angiogênese tumoral.

No que diz respeito ao papel da MEC nos tumores de laringe, investigados neste trabalho, Hagedorn *et al.* (2001) verificaram problemas na membrana basal

desses tumores, principalmente pela perda significativa de colágeno IV, importante constituinte da membrana.

Partindo de tais achados, nesta pesquisa foram encontrados bons indicadores da existência de uma relação entre a presença do cortisol em ambiente tumoral e de seu efeito sobre a MEC. As imagens de microscopia eletrônica mostram uma redução clara no número de células do esferoide tratado, evidenciado principalmente por uma redução na ligação e na conexão das células tumorais por meio da matriz extracelular. Em outras palavras, são visíveis as alterações na ligação entre as células do esferoide tratado, em que algumas células podem ser vistas se despreendendo do tumor, o que sugere perda de adesão, associada ao processo metastático.

Embora os estudos anteriormente descritos relatem ao longo de anos relações entre alterações em MEC e progressão tumoral e metastização, não foram encontrados estudos que evidenciem relações claras entre a presença de cortisol e uma possível perda de coerência de MEC, o que agrega significativa importância ao resultado desta pesquisa.

7.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE ESFEROIDE PARA PROTEÍNAS DE ADESÃO (FIBRONECTINA; FAK E DAPI)

No que diz respeito à fibronectina, estudos como os de Kosmehl *et al.* (1999), Armstrong e Armstrong (2000) e Lyons *et al.* (2001) têm sugerido que sua redução ao longo da formação tumoral pode ter relação direta com a livre migração de células tumorais, responsável pela formação de metástases. A relação fibronectina e mau prognóstico também foi abordada por Huang *et al.* (2001), que descreveram a ação antiaderente causada pela tenascina, prejudicando a função adesiva da fibronectina, o que poderia levar a um aumento na proliferação e na migração celular.

Da mesma maneira, Zidar *et al.* (2001) também relacionaram o mau prognóstico de carcinomas epidermóides de laringe com a expressão de fibronectina, cuja expressão era inversamente proporcional à densidade do infiltrado inflamatório associado e ao grau de diferenciação tumoral.

No que tange à participação da fibronectina no prognóstico dos tumores de cabeça e pescoço, Miranda (2002) relata que as células tumorais possuem a

capacidade de sintetizar a fibronectina, fato que poderia estar relacionado a processos de aderência tumoral e posterior migração através do estroma tumoral, novamente descrevendo que o papel da fibronectina e da MEC na dinâmica tumoral pode variar de uma para outra linhagem tumoral, assim como pode sofrer variações de acordo com o grau de evolução da doença.

Quando analisadas as chamadas proteínas de adesão ou proteínas de matriz celular, FAK e fibronectina, o presente estudo demonstrou que os efeitos da incubação com hidrocortisona em esferoide se restringiram à exposição por período de 24 horas, sendo os resultados em 48 horas não significativos estatisticamente, como mostram as Figuras 3 e 4.

Após 24 horas de incubação, foram encontradas reduções significativas dos valores de intensidade de fluorescência para fibronectina, representando redução superior a 50% dos valores observados no grupo de controle (***) $P < 0,0005$). Assim, é possível afirmar que a incubação com hidrocortisona exerceu efeito significativo na redução de fibronectina nas primeiras 24 horas.

Esse achado deve ser relacionado com os estudos de Pereira *et al.* (2005), Cuciolo (2018), Kosmehl *et al.* (1999), Lyons *et al.* (2001) e Zidar *et al.* (2001), que demonstraram relação entre diferentes expressões da proteína e infiltração tumoral, principalmente em tumores de cabeça e pescoço.

Em especial relevância encontra-se o artigo de Armstrong e Armstrong (2000), que relata achados em que o papel da fibronectina na progressão tumoral pode variar, ora sendo mais expressa, ora menos expressa, dependendo do tipo de tecido às margens do tumor. Em outras palavras, enquanto a proliferação tumoral em alguns casos é auxiliada pela maior expressão da fibronectina, em outros a redução dessa expressão faz o papel de facilitador da dinâmica tumoral.

Outro estudo que levanta importantes discussões sobre a variação de expressões de fibronectina entre tumores e momentos diferentes do desenvolvimento oncológico foi o de Lin *et al.* (2020). Para o autor, embora conclusões sobre o tema no momento não sejam possíveis, seria correto afirmar que, no estágio inicial da progressão tumoral, os valores de fibronectina são regulados para baixo, a fim de auxiliar as células tumorais a melhorar suas oncogêneses e evitar a limitação senescente da progressão do ciclo celular.

O autor, corroborado por estudos como os de Ogura *et al.* (2019) e Postow, Callahan e Wolchok (2015), afirmam que seria possível se pensar em estratégias

terapêuticas que favorecessem a maior expressão de fibronectina em células tumorais recém transformadas, forçando uma parada de ciclo celular seguida por processo apoptótico.

Para Lin *et al.* (2020), embora seja uma alternativa terapêutica possível, inúmeros cuidados deveriam nortear essa prática, visando a detecção no estágio tumoral propício. Caso contrário, o aumento de expressão da proteína em células com expressão já aumentada favoreceria o aparecimento de novas anormalidades.

É possível concluir que não existe consenso ou conclusão sobre o real papel da fibronectina na progressão tumoral. Afirmar que unicamente níveis elevados da proteína são responsáveis pelo mau prognóstico pode ser descrito como prematuro, uma vez que, dependendo do estágio tumoral, níveis baixos da proteína também favorecem o desenvolvimento tumoral.

Essas discussões são recentes e fortalecem a ideia de que os estudos acerca das contribuições da fibronectina no desenvolvimento tumoral devem levar em consideração não somente o tipo de tumor, mas principalmente o estágio em que se encontra.

Em última análise, estudos como os de Cuciolo (2018) relatam que a expressão de fibronectina estaria relacionada à inibição de comportamento migratório e a projeções citoplasmáticas de células tumorais, o que poderia auxiliar na elucidação dos achados do presente estudo quanto às imagens de microscopia eletrônica de varredura.

No que diz respeito à proteína FAK, os valores observados no período de incubação de 24 horas revelaram redução estatisticamente significativa das marcações. Esses achados não se repetiram no período de incubação de 48 horas, o que pode sugerir que, após o estresse inicial induzido pela presença de hidrocortisona, a presença da proteína retornou aos níveis observados no grupo de controle (sendo * $P < 0,01$ apenas para DAPI, sendo os valores estatísticos de FAK e Fibronectina considerados “não significativos”).

Analisando os dados encontrados e correlacionando-os aos achados em literatura, é possível afirmar que os resultados aqui apresentados não corroboram interpretações de piora da dinâmica tumoral. São inúmeros os estudos que demonstraram que uma maior expressão de FAK estaria diretamente associada a mau prognóstico, metastização tumoral e progressão dos tumores, como sugerem alguns autores (CARY *et al.*, 1998; ILIC *et al.*, 1995; GOLUBOVSKAYA *et al.*, 2009;

ZHAO; GUAN, 2009; OWENS *et al.*, 1996; SLACK *et al.*, 2001; WANG; PARK; GROOPMAN, 2000; HAUCK *et al.*, 2002a; HAUCK *et al.*, 2002b).

Embora muitos estudos associem a maior expressão de FAK a desenvolvimento tumoral, poucos se dedicaram a avaliar os reais efeitos da expressão e da atividade de FAK no desenvolvimento e no transcorrer de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Canel *et al.* (2006) analisaram em seu estudo a expressão de FAK nesses tumores e fatores como metastização e invasão, assim como a existência de alterações associadas a FAK em todos os estágios da doença.

No estudo de Canel *et al.* (2006), os resultados mostraram diferenças significativas entre os tumores com e sem metástases, e os níveis de expressão mais altos de FAK foram associados a metástases nodais. Segundo os autores, os achados do estudo sugerem que a desregulação da FAK durante a progressão das células tumorais de cabeça e pescoço pode ter um papel ativo no desenvolvimento, na manutenção e progressão e, talvez, no processo de invasão dos tumores de cabeça e pescoço estudados. Outro ponto importante descrito pelo estudo é a aparente independência da superexpressão de FAK de alterações no número de cópias do gene correspondente a FAK, o que sugere outros fatores envolvidos no aumento da expressão.

Embora estudos relacionando maior expressão da proteína sejam frequentes, exceções também podem ser encontradas, como os achados de Ayaki *et al.* (2001) sobre metástases hepáticas de adenocarcinoma colorretal, em que essas metástases apresentaram menor expressão de FAK que seus tumores primários, e o estudo de Gabriel *et al.* (2006), que encontrou baixa expressão da FAK associada à metástase nodal e mau prognóstico em tumores de colo de útero.

Sendo assim, até o momento não é possível afirmar que o grau de malignidade esteja correlacionado com o aumento da expressão de FAK em todos os cânceres de maneira tão clara, sugerindo a presença de mecanismos independentes do tipo tumoral e uma complexidade incompreendida dos mecanismos associados, bem como associações que necessitam de maior investigação, como a relação de mutações em p53 e a maior expressão no mRNA FAK e sua expressão em tumores mamários, como descrito por Golubovskaya *et al.* (2009).

Os resultados encontrados neste estudo, demonstrando a redução dos valores de intensidade de fluorescência para FAK pós 24 horas de incubação de cortisol,

são importantes para impulsionar o entendimento dos mecanismos associados à flutuação das concentrações de FAK e de como essas podem estar associadas a fatores desconhecidos, como a presença de glicocorticoides.

Os achados deste estudo, embora demonstrem uma redução dos valores de FAK, não devem ser necessariamente associados a um possível efeito terapêutico da hidrocortisona, uma vez que, no mesmo período de incubação, ela também apresentou efeito sob outra proteína de matriz, a fibronectina, o que torna sua interação mais complexa do que se supunha.

Finalmente, quando observados os resultados encontrados na marcação para DAPI, que visa marcar núcleos e, conseqüentemente, informar sobre possíveis alterações no número de células, verificou-se redução dos valores em 24 e 48 horas, como revelam os Gráficos 6 e 7. A maior redução foi observada no período de 24 horas, embora em 48 horas os valores também tenham se demonstrado reduzidos em comparação com o grupo de controle.

Esse resultado apresenta importância significativa quando comparado com as imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (Figura 2), uma vez que essas revelaram uma redução populacional no esferoide, que sugere, quando os dados são confrontados, uma possível perda de adesão da MEC e conseqüente desprendimento de células do tumor.

O resultado das análises da interação entre a incubação com hidrocortisona em tumores 3D de linhagem HEp-2 demonstradas por MEV sugerem que a incubação favoreceu alterações significativas da estabilidade e da viabilidade da MEC da linhagem celular, comprometendo a ligação entre as células tumorais e fazendo com que o número de células fosse menor, se comparado ao tumor do grupo de controle. Esses resultados, quando relacionados com os valores encontrados para as proteínas de adesão e para as proteínas de choque térmico, sugerem uma provável relação entre a disponibilidade do cortisol em ambiente tumoral com as alterações observadas em microscopia eletrônica.

Trata-se de uma interpretação plausível, uma vez que o presente estudo também demonstrou que a incubação com hidrocortisona afetou os marcadores associados à fibronectina e à FAK de maneira diferente, dependendo do período de incubação. Essas alterações podem ter sido significativas para modificar a estabilidade da MEC, levando à diminuição das ligações celulares e ao

desprendimento das células ainda viáveis do tumor observado, processo que, associado à angiogênese em organismos, levará à formação de metástases.

Concluindo a discussão deste estudo, quanto às hipóteses inicialmente levantadas sobre o tema, não foi possível afirmar que a administração de hidrocortisona tenha aumentado a proliferação das linhagens estudadas. No entanto, foi possível concluir que altas doses de cortisol podem ser significativamente letais, uma vez que a substância influencia o metabolismo de inúmeras proteínas essenciais descritas ao longo do estudo. Por último, o estudo também pode confirmar que a administração de cortisol em linhagem HEP-2 apresentou correlação com uma redução de estabilidade de MEC, sendo este o principal achado desta tese.

Partindo desses resultados, importantes discussões devem ser levantadas sobre a participação do cortisol na estabilidade da matriz extracelular e, conseqüentemente, no possível favorecimento de metástases em tumores de laringe, assim como em outros tipos de câncer, sejam essas causadas pelas alterações na presença de fibronectina e FAK ao longo de diferentes períodos de exposição, pela possível relação com outras proteínas da MEC ou por outros motivos que possam estar associados a tais alterações.

Novas discussões devem contemplar a possibilidade de que essas alterações possam também ser causadas por alterações nos níveis de cortisol circulante, comuns em quadros de estresse crônico, como sugerem Cohen *et al.* (1997), o que poderia levar a resultados desastrosos se considerados os efeitos imunitários dos mesmos quadros de estresse. Da mesma maneira, sugere-se que os estudos futuros sobre o tema avaliem conjuntamente a expressão gênica das proteínas aqui descritas, assim como a expressão de genes associados ao processo metastático, antes e após a administração do cortisol.

8 CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que existe uma diferença clara entre a reação das linhagens L929 e HEP-2 quando incubadas com hidrocortisona. Essa reação se mostrou diferenciada entre as linhagens tanto em atividade mitocondrial quanto em proliferação, o que pode representar diferenças de metabolismo de células tumorais e saudáveis.

Embora os resultados sejam claros, a continuidade da investigação poderá oferecer maiores informações sobre a causa das variações, assim como averiguar quais os seus reflexos na formação de tumores, uma vez que os efeitos do cortisol também parecem distintos entre células tumorais, como sugere estudo anterior (FONSECA *et al.*, 2019)

O presente estudo concluiu que a administração de hidrocortisona em esferoides tumorais de linhagem HEP-2 afetou a estabilidade da matriz extracelular, o que sugere uma possível relação entre a substância e uma maior chance de metastização, caso o ambiente tumoral adequado esteja presente, sendo esse seu principal achado.

REFERÊNCIAS

- ABDANIPOUR, A. *et al.* In vitro study of the long-term cortisol treatment effects on the growth rate and proliferation of the neural stem/precursor cells. **Neurological research**, v. 37, n. 2, p.117–124, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1179/1743132814Y.0000000431> Acesso em: 07 mar.2020.
- ABDEL-GHANY, M. *et al.* Truncated dipeptidyl peptidase IV is a potent anti-adhesion and anti-metastasis peptide for rat breast cancer cells. **Invasion Metastasis**, n.18, p. 35-43,1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000024497> Acesso em: 18 mar.2020.
- ALOY, M. T. *et al.* Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells. **International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics**, v. 70, n. 2, p. 543-553, Feb. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.08.061>. Acesso em: 29 abr. 2020.
- ARISPE, N.; MAIO, A. ATP and ADP modulate a cation channel formed by Hsc70 in acidic phospholipid membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 30839–30843, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M005226200> Acesso em: 07 mar. 2020.
- ARMSTRONG, P. B.; ARMSTRONG, M. T. Intercellular invasions and the organizational stability of tissues a role for fibronectin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1470, n. 2, p. 09-20, mar.2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0304-419x\(00\)00003-2](https://doi.org/10.1016/s0304-419x(00)00003-2). Acesso em: 24 ago. 2020.
- BARR, C. S.; DOKAS, L. A. Glucocorticoids regulate the synthesis of HSP27 in rat brain slices. **Brain Research**, v. 847, n.1, p. 9-17, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01988-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01988-5) Acesso em: 24 ago. 2020.
- BASU, N.; KENNEDY, C. J.; IWAMA, G. K. The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 134, n. 3, p. 655-663, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00372-0](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00372-0) Acesso em: 02 abr.2020.
- BEI, E. S. *et al.* Pattern of heat shock factor and heat shock protein expression in lymphocytes of bipolar patients: increased HSP70-glucocorticoid receptor heterocomplex. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 11, p. 1725-1736, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.07.018> Acesso em: 18 mar. 2020.
- BENAVIDES, L. E. E. **Indicadores fisiológicos de estresse e expressão do gene hsp70 em juvenis do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após implante de cortisol.** 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura,

Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/86485>. Acesso em: 07 mar.2020.

BERNDORFF, D. *et al.* Radioimmunotherapy of solid tumors by targeting extra domain B fibronectin: Identification of the best-suited radioimmunoconjugate. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 7053–7063, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1004-0015>. Acesso em: 18 mar.2020.

BOVBJERG, O. Psychoneuroimmunology and cancer. *In*: HOLLAND J.; ROWLAND, J. (ed.). **Handbook of Psychooncology**. New York: Oxford Press,1990.

BRANDÃO, M.L. **Psicofisiologia**. São Paulo: Atheneu, 1995.

BROEMER, L. *et al.* Exploratory study of functional and psychological factors associated with employment status in patients with head and neck cancer. **Head & Neck**, v. 3, n. 4, p. 1229-1241, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/hed.26595> Acesso em: 18 mar.2020.

CANEL, M. *et al.* Overexpression of Focal Adhesion Kinase in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma is Independent of *fak* Gene Copy Number. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 12, p. 3272-3279, Jun. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1583> Acesso em:10 jun.2021.

CARVALHO, M. M. Psico-Oncologia: História, Características e Desafios. **Psicologia USP**, v. 13, n.1, p. 151-166, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-65642002000100008> Acesso em: 29 abr. 2020.

CARY, L. A. *et al.* Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. **The Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 1, p. 211-221, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.140.1.211> Acesso em: 26 nov. 2020.

CASTRO-CHAVEZ, F. *et al.* Effect of lyso-phosphatidylcholine and Schnurri-3 on osteogenic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to calcifying vascular cells in 3D culture. **Biochim. Biophys Acta**, v.1830, n. 6, p.3828–3834, jun.2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.015> Acesso em: 07 mar.2020.

CHANG, Y. H. *et al.* Secretomic analysis identifies alpha-1 antitrypsin (A1AT) as a required protein in cancer cell migration, invasion, and pericellular fibronectin assembly for facilitating lung colonization of lung adenocarcinoma cells. **Molecular and Cellular Proteomics - MCP**, v. 11, n. 11, p. 1320–1339, Nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.017384>. Acesso em: 02 abr.2020.

CHENG, H. C. *et al.* Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 37, p. 24207–24215, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.24207> Acesso em: 29 abr. 2020.

CHENG, H. C.; ABDEL-GHANY, M.; PAULI, B. U. A novel consensus motif in fibronectin mediates dipeptidyl peptidase IV adhesion and metastasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24600–24607, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M303424200> Acesso em: 18 mar. 2020.

CHENG, H. C. *et al.* Is the Fischer 344/CRJ rat a protein-knock-out model for dipeptidyl peptidase IV-mediated lung metastasis of breast cancer? **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 17, p. 609–615, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1006757525190> Acesso em: 26 nov. 2020.

CHOI, S. K. *et al.* Targeting Heat Shock Protein 27 in Cancer: A Druggable Target for Cancer Treatment? **Cancers**, v. 11, n. 8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers11081195> Acesso em: 26 nov. 2020.

CLARK, E. A. *et al.* Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. **Nature**, v. 406, n. 6795, p. 532–535, Ago. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35020106> Acesso em: 02 abr.2020.

CLEMONS, N. J.; ANDERSON, R. L. TRAIL -induced apoptosis is enhanced by heat shock protein 70 expression. **Cell Stress Chaperones**, v. 11, n. 4, p. 343–355, Dez. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1379/CSC-206.1>. Acesso em:18 mar.2020.

CLEVENGER, C. V. *et al.* The role of prolactin in mammary carcinoma. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 1, p. 1-27, fev. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/er.2001-0036> Acesso em: 07 mar.2020.

COHEN, S. *et al.* Chronic Social Stress, Social Status, and Susceptibility to Upper Respiratory Infections in Nonhuman Primates. **Psychosomatic Medicine**, v. 59, n. 3, p 213-221, maio/Jun.1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00006842-199705000-00001> Acesso em:10 jun.2021.

CORDONNIER, T. *et al.* Hsp27 regulates EGF/beta-catenin mediated epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 6, p. 496–507, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.29122> Acesso em: 10 jun.2021.

CUCIELO, M. S. **Formação de invadopódios na migração de células neoplásicas malignas expostas à fibronectina.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências (IBB), UNESP, Botucatu-SP, 2018. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/153775> Acesso em:10 jun.2021.

DAMSKY, C. H.; WERB, Z. Signal transduction by adhesion receptors cooperative processing of extracellular information. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 4, n. 5, Out. 1992. Disponível em [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(92\)90100-q](https://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90100-q). Acesso em: 29 abr. 2020.

DAQUINAG, A. C.; SOUZA, G. R.; KOLONIN, M. G. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. **Tissue Engineering Part C Methods**, v.19, n. 5, p. 336–344, May 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ten>. Acesso em: 02 abr. 2020.

DAVE, J. R. *et al.* Chronic sustained stress increases levels of anterior pituitary prolactin mRNA. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 3, p. 423-431, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(00\)00388-9](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(00)00388-9) Acesso em: 18 mar.2020.

DAWSON, J. C. *et al.* Targeting FAK in anticancer combination therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, p. 313–324, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00340-6> Acesso em: 29 abr. 2020.

DEUS, C. M. *et al.* Targeting mitochondrial function for the treatment of breast cancer. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 1499-1513,2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/fmc.14.100> Acesso em: 07 mar.2020.

DISTELHORST, C. W. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, n. 1, p. 6-19, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400969> Acesso em: 14 nov. 2020.

DU, J. *et al.* Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 106, n. 9, p. 3543-3548, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas> Acesso em: 26 nov. 2020.

EKERT, J. E. *et al.* Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic compound responsiveness in vitro – implications for drug development. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092248/pnas> Acesso em:29 abr. 2020.

FERNANDES, A. S. *et al.* Oxidative injury in V79 Chinese hamster cells: protective role of the superoxide dismutase mimetic MnTM-4-PyP. **Cell Biology and Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 91-101, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9120-3> Acesso em: 02 abr.2020.

FERNANDEZ-GARCIA, B. *et al.* Expression and prognostic significance of fibronectin and matrix metalloproteases in breast cancer metastasis. **Histopathology**, v. 64, n. 4, p. 512–522, mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/his.12300> Acesso em: 07 mar.2020.

FIGUEIREDO, W. Assistência à saúde dos homens: um desafio para os serviços de atenção primária. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 10, n. 1, p. 106-109, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232005000100017> Acesso em: 29 abr. 2020.

FONSECA, M. O.; SILVA, N. S.; SOARES, C. P. Effect of cortisol on K562 leukemia cells. **O Mundo da Saúde**, v. 43, n. 4, p. 854-861, set. 2019. Disponível em: <https://www.revistamundodasaude.com.br/uploads/20190054.PDF> Acesso em: 18 mar. 2020.

FRIEDRICH, J. *et al.* Experimental anti-tumour therapy in 3-D: Spheroids - old hat or new challenge? **International Journal of Radiation Biology**, v. 83, n. 11-12, p. 849-

871, nov./dez. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09553000701727531>
Acesso em: 02 abr.2020.

FUKUZUKA, K. *et al.* Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury. **American Journal Physiology** - Regulatory, integrative and comparative physiology, v. 278, n. 4, p.1005-1018, abr. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.4.R1005> Acesso em: 21 nov. 2020.

GABRIEL, B. *et al.* Expression of focal adhesion kinase (FAK) in patients with cervical cancer is associated with disease outcome. **Geburtshilfe Frauenheilkd**, v. 66, 2006. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-952402> Acesso em: 10 jun.2021.

GABRIOLOVICH, D. I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 2, n. 10, p. 1096-1103, Out. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm1096-1096> Acesso em: 21 nov. 2020.

GARRIDO, C. *et al.* HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. **Cell Cycle**, v. 2, n. 6, p. 579-84, nov./dez. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14512773/> Acesso em: 12 ago. 2020.

GHANE SHAHRBAF, F.; ASSADI, F. Drug-induced renal disorders. **Journal of Renal Injury Prevention**, v. 4, n. 3, p. 57-60, Sep. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.12861/jrip.2015.12> Acesso em: 07 mar.2020.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v.13, n. 285, p. 1028-1032, ago.1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.285.5430.1028>
Acesso em: 02 abr.2020.

GRAF, L. *et al.* High serum Hsp70 level predicts poor survival in colorectal cancer: Results obtained in an independent validation cohort. **Cancer Biomarkers**, v. 23, n. 4, p. 539-547, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/CBM-181683> Acesso em: 02 abr.2020.

GOLUBOVSKAYA, V. M. *et al.* FAK overexpression and p53 mutations are highly correlated in human breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 7, p. 1735-1738, Out. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.24486>. Acesso em: 02 abr.2020.

GUPTA, N. *et al.* Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) a novel cancer testis antigen that promotes growth of ovarian cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. 1252–1269, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5489776/> Acesso em: 18 mar. 2020.

GYRD-HANSEN, M.; NYLANDSTED, J.; JAATTELA, M. Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. **Cell Cycle**, v. 3, n.

12, dez. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.3.12.1287>. Acesso em: 29 abr. 2020.

HAGEDORN, H.G. *et al.* Divergence in distribution and prognostic significance of major basement components in laryngeal carcinomas. **International Journal of Oncology**, v. 18, n. 5, p. 1045-1051, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.18.5.1045> Acesso em: 07 mar.2020.

HAN, H-J. *et al.* SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. **Nature**, v. 452, n. 7184, p. 187–193, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature06781> Acesso em: 07 mar. 2020.

HAUCK, C. R. *et al.* v-Src SH3- enhanced interaction with focal adhesion kinase at 1 integrin-containing invadopodia promotes cell invasion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 12487-12490, abr. 2002a. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.C100760200> Acesso em: 29 abr. 2020.

HAUCK, C. R. *et al.* FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastasis without effects on cell motility or growth. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 23, p. 6289–6302, 2002b. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf631> Acesso em: 02 abr.2020. (2002b).

HEGELE, A. *et al.* Plasma levels of cellular fibronectin in patients with localized and metastatic renal cell carcinoma. **Tumor Biology**, v. 25, n. 3, p. 111–116, ago. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000079142> Acesso em: 12 ago. 2020.

HERR, I. *et al.* Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. **Cancer Research**, v. 63, n. 12, p. 3112-3120, jun. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12810637/> Acesso em: 18 mar.2020.

HOFFMAN-GOETZ, L.; ZAJCHOWSKI S. In vitro apoptosis of lymphocytes after exposure to levels of corticosterone observed following submaximal exercise. **The Journal of Sports, Medicine and Physical Fitness**, v. 39, n. 4, p. 269-274, dez. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10726425/> Acesso em: 12 ago. 2020.

HOMAEI-SHANDIZ, F. *et al.* Anti-Heat Shock Protein-27 Antibody Levels in Women with Breast Cancer: Association with Disease Complications and Two-Year Disease-Free Survival. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 10, p. 4655-4659, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.22034/APJCP.2016.17.10.4655> Acesso em: 29 abr. 2020.

HOWLETT, A. R. *et al.* Cellular growth and survival are mediated by beta 1 integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 5, p. 1945-1957, May 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7544798/> Acesso em: 02 abr.2020.

HUANG, W. *et al.* Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. **Cancer Research**, v. 61, n. 23, p. 8586-8594, dez. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11731446/> Acesso em: 18 mar.2020.

HUANG, C. Y. *et al.* Silencing Heat Shock Protein 27 Inhibits the Progression and Metastasis of Colorectal Cancer (CRC) by Maintaining the Stability of Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) Proteins. **Cells**, v. 7, n. 12, Dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells7120262> Acesso em: 29 abr. 2020.

HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cells**, v. 69, n. 1, p. 11-25, abr. 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90115-s](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90115-s) Acesso em: 02 abr.2020.

ILIC, D. *et al. et al.* Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. **Nature**, v. 377, n. 6549, p. 539-44, Out. 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/377539a0> Acesso em: 12 ago. 2020.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs of carcinogenic risks to humans and handbooks of cancer prevention**. Lyon: IARC, 2021. Disponível em: https://monographs.iarc.who.int/human_cancer_known_causes_and_prevention Acesso em:13 maio 2021.

JEGO, G. *et al.* Targeting heat shock proteins in cancer. **Cancer Letters**, v. 332, n. 2, p. 275-285, May 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.10.014> Acesso em: 12 ago. 2020.

JUHÁSZ, A. *et al.* Characteristic distribution patterns of tenascin in laryngeal and hypopharyngeal cancers. **Laryngoscope**, v. 110, n. 1, p. 84-92, jan. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00005537-200001000-00016>. Acesso em:13 maio 2021.

KAMPINGA, H. H. *et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. **Cell Stress Chaperones**, v. 14, n. 1, p. 105-111, jan. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0068-7> Acesso em: 02 abr.2020.

KÜBLER-ROSS, E. **Sobre a morte e o morrer**. 8. ed. São Paulo: Martins Fontes, 1998.

KENNY, H. A. *et al.* Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 10, p. 4614–4628, out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI74778> Acesso em: 29 abr. 2020.

KOIVISTO, L. *et al.* Integrins $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 1$ and $\alpha v \beta 6$ collaborate in squamous carcinoma cell spreading and migration on fibronectin. **Experimental Cell Research**, v. 255, n.1, p. 10-17, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4769> Acesso em: 07 mar.2020

- KOSMEHL, H. *et al.* Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 81, n. 6, p. 1071-1079, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690809> Acesso em: 18 mar. 2020.
- KOZAWA, O. *et al.* Specific induction of heat shock protein 27 by glucocorticoid in osteoblasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 86, n. 2, p. 357-364, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.10221> Acesso em: 02 abr.2020.
- LEE, J. H. *et al.* Role of HSPA1L as a cellular prion protein stabilizer in tumor progression via HIF-1alpha/GP78 axis. **Oncogene**, v. 36, n. 47, p. 6555–6567, nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2017.263> Acesso em: 29 abr. 2020.
- LEE, J.H. *et al.* Overexpression of human 27 kDa heat shock protein in laryngeal cancer cells confers chemoresistance associated with cell growth delay. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 133, p. 37–46, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00432-006-0143-3> Acesso em: 12 ago. 2020.
- LEONG, T. A. Critical period for chemoradiotherapy in gastric cancer. **Lancet Oncology**, v. 19, p. 581–583, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30153-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30153-0). Acesso em:13 maio 2021.
- LILLBERG, K. *et al.* Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, n.5, p. 415-423, mar. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aje/kwg002> Acesso em: 29 abr. 2020.
- LIN, T-C. *et al.* Fibronectin in Cancer: Friend or Foe. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 27, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9010027> Acesso em: 14 jun. 2021
- LIOTTA, L. A. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. **Cancer Research**, v. 46, n. 1, p. 1-7, 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2998604/> Acesso em: 05 jun.2020.
- LIU, Z. *et al.* Molecular cloning and characterization of Hsp27.6: The first reported small heat shock protein from *Apis cerana cerana*. **Cell Stress Chaperones**, v. 17, p. 539–551, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0330-x> Acesso em: 29 abr. 2020.
- LI, Y. *et al.* alpha1-antitrypsin promotes lung adenocarcinoma metastasis through upregulating fibronectin expression. **International Journal of Oncology**, v. 50, n. 6, p. 1955–1964, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3962> Disponível em: <https://doi.org/> Acesso em: 18 mar.2020.
- LYONS, A. J. *et al.* Oncofetal fibronectin and oral squamous cell carcinoma. **The British Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 39, n. 6, p. 471-477. Disponível em: <https://doi.org/10.1054/bjom.2001.0702> Acesso em: 05 jun.2020.
- MA, L. J. *et al.* Fibronectin overexpression is associated with latent membrane protein 1 expression and has independent prognostic value for nasopharyngeal

carcinoma. **Tumor Biology**, v. 35, n. 2, p. 1703–1712, fev. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1235-8> Acesso em: 02 abr.2020.

MARGIS, R. *et al.* Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n.1, p. 65-74, abr. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rprs/v25s1/a08v25s1.pdf> Acesso em: 19 jun. 2021.

MARTINELLI, R. *et al.* Psychological stress and cancer: new evidence of an increasingly strong link. **Translational Medicine@UniSa**, v. 23, n. 4, p. 53-57, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.37825/2239-9747.1010> Acesso em: 07 mar.2020.

McEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 33-44, May 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x\(1998\)](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x(1998)) Acesso em: 02 abr. 2020.

MERCHANT, S.; KORBELIK, M. Heat shock protein 70 is acute phase reactant: Response elicited by tumor treatment with photodynamic therapy. **Cell Stress Chaperones**, v. 16, n. 2, p. 153–162, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0227-5> Acesso em: 18 mar.2020.

MEREDITH Jr., J.E.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, M.A. The extracellular matrix as a cell survival factor. **Molecular Biology of the Cell**, v. 1993, n. 9, p. 953-961, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1091/mbc.4.9.953> Acesso em: 29 abr. 2020.

MIRANDA, J. L. **Expressão de proteínas da matriz extracelular em carcinoma epidermóide de lábio inferior e língua**. 2002. 119 f. Tese (Doutorado em Patologia Oral). Departamento de Odontologia da UFRN, Natal-RN, 2002.

MOSCHETTA, M. *et al.* Paclitaxel enhances therapeutic efficacy of the F8-IL2 immunocytokine to EDA-fibronectin-positive metastatic human melanoma xenografts. **Cancer Research**, v. 72, n. 7, p.1814–1824, abr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1919> Acesso em: 05 jun.2020.

MURPHY, M.E. The HSP70 family and cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 6, p. 1181–1188, jun. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt111> Acesso em: 07 mar.2020

MUTSAERS, B. *et al.* Identifying the key characteristics of clinical fear of cancer recurrence: An international Delphi study. **Psycho-Oncology**, v. 29, p.430–436, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pon.5283> Acesso em: 02 abr.2020.

NIKNAMI, Z. *et al.* The association of vimentin and fibronectin gene expression with epithelial-mesenchymal transition and tumor malignancy in colorectal carcinoma. **EXCLI Journal**, v. 16, p. 1009–1017, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.17179/excli2017-481> Acesso em: 29 abr. 2020.

NIU, J.; HUANG, Y.; ZHANG, L. CXCR4 silencing inhibits invasion and migration of human laryngeal cancer Hep-2 cells. **International Journal of Clinical and**

Experimental Pathology, v. 8, n. 6, p. 6255-6261. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26261502/> Acesso em: 18 mar.2020.

NOORDHUIS, P. *et al.* 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annuary of Oncology**, v. 15, n. 7, p. 1025-1032, jul. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh264> Acesso em: 14 jun. 2021.

OGINSKA-BULIK, N.; MICHALSKA, P. The Relationship Between Emotional Processing Deficits and Posttraumatic Stress Disorder Symptoms Among Breast Cancer Patients: The Mediating Role of Rumination. **Journal of Clinical Psychology and Medical Settings**, v. 27, n. 1, p. 11-21, mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10880-019-09606-6>. Acesso em:14 jun. 2021.

OHM, J.E. *et al.* VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. **Blood**, v. 101, n. 12, p. 4878-4886, jun. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-1956> Acesso em: 07 mar.2020

OLIVEIRA, A. L. de *et al.* Avaliação da atividade mitocondrial no processo de morte celular em células tumorais de mama após tratamento com Ciclosporina A e Photosan3®. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p. 193-198, jun. 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-31512013000200009&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 19 jun.2021.

OWENS, L.V. *et al.* Focal adhesion kinase as a marker of invasive potential in differentiated human thyroid cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 3, n. 1, p. 100-105, jan.1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02409059>. Acesso em: 19 jun.2021.

OGURA, A. *et al.* Neoadjuvant (Chemo)radiotherapy With Total Mesorectal Excision Only Is Not Sufficient to Prevent Lateral Local Recurrence in Enlarged Nodes: Results of the Multicenter Lateral Node Study of Patients with Low cT3/4 Rectal Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, p. 33-43, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00032>. Acesso em: 14 jun. 2021.

PERAZELLA, M. A. Drug-induced renal failure: Update on new medications and unique mechanisms of nephrotoxicity. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 325, n. 6, p. 349–362. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00000441-200306000-00006> Acesso em: 02 abr.2020.

PEREIRA, A. L. A. *et al.* O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 1, p. 81-86, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-72992005000100014> Acesso em: 25 jun. 2021.

POSTOW, M. A; CALLAHAN, M. K.; WOLCHOK, J. D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, p. 1974–1982, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4358> Acesso em: 14 jun. 2021.

PRICE, M. A. *et al.* The role of psychosocial factors in the development of breast Carcinoma. Part I - The cancer prone personality. **Cancer**, v. 91, n. 4, p. 679–685, fev. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11241234/> Acesso em: 02 abr.2020.

RABIN, B.S. **Stress, immune function and health: The connection**. New York: Wiley-Liss,1999.

REICHE, E.M.; NUNES, S.O.; MORIMOTO, H.K. Stress, depression, the immune system, and cancer. **The Lancet - Oncology**, v. 5, n. 10, p. 617-625, out. 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01597-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01597-9) Acesso em: 18 mar. 2020.

REUTER, J. A. *et al.* Modeling inducible human tissue neoplasia identifies an extracellular matrix interaction network involved in cancer progression. **Cancer Cell**, v. 15, n. 6, p. 477-488, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.04.002>. Acesso em: 07 mar.2020

RIBEIRO, L.; KAPCZINSK, F. Ansiedade. *In*: KAPCZINSK, F., QUEVEDO, J., IZQUIERDO, I. (org.). **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

RICH, A. M.; READ, P.C. Epithelial-mesenchymal interactions in experimental oral mucosal carcinogenesis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 30, p. 389-397, dez. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2001.300702.x> Acesso em: 02 abr.2020.

RICH, T. *et al.* Elevated serum cytokines correlated with altered behavior, serum cortisol rhythm, and dampened 24-hour rest–activity patterns in patients with metastatic colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 5, p. 1757-1764, mar. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2000> Acesso em: 29 abr. 2020.

SAITO, N.; NISHIMURA, H.; KAMEOKA, S. Clinical significance of fibronectin expression in colorectal cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 1, n. 1, p. 77-81, jan./fev.2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21479381/> Acesso em: 05 jun. 2020.

SAPOLSKY, R.; ROMERO, M.; MUNK, A. How do glucocorticoids influence the stress-response? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, fev. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389> Acesso em: 18 Mar. 2020.

SCHWEIGER, T. *et al.* Stromal expression of heat-shock protein 27 is associated with worse clinical outcome in patients with colorectal cancer lung metastases. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, mar. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120724> Acesso em: 29 abr. 2020.

SEPHTON, S. E. *et al.* Diurnal cortisol rhythm as a predictor of breast cancer survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 12, p. 994-1000, jun. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/92.12.994> Acesso em: 02 abr. 2020.

SERAFIM, T. L. *et al.* New derivatives of lupane triterpenoids disturb breast cancer mitochondria and induce cell death. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6270-6287, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10316/27756> Acesso em: 29 abr. 2020.

SHELBY, J.; KATHRYN, L. Stress and Disease. *In*: HUETHER S.; McCANCE, K. (ed.). **Pathophysiology: The biologic basis for disease in adults and children**. 4. ed. St. Louis: C.V. Mosby, 2001. p. 272-289.

SHERMAN, M. Major heat shock protein Hsp72 controls oncogene-induced senescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1197, p. 152-157, jun. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05196.x> Acesso em: 05 jun.2020.

SHERMAN, M. Y.; GABAI, V. L. Hsp70 in cancer: back to the future. **Oncogene**, v. 34, n. 32, p. 4153-4161, ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2014.349> Acesso em: 07 mar.2020.

SHRESTHA, P. *et al.* Tenascin: growth and adhesion modulation--extracellular matrix degrading function: an in vitro study. **European Journal of Cancer, Part B: Oral Oncology**, v.32B, n. 2, p. 106-113, mar. 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0964-1955\(95\)00074-7](https://doi.org/10.1016/0964-1955(95)00074-7) Acesso em: 29 abr. 2020.

SILVA, W. N. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1809-98232011000300005> Acesso em: 07 mar.2020.

SLACK, J. K. *et al.* Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells. **Oncogene**, v. 20, n. 10, p. 1152-1163, mar. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204208> Acesso em: 18 mar.2020.

SOARES, A. J. A.; ALVES, M. G. P. Cortisol como variável em psicologia da saúde. **Psicologia, saúde e doenças**, v.7, n. 2, p.165-177, 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1822/6926> Acesso em: 29 abr. 2020.

SON, G. H. *et al.* protective role of 27-kDa heat shock protein in glucocorticoid-evoked apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n.4, p.1751-1758, dez. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.152> Acesso em: 02 jun.2020.

SOTTILE, J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1654, n. 1, p. 13-22, mar. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org>

10.1016/j.bbcan.2003.07.002 152 Acesso em: 02 abr.2020.

SOUZA, G. R. *et al.* Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotech**, v. 5, p. 291–296, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.23> Acesso em: 07 mar.2020.

SOUZA-ARAÚJO, C. N. *et al.* Three-Dimensional Cell Culture Based on Magnetic Fields to Assemble Low-Grade Ovarian Carcinoma Cell Aggregates Containing Lymphocytes. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 635, ed. no. 3, 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/cells9030635>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32155738/>. Acesso em: 2 jun. 2021.

SPIEGEL, D.; GIESE-DAVIS, J. Depression and cancer: mechanisms and disease progression. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 269-282, ago. 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(03\)00566-3](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(03)00566-3) Acesso em: 29 abr. 2020.

STEFFENS, S. *et al.* Fibronectin 1 protein expression in clear cell renal cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 3, n. 4, p. 787-790, abr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ol.2012.566>. Acesso em: 29 abr. 2020.

STRAUB, R. O. **Psicologia da saúde**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

THAKER, P. *et al.* Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. **Nature Medicine**, v. 12, p. 939–944, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm1447> Acesso em: 14 jun. 2021.

THOMAS, G.T.; LEWIS, M.P.; SPEIGHT, P.M. Matrix metalloproteinases and oral cancer. **Oral Oncology**, v. 35, n. 3, p. 227-233, maio 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1368-8375\(99\)00004-4](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(99)00004-4). Acesso em: 18 mar.2020.

TOFOLI, S. M. C. **Depressão, estresse precoce, eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e a resposta terapêutica: avaliações psicométricas e psiconeuroendócrinas**. 2013. 181 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Mental) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.17.2016.tde-05112014-083604>. Acesso em: 25 jun. 2021.

TSENG, H. *et al.* Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation. **Tissue Engineering Part C – Methods**, v. 19, n.9, p. 665-675, set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2012.0157>. Acesso em: 18 mar. 2020.

TSENG, H. *et al.* A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation. **Acta Biomaterialia**, v.10, n. 1, p. 173–182, jan. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.003>. Acesso em: 07 mar.2020

VAN MONTFORT, E. *et al.* The relation between psychological profiles and quality of life in patients with lung cancer. **Support Care in Cancer**, v. 28, n. 3, p. 1359–1367, mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00520-019-04923-w>. Acesso em: 02 abr.2020.

WANG, J. F.; PARK, I. W.; GROOPMAN, J. E. Stromal cell-derived factor-1 α stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. **Blood**, v. 95, n. 8, p. 2505-2513, abr. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10753828/> Acesso em: 07 mar.2020.

WANG, Y. J. *et al.* Pterostilbene prevents AKT-ERK axis-mediated polymerization of surface fibronectin on suspended lung cancer cells independently of apoptosis and suppresses metastasis. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 10, n. 1, p. 72, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0441-z>. Acesso em: 29 abr. 2020.

WERNERT, N. The multiple roles of tumor stroma. **Virchows Archive**, v. 430, n. 6, p. 433-43, jun. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s004280050053> Acesso em: 02 jun. 2020.

WILSON, D.F. *et al.* Oral cancer: role of basement membrane in invasion. **Australian Dental Journal**, v. 44, n. 2, p. 93-97, jun.1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1999.tb00207.x>. Acesso em: 18 mar.2020.

WONG, F. H. *et al.* Combination of microarray profiling and protein-protein interaction databases delineates the minimal discriminators as a metastasis network for esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 34, n.1, p. 117–128, jan. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19082484/> Acesso em: 02 abr.2020.

WU, W. *et al.* Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. **Cancer Research**, v. 64, n.5, p. 1757-1764, mar. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2546>. Acesso em: 29 abr. 2020.

YANG, L. *et al.* HSP27: A novel therapeutic target for pediatric M4/M5 acute myeloid leukemia. **Oncology Reports**, v. 29, n. 4, p. 1459–1466, abr. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/or.2013.2274>. Acesso em: 18 mar.2020.

YU, M. *et al.* RNA sequencing of pancreatic circulating tumor cells implicates WNT signaling in metastasis. **Nature**, v. 487, n. 7408, p. 510-513, jul. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11217>. Acesso em:02 abr.2020.

ZHAO, J.; GUAN, J. L. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. **Cancer Metastasis Review**, v. 28, n. 1-2, p. 35-49, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9165-4>. Acesso em: 18 Mar. 2020

ZHU, Z. *et al.* Silencing heat shock protein 27 decreases metastatic behavior of human head and neck squamous cell cancer cells in vitro. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 4, p. 1283–1290, ago. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/mp100073s>. Acesso em: 29 abr. 2020.

ZIDAR, N. *et al.* Expression of tenascin and fibronectin in benign epithelial hyperplasic lesions and squamous cell carcinoma of the larynx. **Anticancer Research**, v. 21, n. 1A, p. 451-454, jan./fev. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11299778/> Acesso em: 02 abr. 2020.

ZOU, X. *et al.* Microvesicles derived from human Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells ameliorate renal ischemia-reperfusion injury in rats by suppressing CX3CL1. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 5, n. 2, p. 40, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12928-014-0248-2> Acesso em: 18 mar. 2020

REFERÊNCIA CONSULTADAS

ANTONI, M. H. *et al.* The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 3, p. 240-248, mar. 2006. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nrc1820> Acesso em: 24 ago. 2020.

BOTARGUES, M.; ENZ, P.; MUSSO, C. Nota farmacológica: tratamento con corticoides. **Evidencia: Actualización en la Práctica Ambulatoria**, v. 14, n. 1, p. 33-36, 2011. Disponível em: <https://www.fundacionmf.org.ar/files/11.pdf> Acesso em: 02 abr.2020.

FONSECA, M. O.; GODOI, B. H.; SILVA, N. S.; SOARES, C. P. Evaluation of the effect of hydrocortisone in 2D and 3D HEp-2 cell culture **bioRxiv**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2021.03.26.437247> Acesso em: 29 abr. 2020.

GIL, E. S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2 ed. rev. São Paulo: Pharmabooks, 2008. 486 p.

RUETER, M. A.; SCARAMELLA, L; WALLACE, L. E.; CONGER, R. D. First onset of depressive or anxiety disorders predicted by the longitudinal course of internalizing symptoms and parent-adolescent disagreements. **Archives of General Psychiatry**, v. 56, n. 8, p. 726-732, ago.1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archpsyc.56.8.726> Acesso em: 07 mar. 2020.

SILVA, C. M. *et al.* Wettability and Morphological Characterization of a Polymeric Bacterial Cellulose / corn Starch Membrane. **Materials Research**, São Carlos, v. 18, Supl. 2, p. 109-113, dez. 2015. Disponível em: 2015 <http://dx.doi.org/10.1590/1516-1439.351214> Acesso em: 02 abr.2020.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2005.

SIMÕES, S. S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIR e calibração multivariada**. 2008. 83f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - UFPB/CCEN, 2008. Disponível em: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=104889 Acesso em: 18 mar.2020.

THIOLLENT, M. **Metodologia da pesquisa-ação**. São Paulo: Cortez, 1988.

THORUP, A. K. *et al.* Can alterations in integrin and laminin-5 expression be used as markers of malignancy? *APIMIS*, v. 106, n. 12, p. 1170-1180, dez. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1998.tb00274.x>. Acesso em: 02 abr.2020.

TOIVANEN, H. Occupational stress in working women and the benefits of relaxation training: studies on bank employees, home helps and hospital cleaners. 1994. 105 f. Tese (Doutorado). Universidade de Kuopio, Finlândia, 1994. Disponível em: <https://oula.finna.fi/oamk/Record/oy.993752073906252?lng=en-gb> Acesso em: 07 mar.2020.

TOSIOS, K. I.; KAPRANOS, N.; PAPANICOLAOU, S. I. Loss of basement membrane components laminin and type IV collagen parallels the progression of oral epithelial neoplasia. **Histopathology**, v. 33, n. 3, p. 261-268, set.1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1998.00452.x>. Acesso em: 02 abr.2020.

VINCI, M *et al.* Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biology**, v. 10, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-29> Acesso em: 29 abr. 2020.