

UNIVERSIDADE PAULISTA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO E REGULAÇÃO POR microRNAs
DA PROTEÍNA TNFAIP2 NAS CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO
APÓS INTERAÇÕES COM MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

DÉBORA DE OLIVEIRA MARES SILVESTRO

SÃO PAULO

2023

DÉBORA DE OLIVEIRA MARES SILVESTRO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO E REGULAÇÃO POR microRNAs
DA PROTEÍNA TNFAIP2 NAS CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO
APÓS INTERAÇÕES COM MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Cristina Perez Hurtado

SÃO PAULO

2023

Silvestro, Débora de Oliveira Mares.

Estudo da expressão e regulação por microRNAs da proteína Tnfaip2 nas células de adenocarcinoma mamário murino após interações com macrófagos / Débora de Oliveira Mares Silvestro. - 2023.

82 f. : il. color.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2023.

Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.

Orientadora: Prof. Dr. Elizabeth Cristina Perez Hurtado.

1. Câncer de mama. 2. Fagócitos. 3. Comunicação intercelular. 4. Nanotubos de tunelamento. 5. Extensões citoplasmáticas. 6. M-Sec. 7. Mecanismos epigenéticos. I. Hurtado, Elizabeth Cristina Perez (orientadora). II. Título.

DÉBORA DE OLIVEIRA MARES SILVESTRO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO E REGULAÇÃO POR microRNAs DA
PROTEÍNA TNFAIP2 NAS CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA
MAMÁRIO MURINO APÓS INTERAÇÕES COM MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____
Prof.^a Dr.^a Elizabeth Cristina Perez Hurtado
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof. Dr. Mario Costa Cruz
USP

_____/_____/_____
Prof. Dr. Wagner Luiz Batista
UNIFESP

_____/_____/_____
Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof.^a Dr.^a Anuska Marcelino Alvares Saraiva
Universidade Paulista – UNIP

Dedico esse trabalho à minha família!

Em especial à minha avó materna Iracema de Oliveira, que faleceu de câncer de mama, aos 38 anos de idade.

Aos meus pais Kleber e Cleusa Mares (*in memoriam*) pelo amor que me dedicaram.
Ao meu marido Paolo Silvestro pelo incentivo, apoio e paciência nessa fase da minha vida.

À minha filha Mariam e meu neto Lorenzo Navarro para que possam vivenciar o avanço contínuo e maior valorização da ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade e capacidade de enxergar a grandiosidade da vida através da ciência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista (UNIP) pela bolsa que propiciou a realização do doutorado e concretização de um sonho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado pelos ensinamentos, generosidade, apoio, dedicação e paciência nessa jornada.

Aos professores da Pós-Graduação da UNIP que enriqueceram de inúmeras formas o meu trabalho.

Ao professor Mário Cruz da USP pela contribuição no projeto e delineamento experimental do meu estudo.

Aos meus colegas e funcionários da UNIP, por toda disposição e cooperação.

“Os nossos conhecimentos são a reunião do raciocínio e experiência de numerosas mentes”

(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

Nanotubos de tunelamento (TNTs) são pontes citoplasmáticas que medeiam interações entre diferentes tipos celulares. No câncer, o aumento de TNTs está diretamente relacionado com a aquisição de maior potencial agressivo pelas células tumorais. Estudos recentes com macrófagos mostraram que a formação dos TNTs está associada de forma direta ao aumento da proteína Tnfaip2, entretanto nas células tumorais essa associação não foi investigada por completo. Assim, uma vez que macrófagos presentes no microambiente tumoral interagem direta ou indiretamente com células tumorais e participam ativamente de todas as etapas da tumorigênese, o intuito do presente estudo foi avaliar a expressão e regulação epigenética da proteína Tnfaip2 nas células de adenocarcinoma mamário antes e após interações com macrófagos. Para isto, células de adenocarcinoma mamário 4T1 (células 4T1) cultivadas sozinhas ou, com macrófagos RAW 264.7 ou com seu sobrenadante, mantidas por 12, 24 e 48 horas, foram submetidas a análises por microscopia de luz e citometria de fluxo para determinação do número de estruturas tipo TNTs e, quantificação da expressão da proteína Tnfaip2, respectivamente. Em paralelo, coculturas de macrófagos e células 4T1 após 48 h, foram submetidas à separação por *cell sorter*, para análises da expressão gênica do *Tnfaip2* em ambas as células, por qPCR. Adicionalmente, foram realizadas análises da expressão de transcritos de sete microRNAs (miR-221, miR-184, miR-145, miR-7066^{NEW}, miR-5107^{NEW}, miR-3569^{NEW} e miR-3103^{NEW}) envolvidos na regulação da expressão de Tnfaip2. Os dados aqui obtidos demonstraram aumento expressivo de projeções citoplasmáticas tipo TNTs nos cocultivos de células 4T1 com macrófagos, com reduzida expressão da proteína Tnfaip2 em células 4T1 após interações com macrófagos. Em contraste, análises de expressão gênica mostraram aumento dos transcritos de *Tnfaip2* e dos microRNAs avaliados nas células 4T1 após interação com macrófagos. Em paralelo, análises de *wound healing* sugerem diminuição na capacidade migratória das células 4T1 também após contato com macrófagos. Em conjunto, os resultados aqui apresentados sugerem que interações físicas com macrófagos induzem menor potencial agressivo das células 4T1, mediado provavelmente pela expressão de microRNAs envolvidos na regulação pós-transcricional da proteína Tnfaip2, gene envolvido com progressão celular e metástases.

Palavras-chave: câncer de mama, fagócitos, comunicação intercelular, nanotubos de tunelamento, extensões citoplasmáticas, M-Sec, mecanismos epigenéticos.

ABSTRACT

Tunneling nanotubes (TNTs) are cytoplasmic bridges that mediate interactions between different cell types. In cancer, the increase in TNTs is directly related to the acquisition of greater aggressive potential by tumor cells. Recent studies with macrophages have shown that the formation of TNTs is directly associated with the increase in the Tnfaip2 protein, however in tumor cells this association has not been fully investigated. Thus, since macrophages present in the tumor microenvironment directly or indirectly interact with tumor cells and actively participate in all stages of tumorigenesis, the aim of the present study was to evaluate the expression and epigenetic regulation of the Tnfaip2 protein in breast adenocarcinoma cells before and after interactions with macrophages. For this, 4T1 mammary adenocarcinoma cells (4T1 cells) cultured alone or with RAW 264.7 macrophages or their supernatant, maintained for 12, 24 and 48 hours, were submitted to analysis by light microscopy and flow cytometry to determine the number of TNTs-like structures and quantification of Tnfaip2 protein expression, respectively. In parallel, cocultures of macrophages and 4T1 cells after 48 h were subjected to separation by cell sorter, for analysis of Tnfaip2 gene expression in both cells, by qPCR. Additionally, analysis of the expression of transcripts of seven microRNAs (miR-221, miR-184, miR-145, miR-7066^{NEW}, miR-5107^{NEW}, miR-3569^{NEW} e miR-3103^{NEW}) involved in the regulation of Tnfaip2 expression were performed. The data obtained here demonstrate a significant increase in TNTs-like cytoplasmic projections in co-cultures of 4T1 cells with macrophages, with reduced expression of the Tnfaip2 protein in 4T1 cells after interactions with macrophages. In contrast, gene expression analyzes showed an increase in Tnfaip2 transcripts and microRNAs evaluated in 4T1 cells after interaction with macrophages. In parallel, wound healing analyzes suggest a decrease in the migratory capacity of 4T1 cells also after contact with macrophages. Together, the results presented here suggest that physical interactions with macrophages induce a lower aggressive potential of 4T1 cells, probably mediated by the expression of microRNAs involved in the post-transcriptional regulation of the Tnfaip2 protein, a gene involved in cell progression and metastasis.

Keywords: breast cancer, phagocytes, intercellular communication, tunneling nanotubes, cytoplasmic extensions, M-Sec, epigenetic mechanisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura representativa 1 - Nanotubo de tunelamento.....	22
Figura representativa 2 – Mecanismos de formação dos TNTS.....	23
Figura representativa 3 – Funções e mecanismos de interações da proteína TNFAIP2.....	24
Figura representativa 4 - Biogênese canônica de microRNAs	26
Figura 5 – Padronização final de culturas celulares para caracterização e quantificação de nanotubos.....	41
Figura 6 - Quantificação de prolongamentos citoplasmáticos tipo TNTs.....	43
Figura 7 – Análise da expressão da proteína Tnfaip2 em células de adenocarcinoma mamário 4T1 durante cocultivos.. ..	45
Figura 8 - Análise da expressão da proteína Tnfaip2 em macrófagos durante cocultivos.. ..	46
Figura 9 - Avaliação dos níveis de expressão do gene Tnfaip2 em células de adenocarcinoma mamário 4T1 após cocultivos.....	47
Figura 10 - Avaliação dos níveis de expressão do gene Tnfaip2 em macrófagos após cocultivos.	49
Figura 11 - Análise da expressão de microRNAs reguladores da proteína Tnfaip2 em células 4T1.....	51
Figura 12 - Análise da expressão de microRNAs reguladores da proteína Tnfaip2 em macrófagos.....	53
Figura 13 - Correlação entre a expressão dos transcritos de microRNAs com a expressão da proteína Tnfaip2 nas células tumorais 4T1.....	55
Figura 14 - Análise da expressão dos transcritos das enzimas e proteínas envolvidas na biogênese de microRNAs em células 4T1.....	56
Figura 15 - Análise da expressão dos transcritos das enzimas e proteínas envolvidas na biogênese de microRNAs em macrófagos.	58
Figura 16 – Análise da capacidade de migração das células 4T1 após interações com macrófagos.....	60
Figura 17 – Análise do perfil de citocinas durante cocultivos de células tumorais 4T1 e macrófagos.....	61
Figura 18 - Esquema dos resultados obtidos.	69
Figura 19 - Purificação de células de adenocarcinoma mamário 4T1 após cocultivo com macrófagos.....	79
Figura 20 - Estratégias de gates utilizadas para análise da proteína Tnfaip2.....	79

Figura 21 - Segunda padronização de culturas celulares para caracterização e quantificação de nanotubos.....	80
Figura 22 - Quarta padronização de culturas celulares para caracterização e quantificação de nanotubos.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise epidemiológica da prevalência e mortalidade de câncer no mundo.....	19
Gráfico 2 - Análise epidemiológica da incidência e mortalidade de câncer de mama no mundo..	20
Gráfico 3 – Representação do delineamento Experimental.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica.....	35
Tabela 2 - microRNAs analisados por possível regulação na expressão da proteína Tnfaip2.	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% – por cento

4T1 – célula de adenocarcinoma mamário 4T1

µg/mL – micrograma por mililitro

µL – microlitro

°C – grau Celsius

µm – micrômetro

ANOVA – análise de Variância

AGO – *argonaute proteins*

BSA – *bovine serum albumin*

CCL2 – *CC motif chemokine ligand 2*

CD – *cluster of differentiation*

cDNA – *complementary DNA*

CH3 – grupamento Metil

Cm - centímetros

CO₂ – *carbon dioxide*

CpG – *cytosine-phosphate-guanine*

DEPC – água tratada com Dietil Pirocarbonato

DNA – *deoxyribonucleic acid*

dt - *desoxitimidinas*

DTT – dithiothreitol

Dntp - desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*

EMT – *epithelial-mesenchymal transition*

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h - horas

H₂O – água

IFN- γ – *Interferon gama*

IL-1β – *Interleukin 1 beta*

IL-6 – *Interleukin 6*

IL-10 - *Interleukin 10*

IL-12p70 - *Interleukin 12*

LPS- lipopolissacarídeo
LncRNA – *long non-coding RNA*
kDa – kilodalton
MAT – microambiente tumoral
MCP-1 - *monocyte chemotactic protein-1*
MFI – *mean Fluorescence intensity*
Min - minutos
miRNA – *microRNA*
mL – mililitros
mmol/L – milimoles por litro
MO – macrófagos RAW 264.7
mRNA – *messenger RNA*
ncRNA – *non-coding RNA*
ng – nanograma
nM – nanômetro
nt - nucleotídeos
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – *phosphate-buffered saline*
PCR – *polymerase chain reaction*
pH – *hydrogen potential*
Pre-miRNA – *precursor microRNA*
Pri-miRNA – *primary microRNA*
PS – *pós sorting*
qPCR – *real Time Quantitative PCR*)
RISC – *RNA-induced silencing complex*
RNA – *ribonucleic acid*
RNase - *ribonuclease*
RPM – *revolutions per minute*
rRNA – *ribosomal RNA*
s - seconds
SFB – soro fetal bovino
siRNA – *small interfering RNA*
SN - *supernatant*
TAMs – *tumor-associated macrophages*

TNF α - *tumor necrosis factor alpha*

Tnfaip2 – *tumor necrosis factor alpha-induced protein 2*

TNTs – *tunneling nanotubes*

TPA – *tissue-type plasminogen activator*

tRNA – *transfer RNA*

UTR – *untranslated region*

xg – *força G*

Δ Ct – *limiar do ciclo delta*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:	19
2. OBJETIVOS:	27
2.1. OBJETIVOS GERAIS:	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	27
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. CULTURA DE CÉLULAS	29
4.1.1. <i>Coculturas</i>	29
4.1.2. <i>Monoculturas</i>	30
4.1.3. <i>Monoculturas com meio condicionado com sobrenadante celular</i>	30
4.2. VIABILIDADE CELULAR	31
4.3. CONTAGEM DE ESTRUTURAS TIPO NANOTUBOS DE TUNELAMENTO	31
4.4. SEPARAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO (<i>CELL SORTER</i>)	31
4.5. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TNFAIP2 POR CITOMETRIA DE FLUXO	32
4.6. ENSAIOS PARA ANÁLISE DE BIOLOGIA MOLECULAR.	33
4.6.1. <i>Extração de RNA total</i>	33
4.6.2. <i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	34
4.6.3. <i>Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real (q-PCR)</i>	34
4.6.4. <i>Análise da expressão de miRNAs</i>	36
4.7. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	37
4.8. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS DO KIT <i>INFLAMMATION</i>	38
4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
5. RESULTADOS	39
5.1. PADRONIZAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES E PROPORÇÕES CELULARES PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS.....	39
5.2. CONTAGEM DE EXTENSÕES CITOPASMÁTICAS TIPOS TNTs	42
5.3. ANÁLISES DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TNFAIP2 EM CÉLULAS TUMORAIS 4T1 E MACRÓFAGOS	44
5.3.1. <i>Células 4T1</i>	44

5.3.2. <i>Macrófagos</i>	45
5.4. EXPRESSÃO DO GENE <i>TNFAIP2</i> EM CÉLULAS TUMORAIS 4T1 E MACRÓFAGOS APÓS COCULTIVOS	46
5.4.1. <i>Células 4T1</i>	47
5.4.2. <i>Macrófagos</i>	48
5.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNAs COMO POSSÍVEL MECANISMO ENVOLVIDO NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DE <i>TNFAIP2</i>	50
5.5.1. <i>Células 4T1</i>	50
5.9.2. <i>Macrófagos</i>	52
5.6. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MICRORNAs COM A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA <i>TNFAIP2</i> NAS CÉLULAS 4T1	54
5.7. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ENZIMAS E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA BIOGÊNESE DE MICRORNAs EM CÉLULAS 4T1 E MACRÓFAGOS.	56
5.11.1. <i>Células 4T1</i>	56
5.11.2. <i>Macrófagos</i>	57
5.8. ANÁLISE DA CAPACIDADE MIGRATÓRIA DE CÉLULAS 4T1 APÓS INTERAÇÕES COM MACRÓFAGOS	59
5.9. ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINAS DURANTE COCULTIVOS DE CÉLULAS 4T1 COM MACRÓFAGOS.	60
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	69
8. PERSPECTIVAS	70
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
10. MATERIAL SUPLEMENTAR	78
10.1. PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO 4T1 PELA TÉCNICA DE <i>CELL SORTER</i> APÓS COCULTIVO COM MACRÓFAGOS.....	78
10.2. ESTRATÉGIAS DE <i>GATES</i> UTILIZADAS NA CITOMETRIA DE FLUXO PARA ANÁLISE DA PROTEÍNA <i>TNFAIP2</i>	79

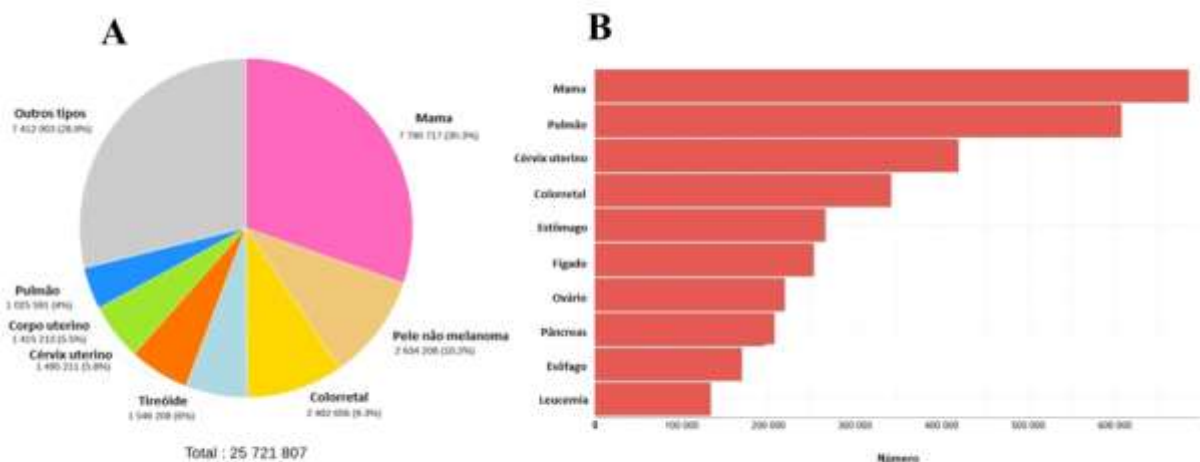
1. INTRODUÇÃO:

A neoplasia mamária é o tumor mais prevalente na população feminina, representando aproximadamente 30% dos casos diagnosticados de câncer (Gráfico 1 A), sendo considerada a maior causa de óbitos por câncer no mundo nessa população (Gráfico 1 B), com estimativas de aproximadamente 1 milhão de novos casos e 320 mil mortes até o ano de 2040 (Gráfico 2) (1).

Assim como na medicina humana, na veterinária, o câncer de mama é o tumor de maior prevalência entre as fêmeas caninas, representando aproximadamente 52% dos diagnósticos de câncer nessa espécie (2). Devido a sua alta incidência, que é três vezes maior que em humanos e, pelas maiores taxas de malignidade que chegam a 50% dos casos, a doença é considerada um sério problema veterinário em todo o mundo (2,3).

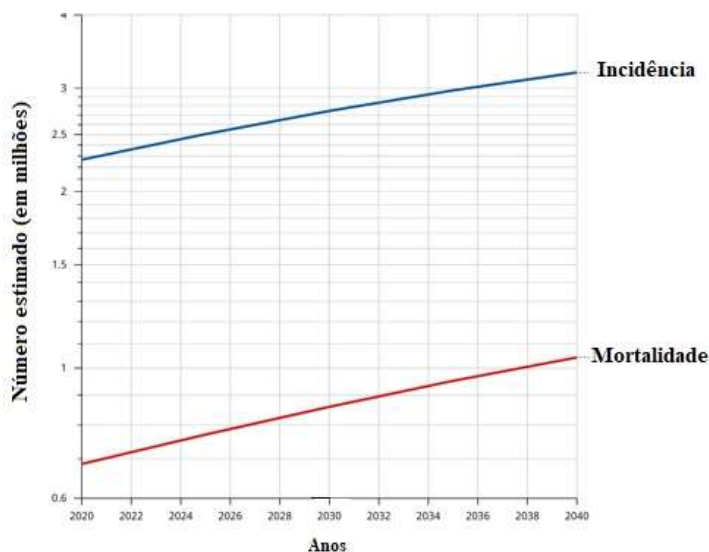
São inúmeros os impactos psicossociais envolvidos no diagnóstico do câncer tanto em humanos e seus familiares, como em cães e seus tutores (4,5). Os tumores de mama dessas espécies compartilham muitas semelhanças entre eles, possuindo uma vasta comunhão de interesses e oportunidades de proveitosa interação entre ambas (6).

Gráfico 1 – Análise epidemiológica da prevalência e mortalidade de câncer no mundo. A: Número estimado da prevalência de casos de câncer no mundo, últimos 5 anos, considerando mulheres de todas as idades, 2020. **B:** Número estimado de mortes por câncer no mundo (excluindo câncer de pele não melanoma), considerando mulheres de todas as idades, 2020.



Fonte: Adaptado de Global Cancer Observatory-World Health Organization, 2020

Gráfico 2 - Análise epidemiológica da incidência e mortalidade de câncer de mama no mundo.
Número estimado da incidência x mortalidade por câncer de mama no mundo, considerando mulheres de todas as idades, período de 2020 a 2040.



Fonte: Adaptado de Global Cancer Observatory-World Health Organization, 2020

O câncer de mama possui ampla heterogeneidade, com vários subtipos, aspectos histológicos distintos e repostas terapêuticas variadas (7). O tipo de neoplasia mamária mais comum em mulheres é o carcinoma, que se origina a partir de células epiteliais e normalmente acomete ductos ou lóbulos mamários (8). O carcinoma é classificado como invasivo quando ultrapassa o tecido de origem e acomete tecidos adjacentes, podendo se disseminar para outras partes do corpo formando metástases (7).

Uma neoplasia maligna se origina a partir de um crescimento desordenado de uma população clonal de células, que acumulam alterações genéticas herdadas ou adquiridas e passam a exibir algumas características biológicas comuns, que as diferem das células normais (9,10). Uma das características inerentes às células com fenótipo oncogênico é a capacidade de evasão da resposta imunológica (9).

Estudos ressaltam que a comunicação das células tumorais com o ambiente que estão inseridas estabelecem uma combinação de diversos fatores favoráveis à aquisição de um fenótipo mais agressivo (11).

No microambiente tumoral (MAT), os macrófagos são células do sistema imunológico presentes em maior quantidade, podendo representar entre 5 a 40 % da massa total dos tumores sólidos (12,13). Macrófagos associados ao tumor (TAMs – do inglês *tumor associated macrophages*) participam ativamente de todas as etapas da tumorigênese, seja inibindo ou favorecendo a progressão tumoral, a depender do perfil de ativação adquirido em resposta aos estímulos microambientais que recebem (14–16).

Os macrófagos são células com alta plasticidade e podem se polarizar em dois grupos fenotipicamente distintos: perfil M1 (pró-inflamatório) e perfil M2 (imunossupressor) (17). Estudos demonstram que maior prevalência de macrófagos com perfil regulatório (M2) no microambiente tumoral, correlaciona-se com maior agressividade e alto poder de formar metástases, enquanto que a presença de macrófagos com perfil inflamatório (M1) favorece ampla capacidade tumoricida (14,18–20).

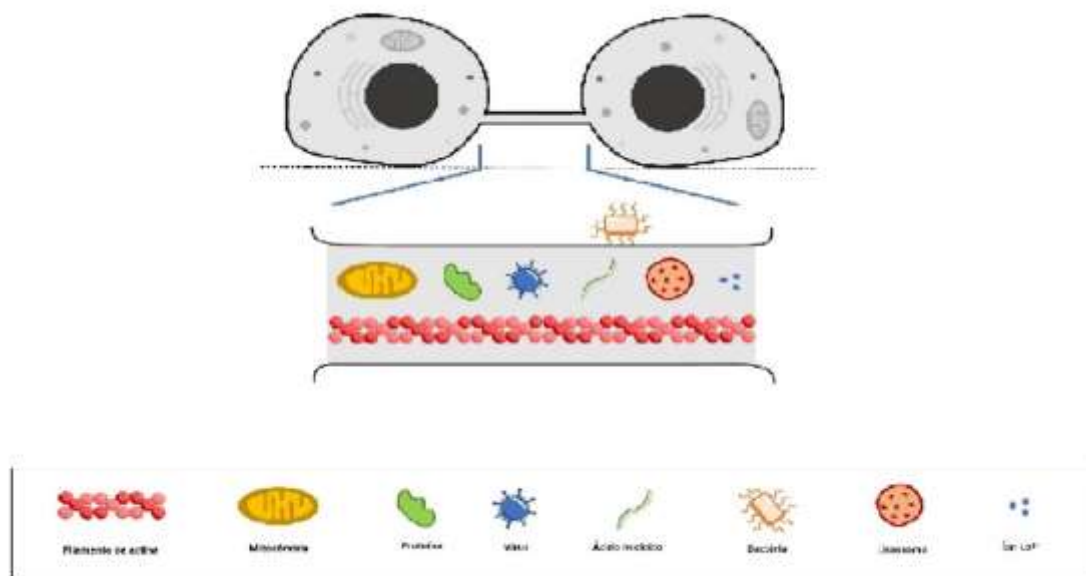
Estudo prévio do nosso grupo, que teve como objetivo avaliar os efeitos das interações de células tumorais 4T1 sobre macrófagos, demonstrou que o perfil fenotípico e capacidade funcional dos macrófagos foram modulados de formas distintas, dependendo do tipo de interação com as células tumorais (21). Assim, o contato com fatores solúveis liberados por células 4T1 presentes em meio condicionado, induziu nos macrófagos, aumento da expressão de marcadores do perfil M1 (CD80/CD86), maior produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-6), redução da capacidade fagocítica, sem alteração do potencial microbicida. Já o contato físico com células 4T1 induziu nos macrófagos a expressão mista de marcadores do perfil M1 (CD80/CD86, CD40 e iNos) e M2 (CD206 e IL-10), redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-10), aumento da capacidade fagocítica, redução do potencial microbicida e, presença marcada de projeções citoplasmáticas tipo TNTs (do inglês *tunneling nanotubes*) que conectavam os dois tipos celulares à longa distância (21).

Interações entre os componentes celulares e moleculares ocorrem constantemente no microambiente tumoral, influenciando os parâmetros de manutenção e estabilidade das células neoplásicas (10). Dentre os vários tipos de comunicações celular, destaca-se a recém descrita via dos nanotubos de tunelamento (TNTs), relatada em 2004 por Rustom et al (22).

TNTs são projeções transitórias da membrana, capazes de conectar células vizinhas ou distantes, estabelecendo conexão entre os citoplasmas (23). Todas as células podem utilizar essa via de comunicação, podendo diferir em sua morfologia e composição dependendo do tipo celular (24). São predominantemente compostos por filamentos de actina, podendo conter ou não tubulina, envoltos por membrana plasmática e, *in vitro* não aderem ao substrato (23). Seus diâmetros variam entre 50-700 nm (média 200 nm) e comprimento de dezenas a centenas de

mícrons (média de 20 a 100 μm) (23). Podem transportar bidireccionalmente diversos elementos como vesículas, estímulos elétricos, moléculas, organelas, mRNA, miRNA, além de patógenos (25,26), conforme Figura representativa 1.

Figura representativa 1 - Nanotubo de tunelamento

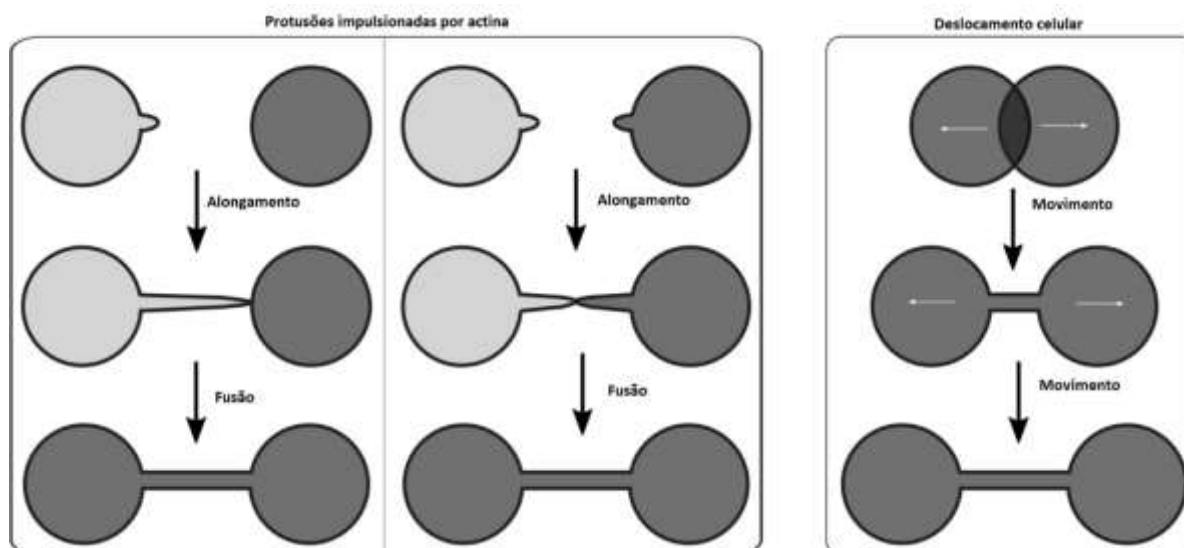


Fonte: Adaptado de Trends in Câncer, 2020, Volume 6, Edição 10

Os TNTs estão presentes em processos fisiológicos e patológicos (22,25,26). Atualmente vêm sendo associados à transmissão e disseminação de diversas doenças, sendo estimulados por estresse e processos inflamatórios (23). No desenvolvimento de neoplasias têm papéis importantes na invasão tumoral, metástases e na resistência às terapias antitumorais (27).

Os mecanismos envolvidos na formação dos TNTs ainda não são completamente conhecidos, embora estudos indiquem duas possíveis formas de iniciação dos TNTs, conforme Figura representativa 2 (28,29). Uma delas é a partir de filopódios que se projetam de uma ou das duas células para se fundirem, e outra quando células em contato direto se deslocam, mantendo a conexão entre elas via nanotubos de tunelamento (28,29).

Figura representativa 2 – Mecanismos de formação dos TNTs.



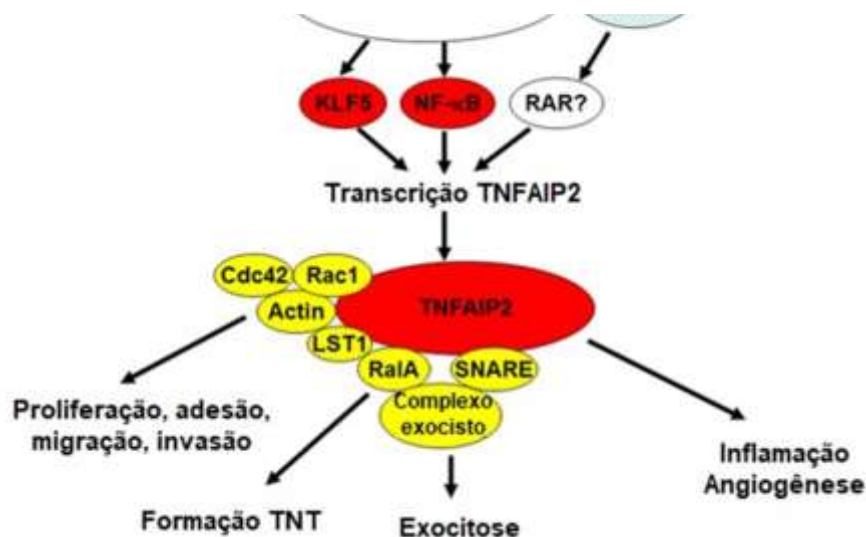
Adaptado de ro-journal.biomedcentral, 2019/ <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1416-8>

Na atualidade não existem marcadores TNT específicos, no entanto foi demonstrado que nas interações entre macrófagos e células neoplásicas, a proteína TNFAIP2 (do inglês *Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2*), também chamada de M-Sec ou B94, está diretamente envolvida na formação de nanotubos de tunelamento (30,31). Os principais componentes da família TNFAIP incluem TNFAIP1, TNFAIP2, TNFAIP3, TNFAIP4, TNFAIP5, TNFAIP6, TNFAIP8 e TNFAIP9, sendo alvos ativos e induzidos pelo fator de necrose tumoral alfa, com propriedades e funções biológicas distintas (32,33).

TNFAIP2 é uma proteína com 654 aminoácidos e peso molecular de 73 kDa (32). Além do TNF pode ser estimulada por outras citocinas como IL-1 β e IFN- γ , juntamente com ativador de plasminogênio tecidual (TPA) e Lipopolissacarídeo (LPS) (34). Sua expressão é regulada por diversos fatores de transcrição e vias de sinalização, incluindo NF- κ B, KLF5 e ácido retinóico (34), conforme Figura representativa 3. A proteína TNFAIP2 está localizada principalmente no citosol e aparelho de Golgi e adicionalmente no núcleo, membrana nuclear e em saliências de membrana à base de actina (34). Interage com diversas proteínas, participando de processos fisiológicos como inflamação, angiogênese diferenciação celular e apoptose, assim como na regulação do citoesqueleto de actina e formação de protrusões de membrana, promovendo proliferação, migração e invasão de células cancerosas, além de facilitar a transição epitélio-mesenquimal (EMT – Epithelial-Mesenchymal transition) (32,35,36). Entretanto, a participação dessa proteína na formação de TNTs nas células tumorais

ou os mecanismos de regulação da sua expressão nessas células, ainda não estão completamente esclarecidos.

Figura representativa 3 – Funções e mecanismos de interações da proteína TNFAIP2



Adaptado de J Cellular Molecular Medi, V22, I11, 2018.

Já têm sido amplamente descrito que a regulação da expressão gênica de diversas proteínas são influenciadas em grande parte por processos epigenéticos, os quais ocorrem de forma independente de mudanças na sequência DNA codificante e podem ser herdáveis na divisão celular (37). Os processos epigenéticos são dinâmicos, em sua maioria reversíveis, sofrem influência externa e, podem levar a mudanças fenotípicas que podem ou não ser transmitidas a outras gerações (37,38).

No desenvolvimento, marcas epigenéticas nos cromossomos estão associadas com os processos de transcrição e tradução gênica, resultando na ativação ou desligamento de um gene em certos tecidos, que a sua expressão se faz ou não necessária (39,40). Na carcinogênese, as alterações epigenéticas podem provocar instabilidade cromossômica, ativação de oncogenes, inativação de genes de reparo e silenciamento de genes supressores tumorais (41–43).

Os principais e mais estudados mecanismos epigenéticos envolvem metilação do DNA, modificações covalentes de histonas e RNAs não codificantes incluindo microRNAs (miRNA) que regulam quais informações genéticas podem ser acessadas pela maquinaria

celular (42).

A metilação do DNA ocorre por ação de enzimas, com adição de um grupo metil (CH₃) quase exclusivamente no carbono 5 da base nitrogenada citosina seguida por guanina, nos dinucleotídeos CpG dos mamíferos, principalmente nas ilhas CpGs associadas aos promotores gênicos (42). A metilação do DNA pode inibir a ligação de fatores de transcrição nessas regiões, conseqüentemente inviabilizando a transcrição e expressão desses genes (44).

Histonas são proteínas globulares que se associam ao DNA compactando-o para formar os nucleossomos (45). As modificações das histonas ocorrem por ação de enzimas, com adição ou subtração de grupos covalentemente anexados em diversos resíduos específicos das caudas N- terminais flexíveis, sendo as principais reações estudadas: metilação, acetilação, fosforilação e ubitiquinação (45). Diversas combinações e códigos dessas modificações determinam as propriedades estruturais da cromatina e interações com proteínas não-histonas, regulando processos biológicos como transcrição, replicação e reparo celular (46)

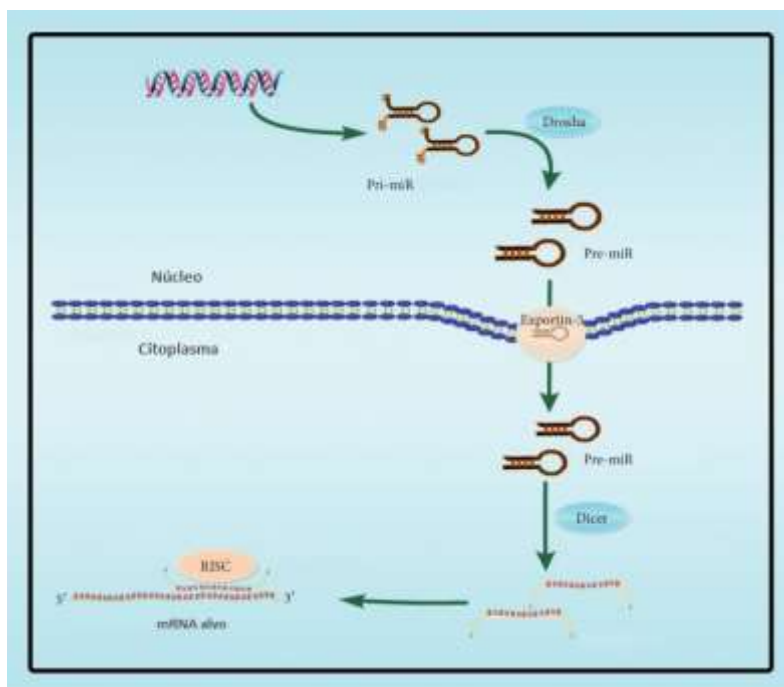
Aproximadamente 98% de nosso DNA são de regiões que não codificam proteínas (cis/trans, íntrons, pseudogenes, sequências repetidas e telômeros), no entanto, somente na última década descobriu-se que desse total, cerca de 80% são biologicamente ativos e grande parte pode ser transcrita em RNAs não codificantes (ncRNAs), com funções ainda pouco conhecidas (47–49).

Existem diversas subclasses de RNAs não codificantes, abundantemente compostas por RNAs ribossomais (rRNAs) e RNAs de transferência (tRNAs), classificados como ncRNAs de manutenção, além de uma fração menor de RNAs longos (lncRNAs) com mais de 200 nucleotídeos (nt), RNAs pequenos de interferência (siRNA) com 18-200 nt e microRNAs (miRNAs) com 20-24 nt, classificados como ncRNAs regulatórios (49,50).

A biogênese dos microRNAs envolve diversas etapas e acontece por duas vias: canônica ou não canônica, sendo a canônica a via dominante no processamento dos microRNAs. Nessa via em suma, microRNAs primários (pri-miRNA) são transcritos a partir de sequências de DNA codificadoras longas (500-3000 nt) pela RNA polimerase (51). Subseqüentemente no núcleo, a enzima ribonuclease Drosha separa a estrutura haste-alça para formar o microRNA precursor (pre-miRNA) em forma de grampo (70 nt) (51). O pre-miRNA é então exportado ao citoplasma pela enzima Exportina-5 para ser clivado pela enzima Dicer e se tornar um microRNA maduro de fita simples (~22 nt), que se liga a um complexo de proteínas Argonauta (AGO), formando o complexo silenciador RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*) (51), conforme Figura representativa 4. Esses complexos podem ligar-se a RNAs mensageiros (mRNA) alvos, por complementariedade em grande maioria na região 3'

UTR, impedindo sua tradução e consequentemente resultando em sua degradação (52).

Figura representativa 4 - Biogênese canônica de microRNAs



Fonte: Adaptado de Journal of Oncology, 2019: 7252013.

Uma vez que os microRNAs são capazes de regular diversas funções biológicas relacionadas à proliferação, diferenciação celular, migração, metabolismo e apoptose, eles têm sido também correlacionados com diversas doenças, incluindo o câncer, tornando-os uma abordagem atraente para diagnóstico e direcionamento terapêutico (43,53,54).

Contudo, sabendo que os mecanismos epigenéticos podem modular a transcrição e tradução de proteínas, e que a proteína Tnfaip2 pode ser crucial para formação de TNTs, os quais estão envolvidos na progressão tumoral, o estudo da expressão da proteína Tnfaip2 e os mecanismos de regulação da sua expressão envolvendo microRNAs nas células cancerosas podem contribuir na prevenção da aquisição de fenótipos tumorais mais agressivos.

JUSTIFICATIVA:

Diante da relevante participação dos nanotubos de tunelamento na comunicação entre células tumorais e macrófagos, e seu envolvimento na aquisição de fenótipo mais agressivo pelas células neoplásicas, é importante compreender os mecanismos envolvidos na

sua formação e regulação. Assim, uma vez que o aumento da expressão da proteína Tnfaip2 foi associado com maior formação de TNTs em macrófagos, o estudo da expressão desta proteína e os possíveis mecanismos de regulação nas células tumorais, podem contribuir na descoberta de novos alvos terapêuticos para prevenção ou diminuição da doença metastática, que é letal na maioria dos cânceres incluindo o de mama.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivos gerais:

Verificar a presença de projeções citoplasmáticas tipo TNTs nas células de adenocarcinoma mamário antes e após contato com macrófagos.

Avaliar a expressão e mecanismos de regulação genica da proteína Tnfaip2 nas células de adenocarcinoma mamário 4T1 após interações com macrófagos em modelo *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos:

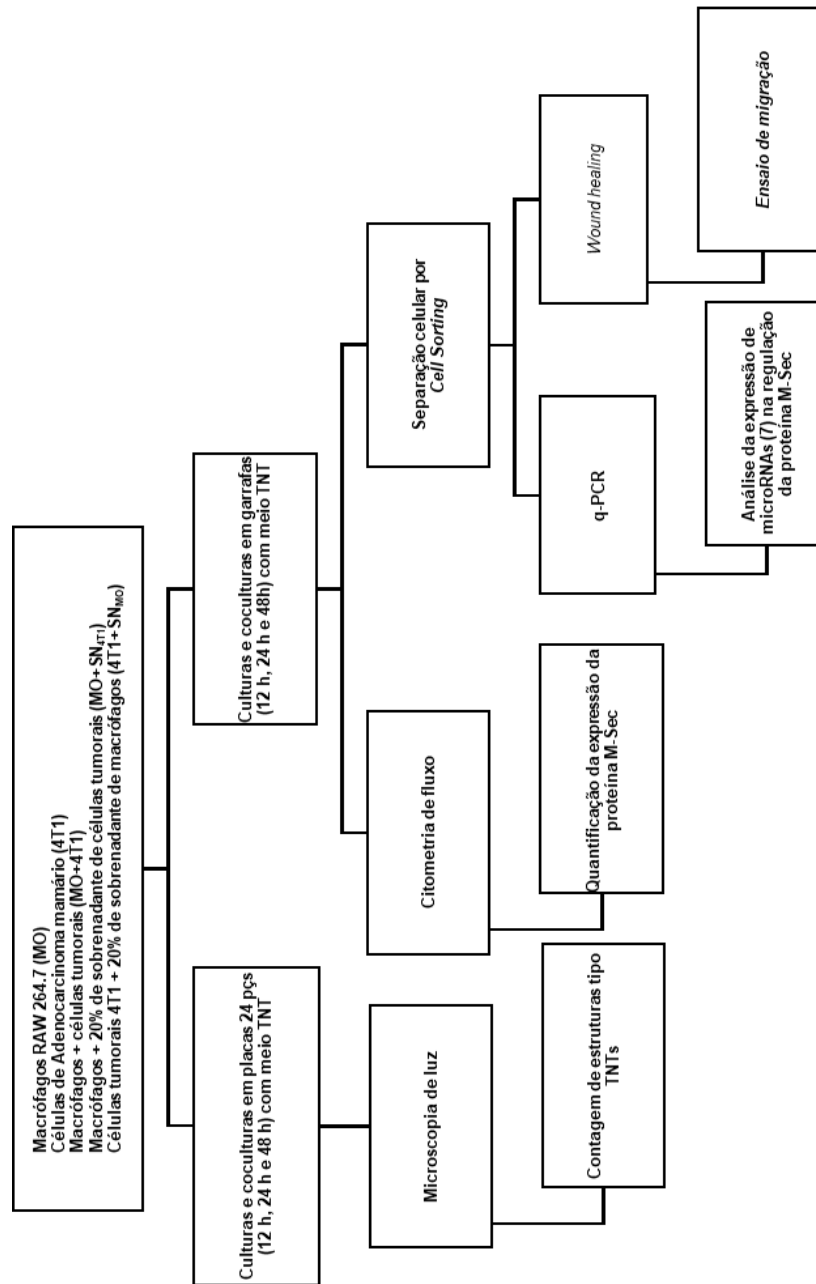
Quantificar estruturas tipo nanotubos de tunelamento durante as interações entre células de adenocarcinoma mamário 4T1 e macrófagos.

Analisar a expressão da proteína Tnfaip2 em células 4T1 e investigar possível interferência de miRNAs em sua regulação.

Avaliar a capacidade migratória de células 4T1 após interações com macrófagos.

3. Delineamento experimental

Gráfico 3 – Representação do delineamento Experimental



Fonte: Próprio autor

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura de células

Para os estudos foram utilizadas duas linhagens celulares: células tumorais de adenocarcinoma mamário 4T1 (4T1) e macrófagos RAW 264.7 (MO). Para a cultura de ambas as células foi utilizado meio R10 preparado com RPMI- 1640 (Gibco™- Thermo Fisher Scientific, Massachussets, EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Gibco) e 1% de solução antibiótica de estreptomicina e penicilina (100 unidades/mL de cada antibiótico, da Gibco). Para coleta das células 4T1 e macrófagos, as mesmas foram desaderidas, por breve exposição à tripsina (Gibco) ou por raspagem com *cell scraper* (Kasvi, Paraná, Brasil), respectivamente.

Padronizações prévias foram realizadas, com o intuito de determinar as condições experimentais mais adequadas para análises dos TNTs, Para isso monoculturas e coculturas de células 4T1 e MO foram mantidas em tempos, concentrações e proporções distintas para serem visualizadas e avaliadas usando microscópio invertido Axionvert 40CFL (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Após determinar as condições ideais para formação, visualização e quantificação dos TNTs, células foram cultivadas em placas de 24 poços ou garrafas de 75 cm seguindo os pressupostos estabelecidos.

Grupos experimentais avaliados:

- Células de adenocarcinoma mamário 4T1 (4T1)
- Macrófagos RAW 264.7 (MO)
- Macrófagos + células de adenocarcinoma mamário 4T1 (MO+4T1)
- Células 4T1 + 20% de sobrenadante de macrófagos (4T1+SN_{MO})
- Macrófagos + 20% de sobrenadante de células 4T1 (MO+SN_{4T1})

4.1.1. Coculturas

Coculturas de células tumorais 4T1 e macrófagos foram realizadas na proporção

1:1, em placas de 24 poços na concentração de $1,5 \times 10^4$ células de cada tipo celular, e em garrafas pequenas (25 cm^3) na concentração de 2×10^5 células de cada tipo celular.

Para otimização das coculturas, macrófagos foram plaqueados aproximadamente 12 horas antes da adição das células 4T1, ambas plaqueadas com meio R10. Após 6 horas do plaqueamento das células tumorais, o meio R10 foi substituído pelo meio indutor de TNTs que favorece a formação de nanotubos de tunelamento (meio TNT), preparado com RPMI- 1640 (Gibco) acrescido de 2,5% de soro fetal bovino inativado (SFB da Gibco), 1% de solução antibiótica de estreptomicina e penicilina (Gibco) suplementado com 50 mM de glicose (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Indaiatuba, Brasil), 2% de L-glutamina (Gibco) e 10 mM de lactato de amônio (Dinâmica), acidificado a pH 6,6.

As coculturas foram mantidas por 12, 24 e 48 horas, em estufa a 37°C , atmosfera com 5% de CO_2 , com troca do meio TNT a cada 24 horas, após centrifugação do meio coletado a 1200 rpm e ressuspensão do *pellet* celular.

4.1.2. Monoculturas

Monoculturas de células tumorais 4T1 ou macrófagos foram realizadas em placas de 24 poços na concentração de $1,5 \times 10^4$ células ou garrafas pequenas na concentração de 2×10^5 células e mantidas em cultura por 12 horas, com meio R10 completo. A fim de obter as mesmas condições experimentais das coculturas, após 12 h o meio R10 foi substituído por meio R10 novo e após 6 horas por meio indutor de TNT. As monoculturas foram mantidas por 12, 24 e 48 horas, em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO_2 , com troca do meio TNT a cada 24 horas, após centrifugação do meio coletado a 1200 rpm e ressuspensão do *pellet* celular.

4.1.3. Monoculturas com meio condicionado com sobrenadante celular

Para avaliação dos efeitos de fatores solúveis, sobrenadantes de macrófagos e 4T1 foram obtidos após 24 horas de cultura com o meio R10 e confluência aproximada de 80%. Os sobrenadantes coletados foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos e os *pellets* desprezados. Meios de culturas condicionados com sobrenadante celular foram preparados utilizando 80% de meio R10 ou meio TNT acrescidos de 20 % de sobrenadante (SN) de 4T1 ou macrófagos. Monoculturas de células tumorais e macrófagos foram realizadas em placas de 24 poços na concentração de $1,5 \times 10^4$ células ou garrafas pequenas na concentração de 2×10^5 células, com meio R10+SN do outro tipo celular por 12 horas. Após esse período o meio R10+SN foi substituído por novo R10+SN e após 6 horas foi trocado por meio TNT+SN. As

monoculturas foram mantidas por 12, 24 e 48 horas, em estufa a 37°C, atmosfera com 5% de CO₂, com troca do meio TNT+SN a cada 24 horas, após centrifugação do meio coletado a 1200 rpm e ressuspensão do *pellet* celular.

4.2. Viabilidade celular

Para contagem das células viáveis utilizadas nos cocultivos, foi realizado o ensaio de exclusão por Trypan blue (Gibco), no qual células mortas foram excluídas por marcação com o corante. Para isto a 10 µL de suspensão celular foram acrescentados 10 µL do corante e após homogeneização, 10 µL desta suspensão foram colocados por capilaridade na câmara de Neubauer. O valor médio da contagem dos quatro quadrantes laterais foi multiplicado por 2 (diluição do trypan blue) e o valor obtido representou o número de células por mL de suspensão.

4.3. Contagem de estruturas tipo nanotubos de tunelamento

Monoculturas e coculturas foram mantidas nas condições descritas acima, em placas de 24 poços. Após 6 horas de cultura o meio TNT foi adicionado e as placas foram fotografadas nos respectivos tempos 6, 12, 24 e 48 horas, utilizando lente objetiva de 20 X em microscópio invertido Axionvert40CFL (Zeiss, Oberkochen Alemanha) e câmera fotográfica Power Shot A650IS (Canon, Nova York – EUA). Pelo menos 10 campos aleatórios por condição experimental foram selecionados, para contagem de células e prolongamentos citoplasmáticos tipo nanotubos de tunelamento, com posterior cálculo da média (nº de estruturas tipo TNTs / nº de células).

4.4. Separação celular por citometria de fluxo (*cell sorter*)

Para separação por citometria de fluxo das respectivas populações (MO e 4T1) após cocultivos, foi utilizado o marcador CD45 (antígeno comum de leucócitos). Para isto, células coletadas das coculturas de macrófagos e células tumorais 4T1, mantidas por até 48 horas foram contadas e incubadas por 30 min com o anticorpo de bloqueio dos receptores Fc: anti-CD16/CD32 (BD Biosciences, New Jersey, EUA) diluído em tampão MACs, preparado com 1% de BSA (INLAB, São Paulo, SP, Brasil) e 2 mM de EDTA (Sigma Aldrich® - Merck, New Jersey, EUA). Após 30 min de incubação no gelo, PBS (tampão fosfato salino do inglês, *phosphate buffered saline*) 1X foi adicionado, e células foram centrifugadas por 5 min a 500 xg. Após lavagem, *pellet* celular foi ressuscitado com anti-CD45, conjugado a FITC

(Isotiocianato de fluoresceína do inglês, *Fluorescein isothiocyanate*, fornecido pela BD Biosciences), diluído em tampão MACS. Após incubação de 20 min no gelo e protegidas da luz, células foram lavadas e ressuspensas em PBS 1X para separação eletrônica usando o equipamento BD FACSAria II *Cell Sorter* e o *software* FACSDiva (ambos da BD Biosciences, Califórnia, EUA). Para a separação, *doublets* foram excluídos e em seguida células CD45⁺ (MO) e CD45⁻ (células 4T1) foram coletadas em tubos separados contendo SFB (Figura 19 do material suplementar). Após verificação de pureza $\geq 90\%$, *single cells* foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos, sobrenadantes foram descartados e *pellets* ressuspensos em 250 μ L de Trizol para conservação a -80° C para ensaios posteriores.

4.5. Quantificação da proteína Tnfaip2 por Citometria de Fluxo

Para verificar a expressão da proteína Tnfaip2 nas células 4T1 antes e após coculturas, células 4T1 e macrófagos, tanto das monoculturas como coculturas após 48 horas foram coletadas e incubadas com anti-CD16/CD32 (BD Biosciences), diluído em PBS/BSA 1% e incubadas por 30 min no gelo. Em seguida, células foram lavadas e ressuspensas com anti-CD45 conjugado a PE (Ficoeritrina, do inglês, *Phycoerythrin*, fornecido por ImmunoTools_{GmbH}, Friesoythe, Alemanha), diluído 1:100 em PBS/BSA 1%, conforme instruções do fabricante.

Para análises da expressão da proteína Tnfaip2 (intracelular), diferentes concentrações de anticorpo Tnfaip2 (coelho anti IgG de camundongo), conjugado a FITC (InvitrogenTM -Thermofisher, Massachusetts, EUA), foram testadas, com a finalidade de definir a diluição ideal do anticorpo. Após lavagem da marcação anti-CD45, as células foram submetidas a protocolo de permeabilização conforme instruções do kit *IC Fixation buffer* (eBioscienceTM Thermofisher, Massachusetts, EUA), pela adição de 100 μ L de tampão de fixação - (eBioscience), seguido de mix no Vortex (Phoenix – Araraquara – SP) por 1 min, incubação a temperatura ambiente por 30 min e protegidas da luz. Em seguida, 2 mL de tampão de permeabilização 1 X (eBioscience) foram adicionados, e amostras foram centrifugadas a 500 xg por 5 min para descarte dos sobrenadantes e repetição do procedimento por mais uma vez. Posteriormente, o *pellet* celular foi ressuspensado em 25 μ L de tampão de permeabilização 1X contendo anti -Tnfaip2 (Invitrogen) na diluição 1:50 e solução foi incubada por 40 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luz. Logo, células foram lavadas, e em seguida pellet foi ressuspensado em 25 μ L de tampão de permeabilização 1X contendo anticorpo secundário (Cabra anti IgG de coelho) conjugado a Alexa Fluor ® 488 (InvitrogenTM – Thermofisher),

diluído (10 μ g/mL), para incubação por 30 min, no gelo e protegidas da luz. Após incubação, células foram lavadas 2 vezes consecutivas com 1X PBS.

Após marcações de superfície e intracelular, *pellet* celular foi submetido a marcação com o kit 7-AAD (BD-Biosciences), conforme instruções do fabricante, para avaliar viabilidade celular. Para isto, células foram incubadas com 100 μ L do tampão do kit contendo 1 μ L de 7-AAD, para incubação a temperatura ambiente por 15 min. Após lavagem com PBS 1X, células foram ressuspensas em PBS 1X para aquisição em citômetro Accuri™C6 (BD Biosciences). As análises dos dados foram realizadas nos *softwares* BD CSampler e *FlowJo*. A estratégia de *gates* utilizada nas análises foi descrita na Figura 20 do material suplementar.

4.6. Ensaios para análise de biologia molecular.

Para investigar a participação de microRNAs envolvidos na regulação da expressão da proteína Tnfaip2, RNA total das células 4T1 ou MO antes ou após cocultivos foram extraídos. O nível dos transcritos dos genes de Tnfaip2 e da maquinaria de processamento de miRNAs; Drosha, Exportina 5 e Dicer, conjuntamente com sete (7) potenciais microRNAs, selecionados da literatura ou determinados *in silico*, foram avaliados a fim de investigar o envolvimento de RNAs não codificantes no possível silenciamento pós-transcricional do gene *Tnfaip2*. Para isto os seguintes protocolos foram realizados:

4.6.1. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol. Após *cell sorter* células foram homogeneizadas em 0,5 mL do reagente TRIzol® e em seguida, 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) foram adicionados para separação da fase aquosa por centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação a fase aquosa (sobrenadante) foi coletada. Em seguida, a precipitação do RNA foi realizada com adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado para lavagem (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). As amostras foram mixadas vigorosamente, incubadas à -20 °C por 15 minutos e novamente centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 70% por 2 x e centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a última centrifugação, as amostras foram ressuspensas em 20 μ L de água DEPC (água tratada com Dietil Pirocarbonato) para armazenamento a -80°C. A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific,

Uniscience), utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$).

4.6.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da transcrição reversa de 2000 ng de RNA total previamente extraído e armazenado em Biofreezer (-80) na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 μL contendo 500 μM de dNTP, 25 $\mu\text{g/mL}$ de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 μM de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias e em seguida a reação de síntese aconteceu durante 50 minutos a 50°C, como inativação enzimática a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído à concentração final de 100 ng/ μL e armazenado a -20°C.

4.6.3. Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real (q-PCR)

Para o estudo da expressão gênica, as reações foram realizadas com iniciadores (*primers*) específicos descritos na Tabela 1, usando como controle endógeno o gene de referência *Rnu6* (*RNA, U6 small nuclear*). Todas as reações tiveram volume final de 10 μL ; contendo 5 μL de SYBR Green I Master (Promega Biotecnologia do Brasil, São Paulo, Brasil), 0,4 μM de iniciadores específicos, 1 μL do cDNA sintetizado e q.s.p. de água *Milli-Q Rnase free*.

A quantidade relativa dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo é subtraída pela média do Ct dos controles utilizados, resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão substituímos o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo *Tnfaip2* em relação à média da expressão gênica do gene de controle interno (*Rnu6*).

Tabela 1 - Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica.

Gene (ID)	Iniciador	5'- 3' Sequência	Condições de reação	Tamanho do produto (pb)
<i>Tnfaip2</i> (21928)	<i>Forward</i>	AAA AAG GAC CAG CCC AGA TT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	453
	<i>Reverse</i>	TAC AGA GCC TCC ACC TTG CT		
<i>Drosha</i> (14000)	<i>Forward</i>	AAC AGT TCA ACC CCG AAG TG	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	145
	<i>Reverse</i>	CTC TGA GCC AGC TTC TGC TT		
<i>Xpo5</i> (72322)	<i>Forward</i>	TTC CTG ACT TCC GGC TTA GA	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	138
	<i>Reverse</i>	TGG TTG ATG ACA TGC CAC TT		
<i>Dicer</i> (192119)	<i>Forward</i>	TAA CTG GCA ATC CGA GG	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	270
	<i>Reverse</i>	CCA TGG CAG ACA CAC TAC CTT		
<i>Rnu6</i> (19862)	<i>Forward</i>	CTC GCT TCG GC AGC ACA	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	94
	<i>Reverse</i>	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT		
miR-221 (MI0000709)	<i>Forward</i>	ATC CAG GTC TGG GGC ATG A	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	95
	<i>Reverse</i>	TTC CAG GTA GCC TGA AAC CC		
miR-184 (MI0000226)	<i>Forward</i>	CCT TTC CTT ATC ACT TTT CC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	68
	<i>Reverse</i>	CTA CCC TTA TCA GTT CTC CG		
miR-145 (MI0000169)	<i>Forward</i>	CTC ACG GTC CAGT TTT CC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	70
	<i>Reverse</i>	CTC AAG AAC AGT ATT TCC AGG		
miR-7066 ^{NEW} (MI0022915)	<i>Forward</i>	CCC TGT GGG TTG GGA AAT G	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	63
	<i>Reverse</i>	CTG GGA GGC AGG CAA TGG		
miR-5107 ^{NEW} (MI0018016)	<i>Forward</i>	TCC AAG ATG TTG GGC AGA G		88

	<i>Reverse</i>	TTC ACA GGG TGA CTG GGA A	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	
miR-3569 ^{NEW} (MI0025014)	<i>Forward</i>	TCG GAG GAG AGC AGA CCG	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	58
	<i>Reverse</i>	GCT GGA GAG GAG CGC AGA		
miR-3103 ^{NEW} (MI0014100)	<i>Forward</i>	AGG AGG GAG GAT CTG CTG TT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	67
	<i>Reverse</i>	CCT GTG GGA AGG ATC AGA GG		

Fonte: Próprio autor

4.6.4. Análise da expressão de miRNAs

Foram utilizados para análise de mecanismos epigenéticos sete (7) miRNAs, capazes de regular a expressão da proteína Tnfaip2. Conforme descritos na Tabela 2, três microRNAs foram selecionados por busca na literatura (PUBMED), por correlação com câncer e/ ou expressão de Tnfaip2 e, quatro deles foram selecionados pela bioinformática, por predição de complementariedade com o gene alvo, porém sem artigos de sua correlação com câncer ou expressão de Tnfaip2 até o momento.

Tabela 2 - microRNAs analisados por possível regulação na expressão da proteína Tnfaip2

microRNA	Base selecionada	Artigos (total)	Artigos (câncer)	Artigos (Tnfaip2)
miR-221	Literatura	1786	1022	1
miR-184	Literatura	346	134	4
miR-145	Literatura	2334	1352	1
miR-7066 ^{NEW}	Bioinformática	0	0	0
miR-5107 ^{NEW}	Bioinformática	4	0	0
miR-3569 ^{NEW}	Bioinformática	0	0	0
miR-3103 ^{NEW}	Bioinformática	0	0	0

Fonte: Próprio autor

4.7. Ensaio de Migração celular

O ensaio de migração celular *wound healing* foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade migratória das células tumorais 4T1 após cocultivos com macrófagos e separação por *cell sorter*. Para isto, 2×10^5 de células 4T1 antes e após interações com macrófagos, por 48 horas (4T1/PS_{MO}), foram cultivadas em placas de 12 poços com meio completo R10. 24 horas após incubação nas mesmas condições de cultura, com ajuda de uma ponteira (capacidade 1000 μ L) foi realizada uma linha constante "ferida" na monocamada de células. Em seguida, células soltas pelo procedimento foram retiradas com três lavagens consecutivas, com PBS 1 X. Após lavagens, meio R10 foi adicionado, as placas foram observadas em microscópio invertido (ZEISS) e fotografadas (0 h) utilizando câmera fotográfica (Canon). Em seguida, células foram incubadas nas condições iniciais de cultura, por 24 horas após a realização da "ferida". Novas fotos foram realizadas no tempo de 24 h, a fim de verificar crescimento das células tumorais na "ferida", como indicativo de migração. Medidas de área do espaço foram determinadas utilizando

o *software* ImageJ versão *online* (<https://ij.imjoy.io>)

4.8. Determinação do perfil de citocinas do kit *inflammation*

Amostras dos sobrenadantes das coculturas de macrófagos com células tumorais 4T1, monoculturas de células 4T1 com sobrenadante de macrófagos, monoculturas de macrófagos e monoculturas de 4T1, foram coletadas nos tempos de 12, 24 e 48 horas e mantidas a -80°C, para posterior quantificação das citocinas IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10, IL-6, usando o kit *inflammation* (BD Biosciences). Para isto, 20 μ L de cada amostra (incluindo a curva padrão) foram incubadas com 20 μ L de uma mistura de *beads* de captura e anticorpo secundário conjugado ao PE. As amostras foram incubadas por 2 h à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após lavagem foram ressuspensas em 150 μ L de tampão respectivo do kit. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro AccuriTMC6 (BD Biosciences) com total de 1800 eventos correspondendo a 300 *beads* por analito a ser investigado. A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* de análises (FCAP *Array software* – BD Biosciences).

4.9. Análises estatísticas

Para comparações estatísticas, as abordagens paramétricas utilizadas foram variância ANOVA de uma ou duas vias. Para respeitar os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias entre os grupos, foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para ANOVA de uma via foi aplicado pós teste de Tukey HSD e para ANOVA de duas vias foi aplicado pós teste de Bonferroni.

Para análises de correlações foram aplicados os testes de Pearson para dados paramétricos e de Spearman para dados não paramétricos, após avaliação da normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk.

Todos os valores foram representados como média \pm erro padrão (SEM), com significância de 95%, considerando $p < 0,05$. Análises e gráficos foram realizados utilizando o *software* Prisma Versão 5 (GraphPad, Lajolla, Califórnia, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Padronizações das concentrações e proporções celulares para realização dos ensaios

Testes preliminares de culturas de macrófagos RAW 264.7 e células de adenocarcinoma mamário 4T1 foram realizados com o intuito de obter a concentração “ideal” e confluência adequada para visualização e quantificação dos nanotubos de tunelamento (TNTs). A primeira padronização foi realizada com monoculturas de ambas as células, realizadas em placas de 24 poços nas concentrações: 2×10^4 , 10×10^4 e 20×10^4 . Coculturas na proporção 1:1 foram realizadas com as concentrações: 1×10^4 , 5×10^4 e 10×10^4 de cada tipo celular, e na proporção 2:1, de macrófagos e células tumorais, sendo as concentrações de 1×10^4 , 5×10^4 e 10×10^4 para macrófagos e $0,5 \times 10^4$, $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 para células 4T1. Os cultivos foram realizados em duplicatas. O meio indutor de TNTs utilizado no plaqueamento foi testado com diferentes concentrações de soro fetal bovino (1% e 2,5%). As análises de confluência e viabilidade foram feitas nos tempos: 12, 24, 48 e 72 horas. Com essas concentrações celulares utilizadas, confluência celular de 100% foi atingida em 24 horas, inviabilizando visualização de TNTs nessas condições (dados não mostrados).

A segunda padronização (Figura 21 do material suplementar) foi realizada em condições semelhantes à primeira, porém com concentrações reduzidas das monoculturas de ambas as células, cultivadas em placas de 24 poços nas concentrações: 1×10^4 , 5×10^4 e 10×10^4 . Coculturas na proporção 1:1 foram realizadas com as concentrações: 1×10^4 , 5×10^4 e 10×10^4 de cada tipo celular, e na proporção 2:1, de macrófagos e células tumorais, sendo as concentrações de 1×10^4 , 5×10^4 e 10×10^4 para macrófagos e $0,5 \times 10^4$, $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 para células 4T1. Os cultivos foram realizados em duplicatas. O meio indutor de TNTs utilizado no plaqueamento foi testado com diferentes concentrações de soro fetal bovino (1% e 2,5%). As análises de confluência e viabilidade foram feitas nos tempos: 12, 24, 48 e 72 horas. Nessas condições observamos que a menor concentração testada de 1×10^4 células, não apresentou quantidade suficiente para formação de TNTs. No outro extremo, a maior concentração testada de 10×10^4 células inviabilizou a visualização dos TNTs, pela alta confluência celular observada. A concentração intermediária de 5×10^4 células, apresentou melhores resultados nos tempos de 12 e 24 horas. O tempo de 72 horas foi excluído das futuras análises, por demonstrar grande densidade celular em todos os grupos, inviabilizando a formação de TNTs. O meio indutor de TNTs na concentração de 1 % de SFB também foi descartado dos ensaios posteriores, pois apesar de exibir aumento de TNTs em relação ao meio usando 2,5 % de SFB, demonstrou baixa

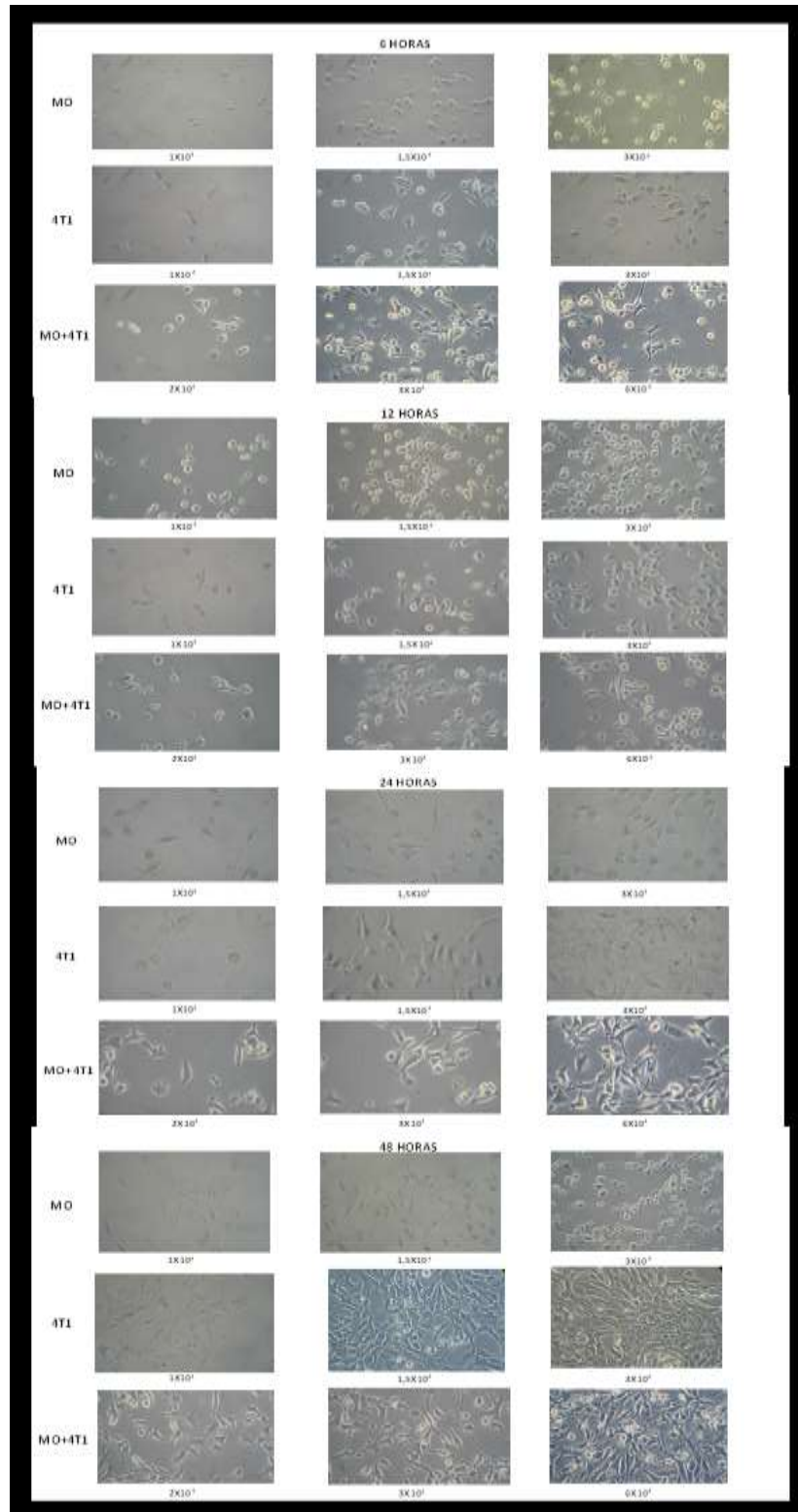
viabilidade celular nos tempos de 48 e 72 horas.

A terceira padronização foi realizada com concentrações intermediárias, em monoculturas de ambas as células, realizadas em placas de 24 poços nas concentrações: $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 e $7,5 \times 10^4$. Coculturas na proporção 1:1 foram realizadas com as concentrações: $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 e $7,5 \times 10^4$ de cada tipo celular. Os cultivos foram realizados em duplicatas, com meio indutor de TNT na concentração de 2,5% de soro fetal bovino. As análises de confluência e viabilidade foram feitas nos tempos: 12, 24 e 48 horas. Nesse ensaio as células 4T1 apresentaram morfologia atípica, com baixa aderência e conseqüentemente inviabilizando as observações (dados não mostrados).

A quarta padronização foi realizada (Figura 22 do material suplementar), com monoculturas de ambas as células, em placas de 24 poços, nas concentrações: 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 . Coculturas na proporção 1:1 foram realizadas com as concentrações: 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 de cada tipo celular. Os cultivos foram realizados em duplicatas, e os cocultivos em quadruplicatas. Plaqueamentos foram realizados com meio R10 e meio indutor de TNT na concentração de 2,5% de soro fetal bovino para comparação. As análises de confluência e viabilidade foram feitas nos tempos: 12, 24 e 48 horas. Essa padronização foi realizada com concentrações celulares menores, cultivadas com meio R10 e meio TNT, com o intuito de comparar a viabilidade celular nessas duas condições. Os resultados observados demonstraram que as concentrações de menor e maior valor, 1×10^4 e 5×10^4 células, respectivamente, não adquiriram densidade adequada para visualização dos TNTs. Entretanto, a concentração intermediária de $2,5 \times 10^4$ células apresentou boa confluência para caracterização dos TNTs, nos tempos analisados de 12, 24 e 48 horas. O meio TNT apresentou menor viabilidade celular em relação ao meio R10, porém conforme descrito na literatura, induziu exponencial aumento de TNTs nos grupos experimentais analisados.

A quinta e última padronização foi realizada (Figura 5) com monoculturas de ambas as células, em placas de 24 poços, nas concentrações: 1×10^4 , $1,5 \times 10^4$ e 3×10^4 . As coculturas foram realizadas na proporção de 1:1, em placas de 24 poços, com as concentrações de 1×10^4 , $1,5 \times 10^4$ e 3×10^4 de cada tipo celular, e em garrafas de culturas pequenas, nas concentrações de 1×10^5 , $1,5 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^5$. Os cultivos foram realizados em duplicatas e os cocultivos em quadruplicatas. As análises de confluência e viabilidade foram feitas nos tempos: 12, 24 e 48 horas. Nesse ensaio foi possível determinar as concentrações mais adequadas para visualização dos TNTs, tanto em placas de 24 poços usando $1,5 \times 10^4$ células, como em garrafas pequenas usando 2×10^5 células de cada tipo celular, sendo essas as concentrações utilizadas nos ensaios posteriores.

Figura 5 – Padronização final de culturas celulares para caracterização e quantificação de nanotubos. Monoculturas de macrófagos (MO), monoculturas de células de adenocarcinoma mamário (4T1) e coculturas de macrófagos e células tumorais (MO+4T1), foram cultivadas em diferentes concentrações, em placas de 24 poços, em meio indutor de TNT. As placas foram observadas nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas por microscopia de contraste de fase com aumento de 20%.



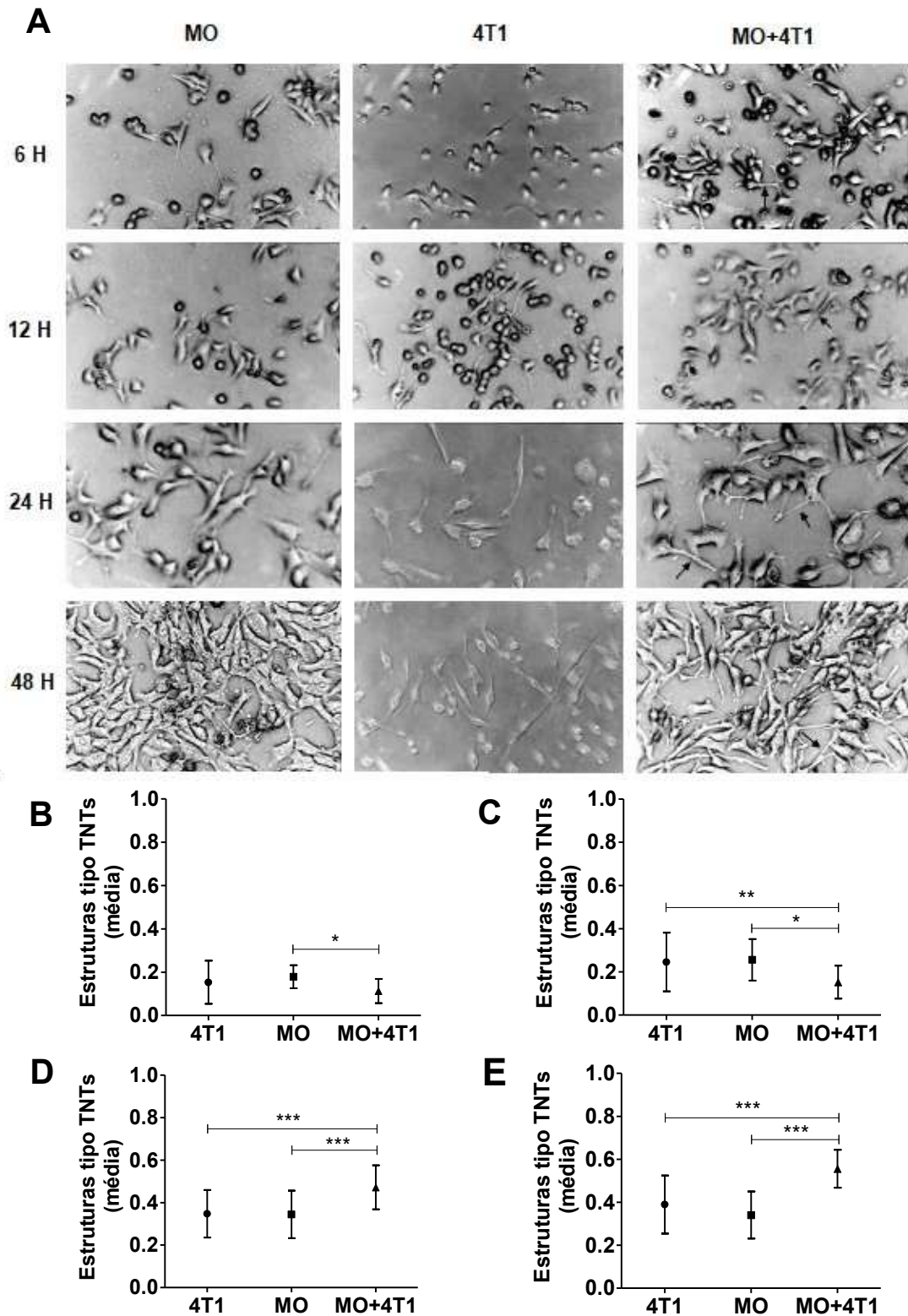
Fonte: Próprio autor

5.2. Contagem de extensões citoplasmáticas tipos TNTs

Para quantificar as extensões citoplasmáticas tipo TNTs, análises das monoculturas de macrófagos, ou células tumorais 4T1 e, coculturas de macrófagos com células tumorais, mantidas em placas de 24 poços nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas, foram realizadas conforme descrito no item 4.3 de material e métodos e demonstrado na Figura 6 A.

Resultados apresentados na Figura 6 B demonstraram que em 6 horas, o grupo do cocultivo (MO+4T1) apresentou número médio (0,11) expressivamente menor de estruturas tipo TNTs em relação ao grupo de macrófagos cultivados sozinhos MO (0,18) ($p < 0,05$). Em 12 horas (Figura 6 C) o grupo MO+4T1 demonstrou menor média (0,15) de estruturas tipo TNTs quando comparado com o grupo MO (0,25) ($p < 0,05$) e grupo de células 4T1 sozinhas (0,24) ($p < 0,01$). Em contrapartida, houve aumento expressivo das médias contabilizadas de estruturas tipo TNTs no grupo MO+4T1 nos tempos de 24 horas (Figura 6 D) e 48 horas (Figura 6 E) (0,47 e 0,55, respectivamente) em relação às monoculturas de MO (0,34 e 0,33; respectivamente) e de 4T1 (0,34 e 0,38; respectivamente) (ambos os tempos com $p < 0,001$).

Figura 6 - Quantificação de prolongamentos citoplasmáticos tipo TNTs. Aquisições de imagens foram realizadas por microscopia de luz, de monoculturas de células de adenocarcinoma mamário 4T1 (4T1), monoculturas de macrófagos (MO) e coculturas de macrófagos com células tumorais 4T1 (MO+4T1), com meio indutor de TNTs, para contagem de células e extensões citoplasmáticas tipo TNTs (A), e posterior avaliação e comparação das médias nos tempos 6 h (B), 12 h (C), 24 h (D) e 48 h (E), utilizando o teste ANOVA de 1 via e pós teste de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



5.3. Análises da expressão da proteína Tnfaip2 em células tumorais 4T1 e macrófagos

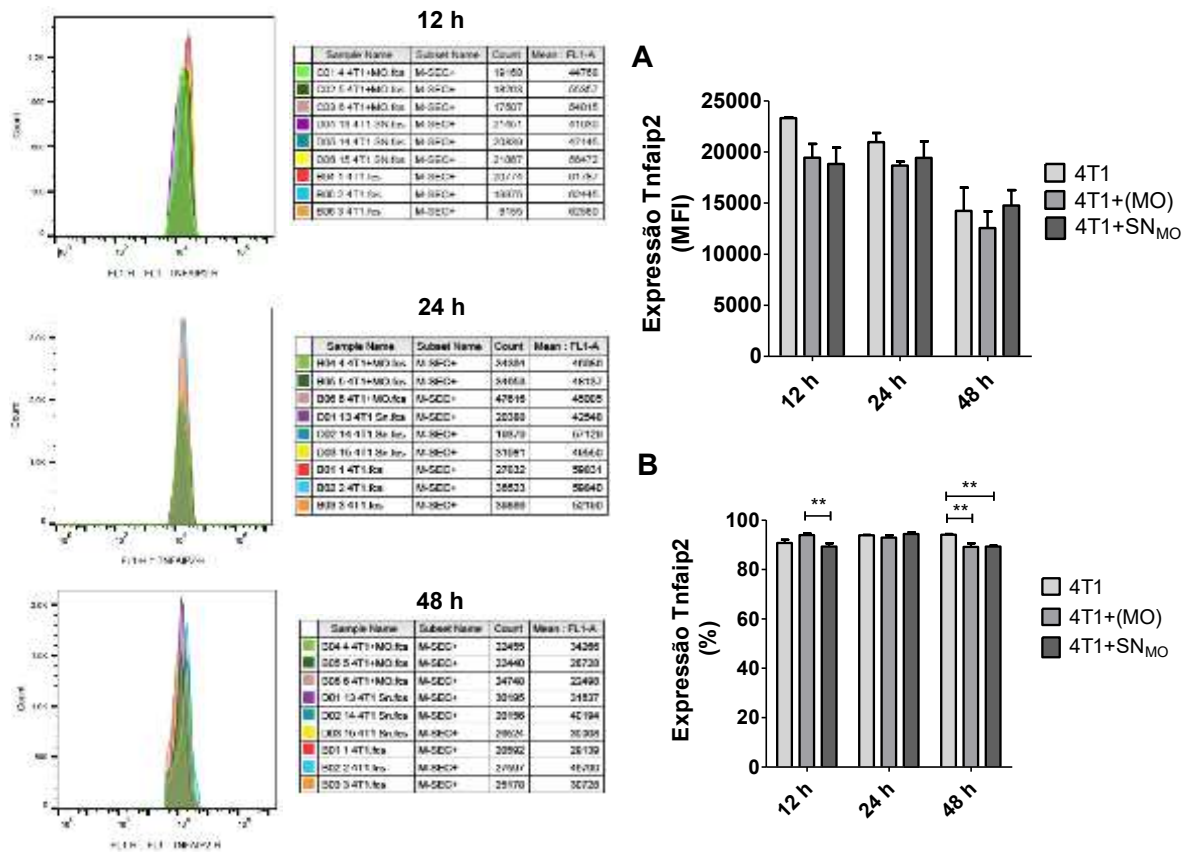
Para investigar a expressão da proteína Tnfaip2 nas células 4T1 e MO antes e após cocultivos de ambas as células, ou cultivos com seus sobrenadantes, células das monoculturas mantidas em meio indutor de TNTs (4T1 ou MO) ou com 20% de sobrenadante de MO (4T1+SN_{MO}) ou de 4T1 (MO+SN_{4T1}), ou da cocultura de ambas as células, (4T1+MO) por 12, 24 ou 48 horas foram coletadas e processadas para análises por citometria de fluxo.

5.3.1. Células 4T1

Conforme demonstrado na Figura 7 A, células 4T1 quando cocultivadas com macrófagos (4T1+(MO)), apresentaram tendência à redução da média de intensidade da fluorescência (MFI) para Tnfaip2 em relação às células 4T1 cultivadas sozinhas (4T1), em todos os tempos analisados (12, 24 e 48 h). Adicionalmente, células 4T1 cultivadas com sobrenadante de macrófagos (4T1+SN_{MO}), também demonstraram tendência a redução do MFI para Tnfaip2 no tempo de 12 h quando comparadas ao grupo 4T1. No entanto as diferenças encontradas não foram significativas nos testes estatísticos aplicados.

Em relação à porcentagem de células que expressaram Tnfaip2, conforme demonstrado na Figura 7 B, células dos grupos 4T1+(MO) e 4T1+SN_{MO}, demonstraram redução significativa no tempo de 48 h em relação ao grupo 4T1 ($p < 0,01$). No tempo de 12 h houve redução significativa do grupo 4T1+SN_{MO} em relação ao grupo 4T1+(MO) ($p < 0,01$).

Figura 7 – Análise da expressão da proteína Tnfaip2 em células de adenocarcinoma mamário 4T1 durante cocultivos. Análises por citometria de fluxo foram realizadas nas células de adenocarcinoma mamário 4T1 de monoculturas (4T1), ou cocultivos com macrófagos (4T1+(MO)) ou cultivos com sobrenadante de macrófagos (4T1+SN_{MO}), nos tempos de 12 h, 24 h e 48 h, para obtenção de médias de intensidade de fluorescência (MFI) (A) ou porcentagem de células 4T1 com expressão positiva para proteína Tnfaip2 (%) (B). N=3. Teste ANOVA de 2 vias e pós teste de Bonferroni (* p<0,05, ** p<0,01).



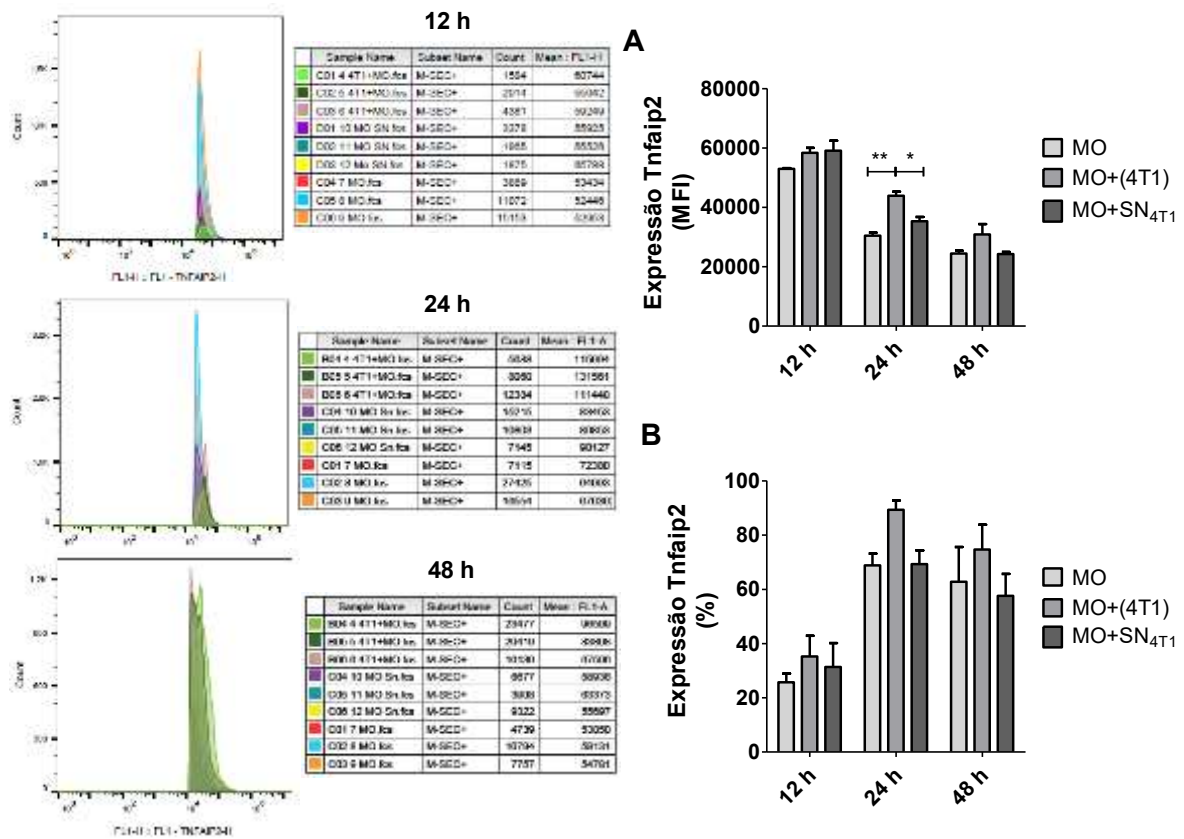
Fonte: Próprio autor

5.3.2. Macrófagos

Análises de expressão de Tnfaip2 nos macrófagos, mostram que quando cocultivados com células tumorais 4T1 (MO+(4T1)) apresentam aumento significativo do MFI para Tnfaip2 em relação aos macrófagos cultivados sozinhos (MO) ($p < 0,01$) ou cultivados com sobrenadante de células tumorais (MO+SN_{4T1}) ($P < 0,05$) no tempo de 24 h, com tendência também ao aumento nos tempos de 12 e 48 h, porém, não foram estatisticamente significativas (Figura 8 A). Já as monoculturas de macrófagos com sobrenadante de células 4T1 (MO+SN_{4T1}), não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo macrófagos sozinhos (MO) em nenhum dos tempos estudados, porém apresentou diferença em relação ao grupo de macrófagos cocultivados com 4T1 (MO+(4T1)) em 24 h ($p < 0,05$) (Figura 8 A).

Em contraste, nas análises do percentual de células que expressaram a proteína Tnfaip2, apesar da tendência de aumento observada no grupo MO+(4T1) em relação aos grupos MO e MO+SN_{4T1}, as diferenças não foram significativas nos testes estatísticos aplicados, em nenhum dos tempos analisados (Figura 8 B).

Figura 8 - Análise da expressão da proteína Tnfaip2 em macrófagos durante cocultivos. Análises por citometria de fluxo realizadas em monoculturas de macrófagos (MO) ou, cocultivados com células 4T1 (MO+(4T1)) ou com sobrenadante de células 4T1 (MO+SN_{4T1}), nos tempos de 12 h, 24 h e 48 h, para obtenção de médias de intensidade de fluorescência (MFI) (A) ou porcentagem de macrófagos com expressão positiva para proteína Tnfaip2 (%) (B). N= 3. Teste ANOVA de 2 vias e pós teste de Bonferroni (* p<0,05, ** p< 0,01).



Fonte: Próprio autor

5.4. Expressão do gene *Tnfaip2* em células tumorais 4T1 e macrófagos após cocultivos

Análises da expressão de transcritos do gene *Tnfaip2* por qPCR foram realizadas

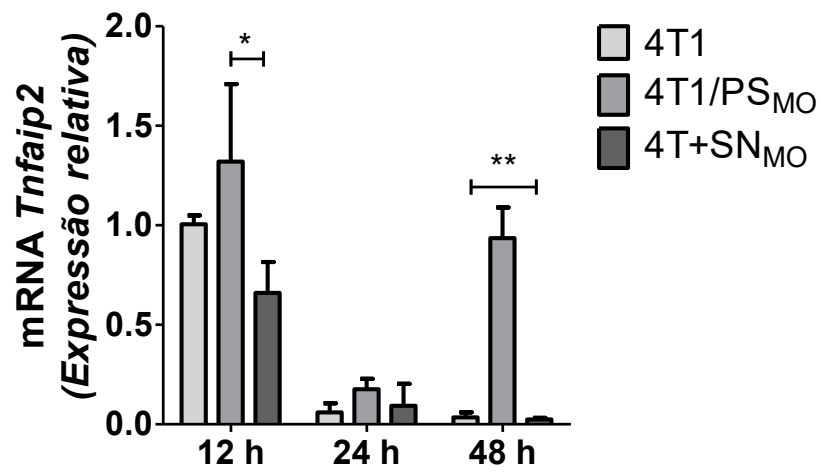
em monoculturas de células de adenocarcinoma mamário (4T1), monoculturas de macrófagos (MO), monoculturas de células 4T1 com sobrenadante de macrófagos (4T1+SN_{MO}), monoculturas de macrófagos com sobrenadante de células tumorais 4T1 (MO+SN_{4T1}), e coculturas de células tumorais e macrófagos, após separação por *cell sorter* (4T1/PS_{MO}) e (MO/PS_{4T1}) nos tempos de 12, 24 e 48 h.

5.4.1. Células 4T1

Conforme observado na Figura 9, células 4T1 das monoculturas (4T1) apresentaram menor expressão do gene *Tnfaip2* quando comparadas com células 4T1 após cocultura com macrófagos (4T1/PS_{MO}) no tempo de 48h ($p < 0,01$). Expressão de *Tnfaip2* foi também significativamente maior nas células 4T1/PS_{MO} quando comparadas com células 4T1 cultivadas com sobrenadante de macrófagos (4T1+SN_{MO}), nos tempos de 12 h ($p < 0,05$) e 48 h ($p < 0,01$) de cultura. Análises realizadas no tempo de 24 h não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos, em relação à expressão de *Tnfaip2*, entretanto células 4T1 das monoculturas tendem a ter níveis menores de expressão do mesmo transcrito quando comparados com os grupos MO+SN_{4T1} e 4T1+SN_{MO}.

Figura 9 - Avaliação dos níveis de expressão do gene *Tnfaip2* em células de adenocarcinoma mamário 4T1 após cocultivos. Células de adenocarcinoma mamário 4T1 cocultivadas com macrófagos e separadas por *cell sorter* (4T1/PS_{MO}), células 4T1 cultivadas sozinhas (4T1) e células 4T1 cultivadas com sobrenadante de macrófagos (4T1+SN_{MO}) foram avaliadas por qPCR nos tempos 12, 24 e 48 horas para análise da expressão do

gene *Tnfaip2*. Em 12 e 48 h: N=2, e 24 h: N= 3. Teste ANOVA de 2 vias e pós teste de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).



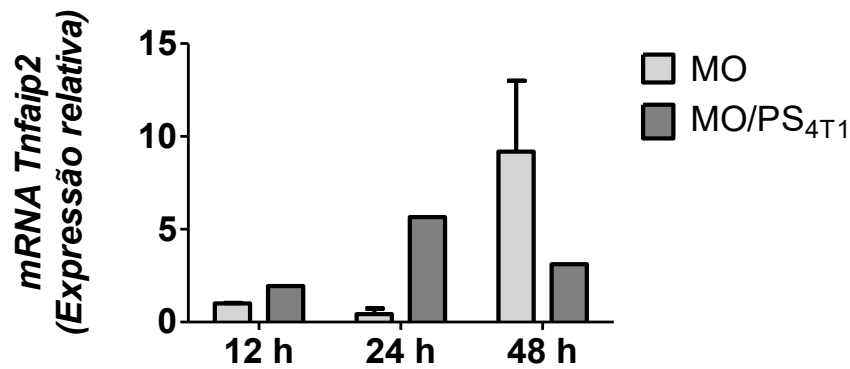
Fonte: Próprio autor

5.4.2. Macrófagos

Em contraste com as células 4T1, análises da expressão do transcrito de *Tnfaip2*

nos macrófagos, não evidenciaram diferenças significativas em nenhum dos tempos (Figura 10). Entretanto, foi observado que, MO após cocultivo com células 4T1 (MO/PS_{4T1}) apresentaram tendência a aumentar os níveis de *Tnfaip2* quando comparados com grupo MO, nos tempos de 12 e 24 h. Já no tempo de 48 h, foi observada tendência a níveis maiores de *Tnfaip2* nos MO quando comparados com os níveis detectados no grupo MO/PS_{4T1}.

Figura 10 - Avaliação dos níveis de expressão do gene *Tnfaip2* em macrófagos após cocultivos. Macrófagos cocultivados com células de adenocarcinoma mamário 4T1 e separadas por *cell sorter* (MO/PS_{4T1}) e macrófagos cultivados sozinhos (MO) foram avaliadas por qPCR nos tempos 12, 24 e 48 horas para análise da expressão do gene *Tnfaip2*. MO: N=2 em 12 e 48h, e N=3 em 24 h; MO/PS_{4T1}: N=1 (*pool* de 2 amostras em 12 e 48h; e *pool* de 3 amostras em 24 h). Teste ANOVA de 2 vias e pós teste de Bonferroni.



Fonte: Próprio autor

5.5. Avaliação da expressão de microRNAs como possível mecanismo envolvido na regulação da expressão do gene de *Tnfaip2*

Com o intuito de verificar se a expressão do gene *Tnfaip2* estaria regulada por mecanismo epigenético envolvendo a expressão de microRNAs, transcritos de microRNAs reguladores do *Tnfaip2* já descritos na literatura e correlacionados com câncer (miR-221, miR-184 e miR-145), ou preditos por análises de bioinformática (miR-7066^{NEW}, miR-5107^{NEW}, miR-3569^{NEW} e miR-3103^{NEW}) com inexistente ou escassa literatura e, sem descrição em câncer ou correlação com o gene *Tnfaip2*, foram avaliados nas células 4T1 e MO nas diferentes condições.

5.5.1. Células 4T1

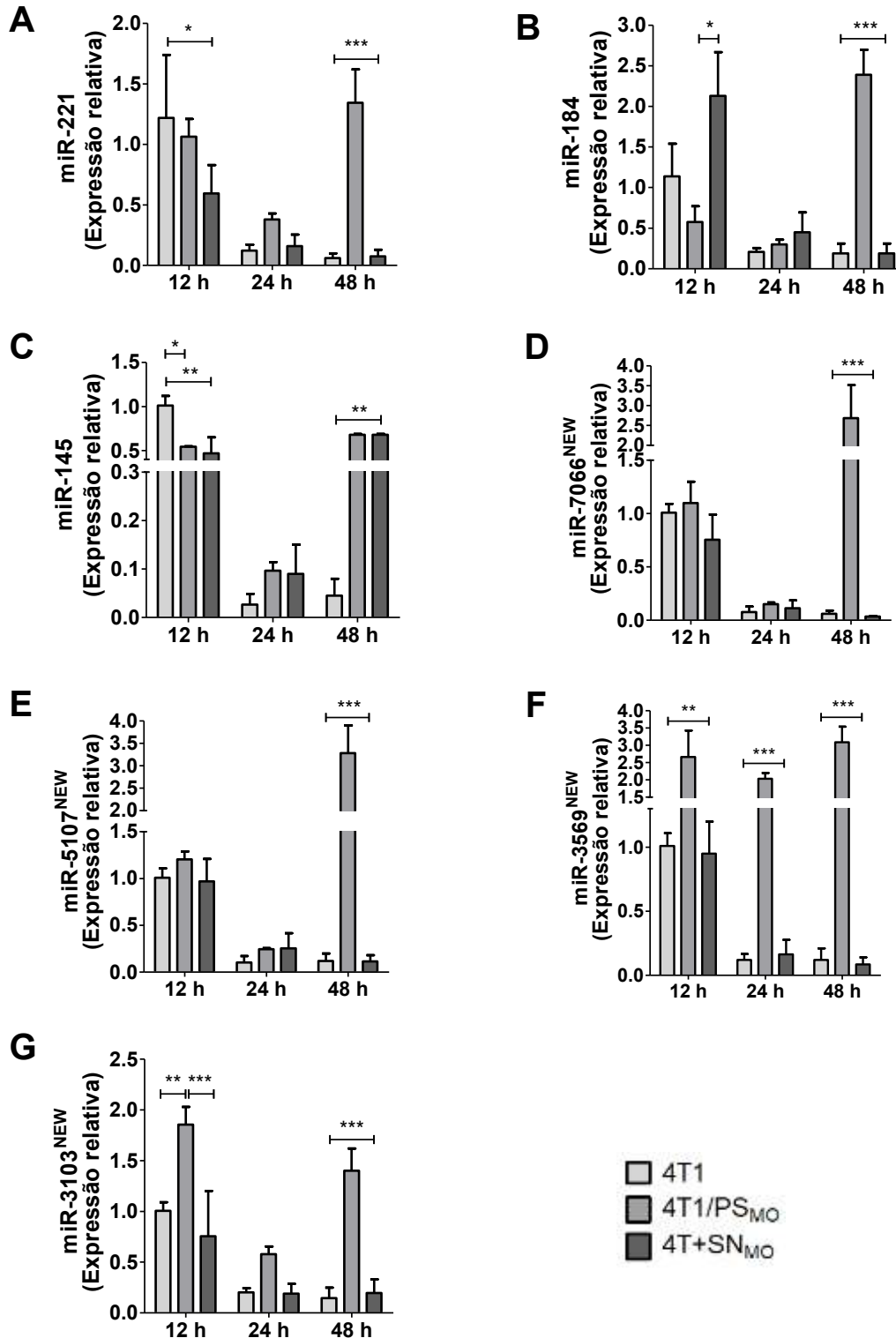
Análises dos microRNAs já descritos pela literatura revelaram redução expressiva do transcrito **miR-221** no grupo 4T1+SN_{MO} em relação aos grupos 4T1 e 4T1/PS_{MO} no tempo de 12 h ($p < 0,05$). No entanto em 48 h, o grupo 4T1/PS_{MO} exibiu aumento expressivo em relação aos grupos 4T1 e 4T1+SN_{MO} ($p < 0,001$) (Figura 11 A).

Em contraste com a expressão de **miR-221** em 12 h, análises do transcrito **miR-184** no mesmo tempo mostrou aumento expressivo no grupo 4T1+SN_{MO} quando comparado ao grupo 4T1/PS_{MO} ($p < 0,01$). Já em 48 h, os dados foram semelhantes, o grupo 4T1/PS_{MO} evidenciou aumento expressivo em relação aos grupos 4T1 e 4T1+SN_{MO} ($p < 0,001$) (Figura 11 B). Já a expressão do **miR-145** estava aumentada significativamente no grupo 4T1 em relação aos grupos 4T1/PS_{MO} ($p < 0,05$) e 4T1+SN_{MO} ($p < 0,01$) em 12 h. Em 48 h houve redução expressiva do grupo 4T1 em relação aos grupos 4T1/PS_{MO} e 4T1+SN_{MO} (ambos com $p < 0,01$) (Figura 11 C).

Interessantemente, os microRNAs ainda inéditos, encontrados por análises de bioinformática revelaram que, células 4T1/PS_{MO} apresentam aumento expressivo dos transcritos **miR-7066^{NEW}**, **miR-5107^{NEW}**, **miR-3569^{NEW}** e **miR-3103^{NEW}** no grupo 4T1/PS_{MO} no tempo de 48 h em relação aos grupos 4T1 e 4T1+SN_{MO} (todos com $p < 0,001$) (Figura 11 D, E, F e G, respectivamente).

Aumento significativo também foi observado no transcrito de **miR-3569^{NEW}** no mesmo grupo 4T1/PS_{MO} quando comparados aos grupos 4T1 e 4T1+SN_{MO} nos tempos de 12 h ($p < 0,01$) e 24 h ($p < 0,001$) (Figura 11 F). Já a expressão do **miR-3103^{NEW}** estava também significativamente aumentada no grupo 4T1/PS_{MO} em relação aos grupos 4T1 ($p < 0,01$) e 4T1+SN_{MO} ($p < 0,001$) em 12 h (Figura 11 G).

Figura 11 - Análise da expressão de microRNAs reguladores da proteína Tnfaip2 em células 4T1. Células de adenocarcinoma mamário 4T1 cocultivadas com macrófagos e separadas por *cell sorter* (4T1/PS_{MO}), células tumorais cultivadas sozinhas (4T1) e células 4T1 cultivadas com sobrenadante de macrófagos (4T1+SN_{MO}) por 12, 24 e 48 horas, foram analisadas por qPCR, para avaliação da expressão dos microRNAs: miR-221 (A), miR-184 (B), miR-145 (C), miR-7066^{NEW} (D), miR-5107^{NEW} (E), miR-3569^{NEW} (F), miR-3103^{NEW} (G) e possível regulação na expressão da proteína Tnfaip2. Em 12 e 48 h: N=2, e 24 h: N= 3. Teste ANOVA de 2 vias e pós teste de Bonferroni (*p<,05, **p< 0,01, ***p< 0,001).



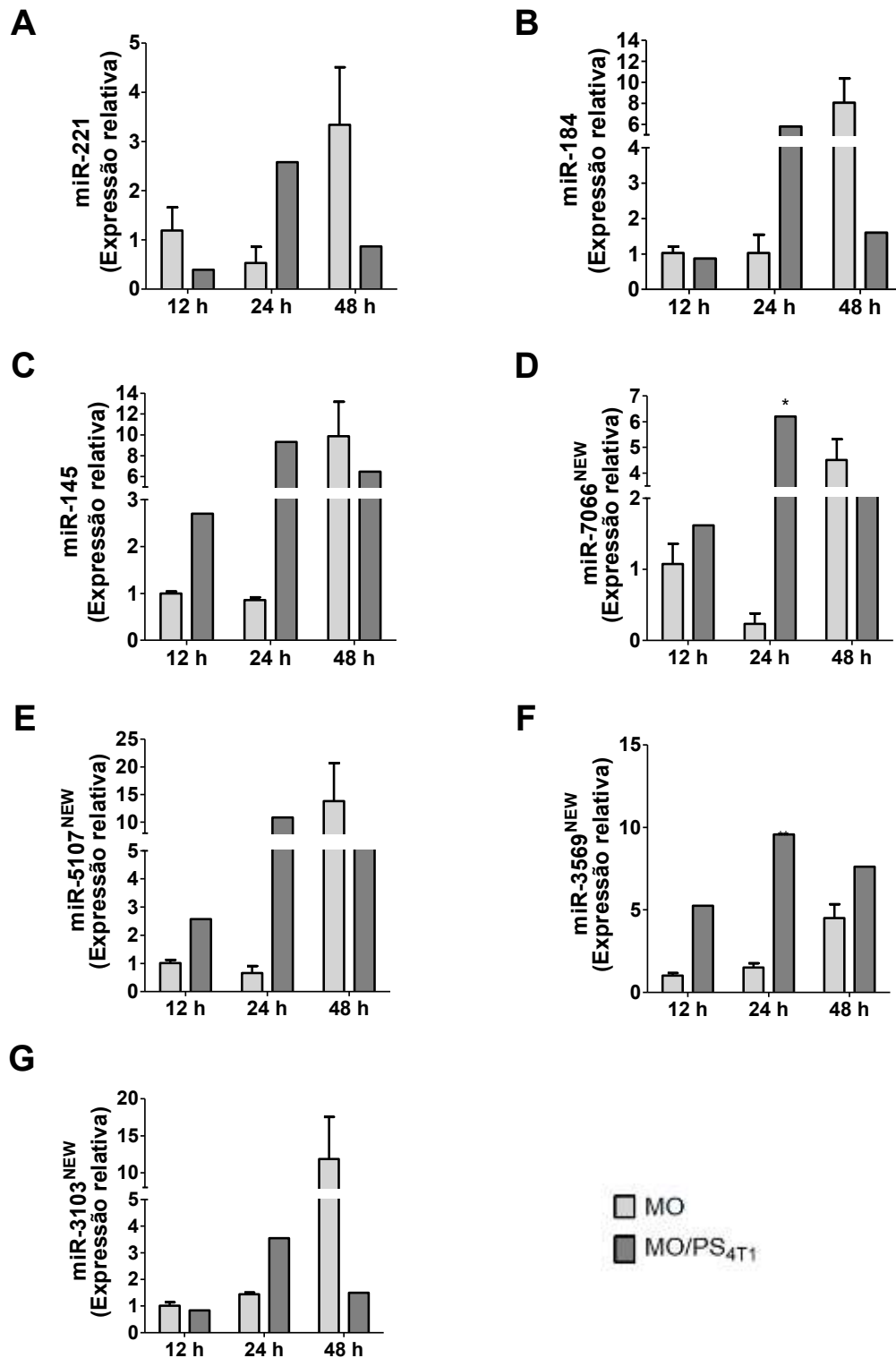
5.9.2. Macrófagos

Em paralelo, análises dos microRNAs já descritos na literatura nos macrófagos, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, tampouco nos diferentes tempos. Somente foram observadas algumas tendências de aumento ou redução em alguns casos, isto devido ao número de replicatas usadas ($n=2$). Assim, o transcrito para **miR-221** mostrou tendências de aumento no grupo MO/PS_{4T1} em relação ao MO no tempo de 24 h e, no grupo de MO em relação ao MO/PS_{4T1}, no tempo de 48 h (Figura 12 A). Na expressão do **miR-184** também foi observada tendência de aumento no grupo MO/PS_{4T1} quando comparado ao grupo MO em 24 h, no entanto em 48 h houve inversão, com tendência a redução da expressão no grupo MO/PS_{4T1} e aumento no grupo MO (Figura 12 B). Já análises da expressão do **miR-145** mostraram forte tendência de aumento no grupo MO/PS_{4T1} em relação ao grupo MO nos tempos de 12 e 24 h. Em contraste em 48 h o grupo MO/PS_{4T1} apresentou leve tendência à redução em relação ao grupo MO (Figura 12 C).

Em relação aos microRNAs preditos pela bioinformática, diferenças estatísticas foram encontradas, embora tendências ao aumento ou a redução também foram observadas na maioria deles. Análises de expressão do **miR-7066^{NEW}** mostraram aumento significativo no grupo MO/PS_{4T1} em relação ao grupo MO, no tempo de 24 h ($p<0,05$). No entanto em 48 h, MO/PS_{4T1} demonstrou tendência de redução em relação ao grupo MO (Figura 12 D). A expressão do **miR-5107^{NEW}** mostrou tendência de aumento no grupo MO/PS_{4T1} em relação ao grupo MO em 24 h e, tendência de redução no grupo MO/PS_{4T1} em relação ao grupo MO, em 48h. (Figura 12 E).

Em contraste, transcritos do **miR-3569^{NEW}** apresentaram tendência de aumento no grupo MO/PS_{4T1} em relação ao grupo MO, nos tempos de 12, 24 e 48 h ($p<0,01$) (Figura 12 F). Já análises do **miR-3103^{NEW}** apresentaram tendências de aumento no grupo MO em relação aos macrófagos do grupo MO/PS_{4T1}, no tempo de 48 h (Figura 12 G).

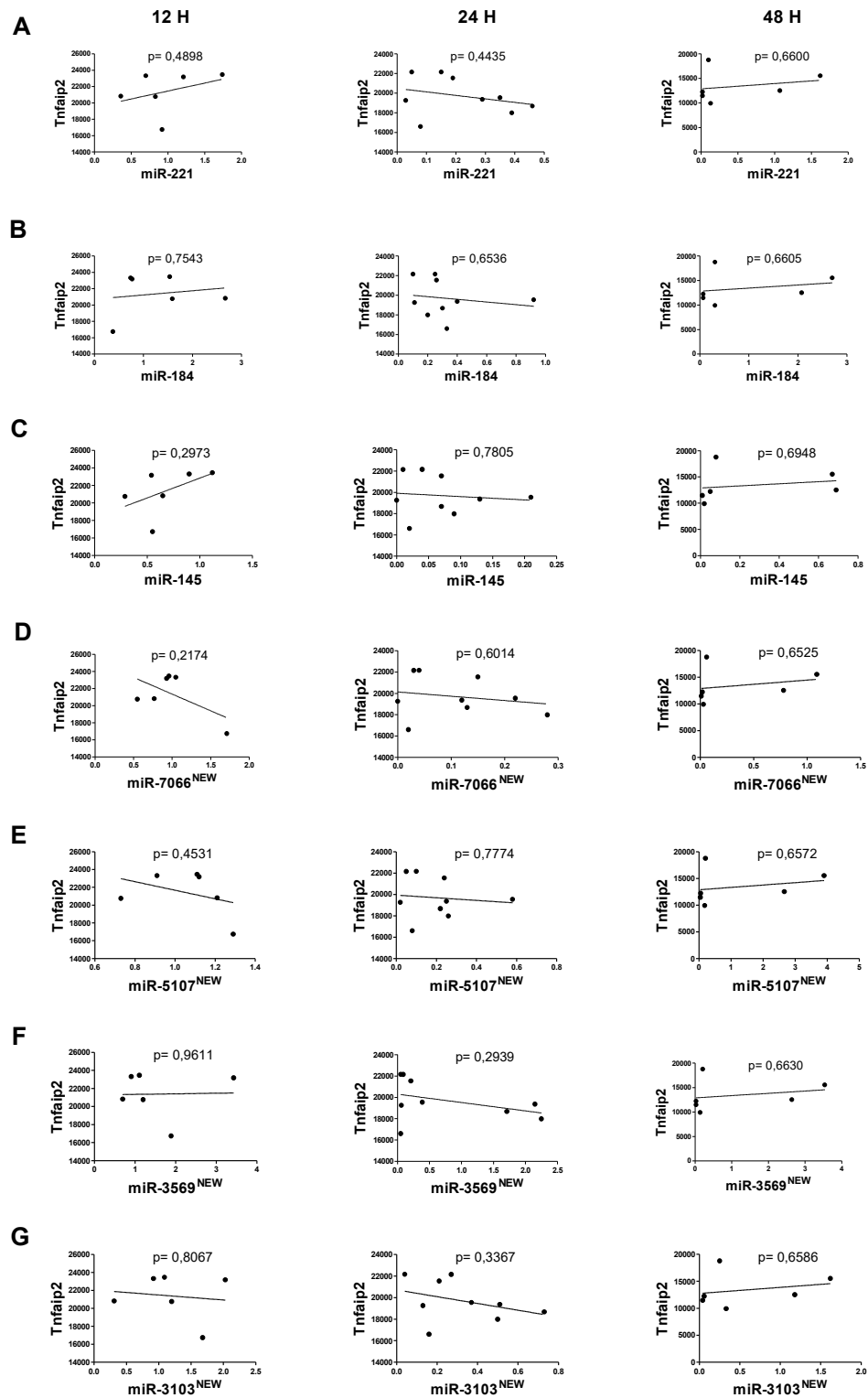
Figura 12 - Análise da expressão de microRNAs reguladores da proteína Tnfaip2 em macrófagos. Macrófagos de monoculturas (MO) ou, cocultivados com células de adenocarcinoma mamário 4T1 e separados por *cell sorter* (MO/PS_{4T1}) por 12, 24 e 48 horas, foram analisados por qPCR, para avaliação da expressão dos microRNAs: miR-221 (A), miR-184 (B), miR-145 (C), miR-7066^{NEW} (D), miR-5107^{NEW} (E), miR-3569^{NEW} (F), miR-3103^{NEW} (G) e possível regulação na expressão da proteína Tnfaip2. MO: N=2 em 12 e 48h, e N=3 em 24 h; MO/PS_{4T1}: N=1 (*pool* de 2 amostras em 12 e 48h; e *pool* de 3 amostras em 24 h). Teste ANOVA de 2 vias e pós teste de Bonferroni (*p<,05, **p< 0,01, ***p< 0,001).



5.6. Correlação da expressão dos microRNAs com a expressão da proteína Tnfaip2 nas células 4T1

Para verificar a possível correlação da expressão dos microRNAs (miR-221, miR-184, miR-145, miR-7066^{NEW}, miR-5107^{NEW}, miR-3569^{NEW} e miR-3103^{NEW}) com a expressão da proteína Tnfaip2 nas culturas de células 4T1 em diferentes condições, testes estatísticos de correlação foram aplicados, segundo item 4.8 de material e métodos. Entretanto, não foi observada correlação significativa em nenhum dos grupos ou tempos observados (Figura 13).

Figura 13 - Correlação entre a expressão dos transcritos de microRNAs com a expressão da proteína Tnfaip2 nas células tumorais 4T1. Análise da correlação entre a expressão dos microRNAs miR-221 (A), miR-184 (B), miR-145 (C), miR-7066^{NEW} (D), miR-5107^{NEW} (E), miR-3569^{NEW} (F), miR-3103^{NEW} (G) e expressão da proteína Tnfaip2 em células de adenocarcinoma mamário 4T1 cultivadas sozinhas, células 4T1 cocultivadas com macrófagos e células 4T1 cultivadas com sobrenadante de macrófagos, nos tempos 12, 24 e 48 horas. Teste de correlação de Pearson e Spearman.



5.7. Avaliação da expressão de enzimas e proteínas envolvidas na biogênese de microRNAs em células 4T1 e macrófagos.

Com o intuito de excluir a possibilidade que alterações na expressão dos microRNAs possa estar regulada por enzimas responsáveis pela biogênese dos mesmos, níveis dos transcritos de DROSHA, DICER e EXPO5 foram avaliados em ambas as células nas diferentes condições.

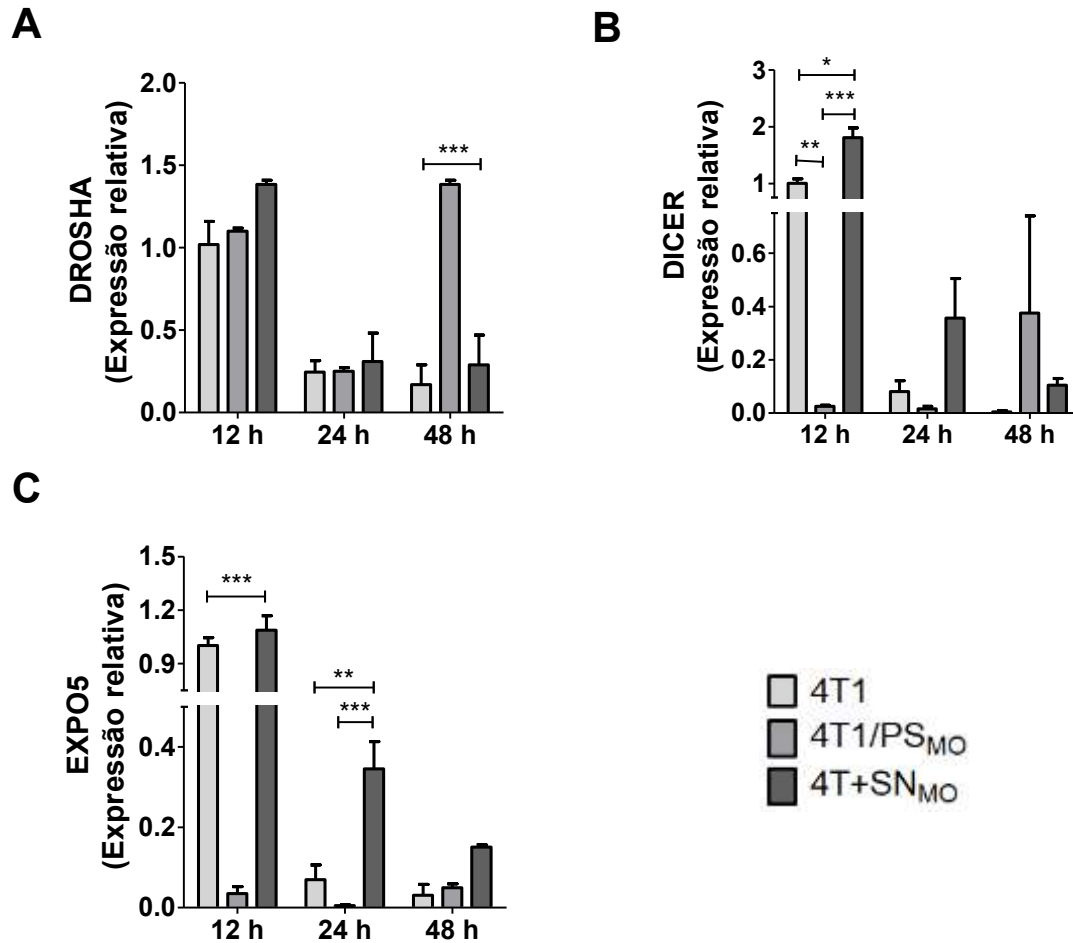
5.11.1. Células 4T1

Análises de expressão do transcrito da enzima **DROSHA** no tempo de 48 h mostraram aumento expressivo no grupo 4T1/PS_{MO} em relação aos grupos 4T1 ou 4T1+SN_{MO} (ambos com $p < 0,001$) (Figura 14 A).

Em relação à expressão do transcrito da enzima **DICER**, células 4T1/PS_{MO} mostraram redução significativa quando comparadas aos níveis de expressão nos grupos 4T1 ($p < 0,01$) ou 4T1+SN_{MO} ($p < 0,001$) no tempo de 12 h. Nesse mesmo tempo, células 4T1+SN_{MO} apresentaram aumento significativo em relação ao grupo 4T1 ($p < 0,05$) (Figura 14 B).

Análises de expressão do transcrito EXPORTINA5 (EXPO5) mostraram também em 12 h, níveis reduzidos de **EXPO5** em células 4T1/PS_{MO} quando comparadas com os grupos 4T1 ou 4T1+SN_{MO} no tempo de 12 h ($p < 0,001$). Semelhante à expressão de DICER, no tempo de 24 h, células 4T1+SN_{MO} demonstraram aumento da expressão da EXPO5 em relação aos grupos 4T1 ($p < 0,01$) e 4T1/PS_{MO} ($p < 0,001$) (Figura 14 C).

macrófagos e separadas por *cell sorter* (4T1/PS_{MO}) ou com sobrenadante de macrófagos (4T1+SN_{MO}) por 12, 24 e 48 horas, foram analisadas por qPCR, para análise da expressão dos transcritos das enzimas (A) DROSHA, (B) DICER e (C) proteína EXPO5 (C), envolvidas na biogênese de microRNAs. Em 12 e 48 h: N=2, e 24 h: N= 3. Teste ANOVA de 2 vias e pós teste de Bonferroni (*p<,05, **p< 0,01, ***p< 0,001).



Fonte: Próprio autor

5.11.2. Macrófagos

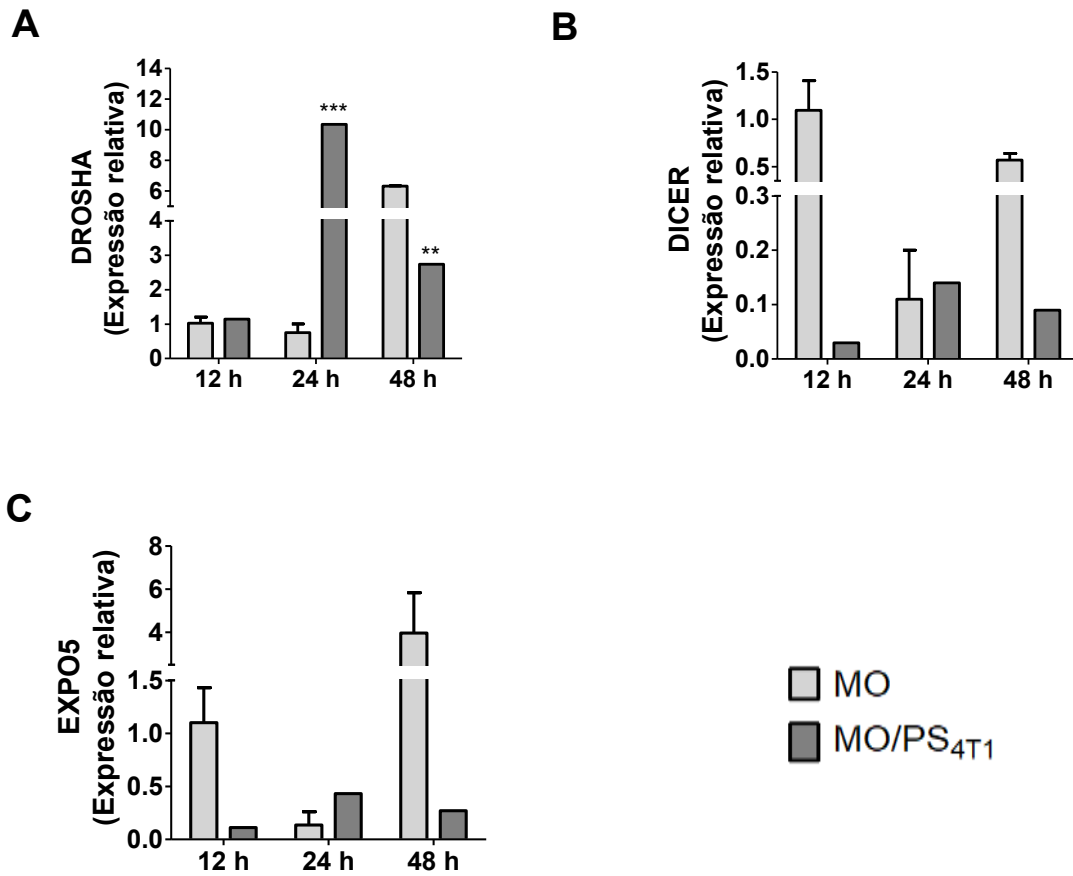
Análises da expressão dos transcritos das enzimas e proteínas envolvidas na

biogênese dos microRNAs em macrófagos mostraram que, após cocultura com células 4T1 (MO/PS_{4T1}) aumentam a expressão da enzima **DROSHA** no tempo de 24 h em relação aos macrófagos das monoculturas (MO; $p < 0,001$). No entanto no tempo de 48 h, células MO/PS_{4T1}, mostraram redução dessa enzima em relação ao grupo MO ($p < 0,01$) (Figura 15 A).

Em relação aos níveis de **DICER**, MO tendem a aumentar a expressão desse transcrito quando comparado com níveis expressos no MO/PS_{4T1}, nos tempos de 12 e 48 h (Figura 15 B). Já em relação a expressão de EXPORTINA5, MO tendem a aumentar a expressão dos transcritos para **EXPO5** quando comparados ao grupo MO/PS_{4T1}, nos tempos de 12 e 48 h, (Figura 15 C).

Figura 15 - Análise da expressão dos transcritos das enzimas e proteínas envolvidas na biogênese de microRNAs em macrófagos. Macrófagos de monoculturas (M) ou, cocultivados com células de adenocarcinoma mamário 4T1 e separados por *cell sorter* (MO/PS_{4T1}), por 12, 24 e 48 horas, foram analisados por qPCR, para análise da expressão dos transcritos das enzimas (A) DROSHA, (B) DICER, (C) EXPO5, envolvidas na biogênese

de microRNAs. MO: N=2 em 12 e 48h, e N=3 em 24 h; MO/PS_{4T1}: N=1 (*pool* de 2 amostras em 12 e 48h; e *pool* de 3 amostras em 24 h). Teste ANOVA de 2 vias e pós teste de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Fonte: Próprio autor

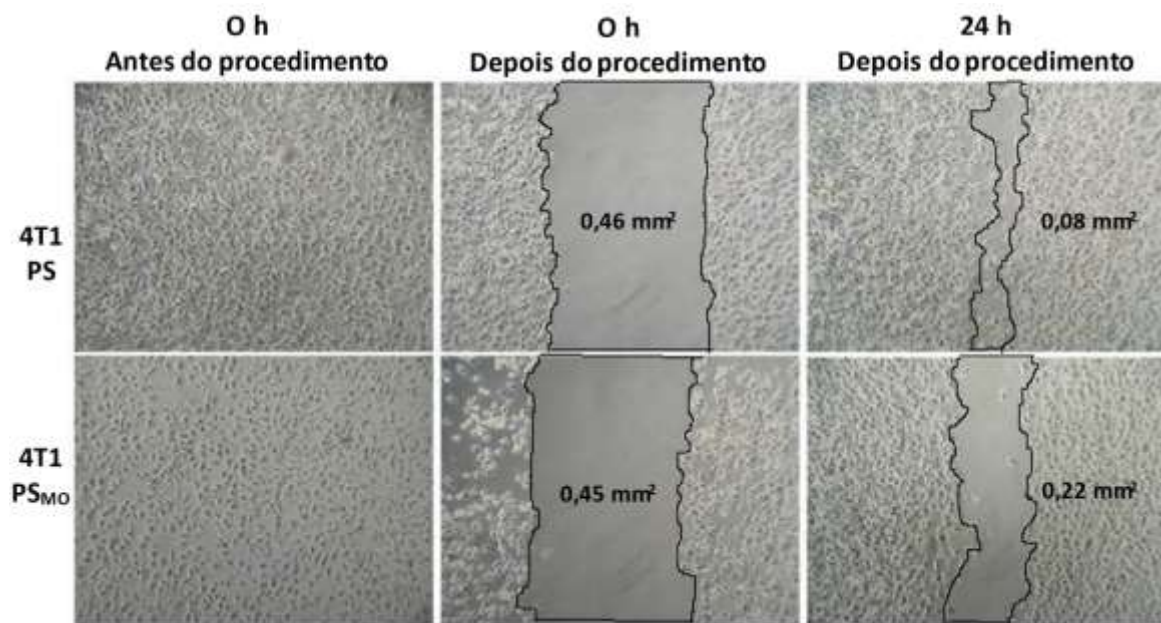
5.8. Análise da capacidade migratória de células 4T1 após interações com macrófagos

Com o intuito de avaliar a capacidade de migração das células tumorais 4T1 após interações com macrófagos, células 4T1 cultivadas sozinhas (4T1/PS) ou cocultivadas com macrófagos (4T1/PS_{MO}), foram coletadas após separação por *cell sorter* e submetidas ao ensaio

de *wound healing* - realizado em conjunto com outro estudo de nosso grupo (55).

Conforme demonstrado na Figura 16, foi possível observar que as células 4T1/PS demonstraram migração celular acentuada, conforme esperado para esse modelo, com área estimada em aproximadamente $0,08 \text{ mm}^2$ e fechamento quase total da “ferida”. Em contraste, as células 4T1/PS_{MO} demonstraram redução da capacidade migratória, com área da “ferida” estimada em aproximadamente $0,22 \text{ mm}^2$, representando ser 2,75 vezes maior que a área das células cultivadas sozinhas.

Figura 16 – Análise da capacidade de migração das células 4T1 após interações com macrófagos. Células de adenocarcinoma mamário de monoculturas (4T1/PS) ou cocultivadas com macrófagos (4T1/PS_{MO}) foram coletadas após *cell sorter* e cultivadas em placas de 12 poços por 24h. Após adesão das células, sobrenadantes das culturas foram removidos para adição de meio completo R10. Após 24 h, um risco vertical foi realizado em cada poço, seguido de 3 lavagens consecutivas com PBS 1X para eliminar células soltas e, em seguida, meio R10 novo foi acrescentado. Células foram fotografadas em 0 h antes e após realização da ferida e 24 h após o procedimento.



Fonte: Próprio autor

5.9. Análise do perfil de citocinas durante cocultivos de células 4T1 com macrófagos.

Para avaliar o perfil de citocinas predominante em cada condição de cultura que possa ter favorecido a redução na migração das células 4T1, sobrenadantes de monoculturas de células 4T1 ou macrófagos ou, cocultivo de ambas células ou, cultivadas com sobrenadante do outro tipo celular, foram coletados nos tempos 12, 24 e 48 h, para avaliar a produção das citocinas IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6 por citometria de fluxo.

Níveis significativamente aumentados da citocina MCP1 foram observados nos grupos MO+4T1 e 4T1+SN_{MO}, nos tempos 12 e 24 h, quando comparados com os grupos das monoculturas (MO ou 4T1) ($P < 0,001$). Já no tempo de 48 h o grupo 4T1+SN_{MO} mostrou aumento significativo em relação à produção nos grupos MO, MO+4T1 e 4T1 (todos com $p < 0,001$) (Figura 17 A).

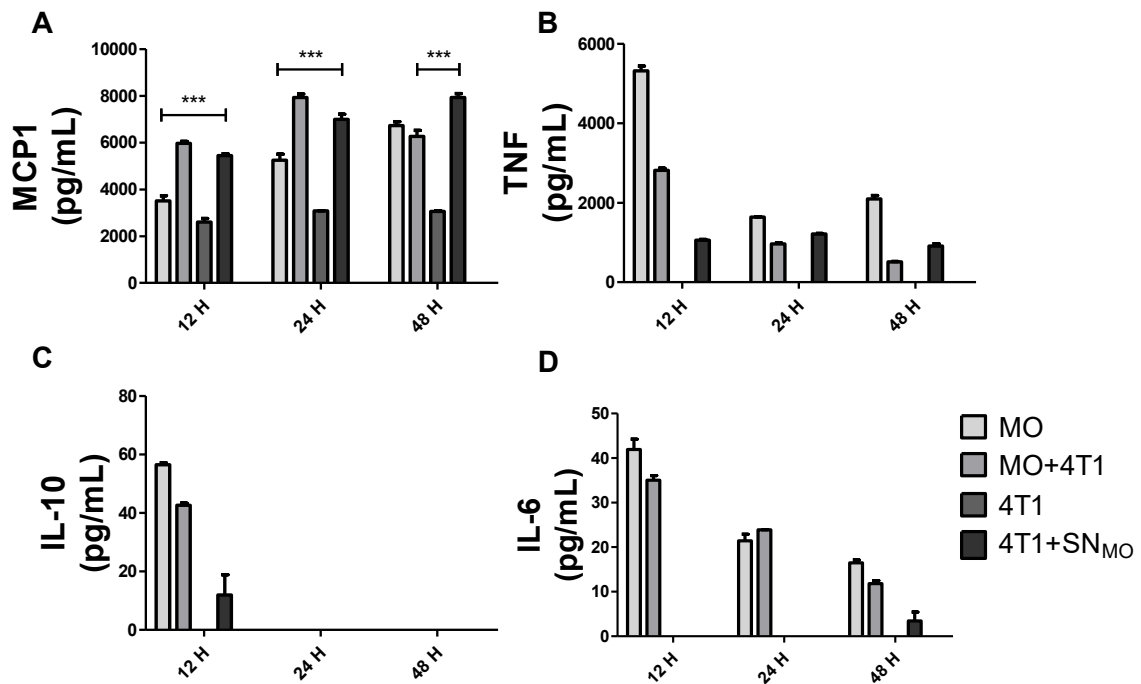
Em relação à produção de TNF, células 4T1 não tiveram produção e análises entre os grupos MO, MO+4T1 e 4T1+SN_{MO} nos tempos analisados, não apresentaram diferenças estatísticas nos níveis desta citocina (Figura 17 B).

Produção da citocina IL-10 foi observada somente no tempo de 12 h, nos grupos MO, MO+4T1 e 4T1+SN_{MO}, sem significado estatístico entre eles. Não houve produção nas células 4T1 das monoculturas em nenhum dos tempos analisados (Figura 17 C).

Em relação à citocina IL-6, produção foi observada nos grupos MO e MO+4T1 em todos os tempos, porém sem diferenças estatísticas com os outros grupos. No grupo 4T1+SN_{MO} níveis da citocina foram dosados somente no tempo de 48 h. O grupo 4T1 não apresentou produção dessa citocina em nenhum dos tempos analisados (Figura 17 D).

As citocinas IL-12p70 e IFN- γ não apresentaram produção em nenhuma das condições analisadas, por isto dados não foram representados.

Figura 17 – Análise do perfil de citocinas durante cocultivos de células tumorais 4T1 e macrófagos. Citocinas do kit CBA-*inflammation*: MCP1 (A), TNF (B), IL-10 (C) e IL-6 (D), foram dosadas por citometria de fluxo, em monoculturas de macrófagos (MO), coculturas de macrófagos com células tumorais 4T1 (MO+4T1), monoculturas de células tumorais (4T1) e monoculturas de células 4T1 com sobrenadante de macrófagos (4T1+SN_{MO}), nos tempos de 12, 24 e 48 h. N=3. Teste ANOVA de 2 vias e pós teste de Bonferroni (***) $p < 0,001$.



Fonte: Próprio autor

6. DISCUSSÃO

Nanotubos de tunelamento (TNTs) são extensões de membrana, em sua maioria abertas, circundados por bicamada lipídica e sua classificação pressupõe alguns critérios estabelecidos como: conter F-actina, não aderir ao substrato e permitir conexão entre células, mediando transferência de material (23). Entretanto, sua caracterização é tecnicamente

desafiadora por não existir marcadores específicos, uma vez que a F-actina está presente em outros tipos de saliências citoplasmáticas e, por serem estruturas muito frágeis e sensíveis ao processo de marcação e fixação (56)

Além dos nanotubos de tunelamento, saliências extracelulares podem ser chamadas de estruturas tipo TNTs, por compartilharem algumas características em comum, no entanto, não há relatos sobre a capacidade dessas estruturas de conectarem células entre si (57). Essas estruturas incluem filopódios, citonemas, *streamers* e nanopódios, com funções ainda pouco conhecidas (57). As estruturas mais bem descritas até o momento são os citonemas, capazes de captar e transportar moléculas do meio extracelular para o interior da célula agindo como sensores, e os filopódios, que demonstraram capacidade de capturar exossomos do meio extracelular para fibroblastos primários humanos (57,58). Assim, no presente trabalho foi realizada a quantificação de prolongamentos citoplasmáticos tipo TNTs, uma vez que há indícios que as saliências citoplasmáticas podem utilizar a mesma maquinaria celular usada na formação dos TNTs e que, os filopódios possam ser inclusive seus precursores (57).

Os resultados obtidos com a contagem de estruturas tipo TNTs demonstraram redução significativa nos cocultivos de células 4T1 e macrófagos, nos tempos de 6 e 12 h em relação às células cultivadas sozinhas, sugerindo ocorrer um tempo de adaptação dos tipos celulares durante a cocultura. Já nos tempos de 24 e 48 h houve aumento significativo da formação dessas estruturas em relação aos grupos cultivados sozinhos.

No presente estudo, as células não foram marcadas individualmente, dessa maneira não foi possível especificar a célula de origem dos prolongamentos citoplasmáticos avaliados. Entretanto, estudos indicaram que células de câncer de mama quando cocultivadas com macrófagos expressaram aumento de TNTs que continham membrana de ambas as células ou só de macrófagos (30) e que a presença de nanotubos de tunelamento heterotípicos, mediando a comunicação entre os dois tipos celulares, foi um mecanismo facilitador para aquisição de maior potencial agressivo pelas células neoplásicas (30).

Resultados semelhantes de aumento de TNTs nas células tumorais após contato com macrófagos foram encontrados em estudo com células de câncer de mama de ratos (MTLn3) quando cocultivadas com macrófagos RAW/LR5, ou seu sobrenadante (59). Contudo esse estudo demonstrou que, a comunicação de macrófagos via TNTs é dependente da sinalização EGF-EGFR (*Epidermal Growth Factor - Epidermal Growth Factor Receptor*) o qual depende da expressão da proteína Tnfaip2 nos macrófagos para favorecer maior potencial de migração e invasão de linhagens celulares de câncer de mama em ratos (MTLn3) e também

em humanos (MCF-7 e MDA-MB-231) (59).

Ainda há muito a ser esclarecido sobre as proteínas e vias de sinalização envolvidas na formação dos TNTs. Um estudo com astrócitos demonstrou que em resposta ao estresse, a expressão de TNTs ocorreu pela ativação da proteína p53 que regulou positivamente o fator de crescimento epidérmico (EGF) ativando a via Akt/PI3k/mTOR para induzir a polimerização de actina (60). Esse processo sugere ser mediado pela proteína Tnfaip2 que funcionou com a pequena GTPase RalA associada a Ras demonstrando envolvimento no rearranjo do citoesqueleto de actina (61).

Embora esteja bem descrito a crucial participação da proteína Tnfaip2 para favorecer e estimular a formação de TNTs em macrófagos, ainda em células tumorais o papel dessa proteína no mecanismo de formação de nanotubos não foi bem esclarecido. Por isso, no presente estudo análises da expressão da proteína Tnfaip2 em células de adenocarcinoma mamário 4T1 em diferentes condições de cultura, demonstraram que, essas células quando cocultivadas com macrófagos (4T1+(MO)), tendem a reduzir a expressão da proteína Tnfaip2, em relação às células 4T1 cultivadas sozinhas (4T1), após 12, 24 ou 48 horas de cultura. De forma semelhante, nos tempos de 12 e 24 h, células 4T1 cultivadas com meio condicionado com sobrenadante de cultura de macrófagos (4T1+SN_{MO}) apresentam também tendência a concentrações menores de Tnfaip2 quando comparadas ao grupo 4T1. Em contraste, macrófagos após cocultivos com 4T1 (MO+4T1) apresentaram aumento significativo da expressão da proteína Tnfaip2 em 24 h e com a mesma tendência de aumento nos outros tempos (12 e 48 h) quando comparados as monoculturas de macrófagos (MO). Em conjunto, esses resultados indicaram que o contato direto entre células tumorais e macrófagos propiciou a modulação da expressão da proteína Tnfaip2, negativamente em células 4T1 e positivamente em macrófagos, possivelmente pela comunicação intercelular via nanotubos de tunelamento.

Resultados distintos foram encontrados com células de tumor de mama de rato MTLn3 que apresentaram aumento da expressão da proteína Tnfaip2 quando cocultivadas com macrófagos RAW/LR5 ou com macrófagos de medula (59). Entretanto, este resultado pode ter sido devido ao reconhecimento de antígenos provenientes de espécies diferentes e não necessariamente pelo contato com macrófagos.

Em contraposição com análises da expressão da proteína, avaliação dos níveis de transcrito do gene *Tnfaip2* demonstraram aumento expressivo nas células tumorais 4T1 após cocultivos com macrófagos (4T1PS_{MO}) em relação às células 4T1 nos tempos de 12 e 48h ou em relação as 4T1+SN_{MO} no tempo de 48h. Nos tempos de 12 e 24 h, embora não sejam estatisticamente significantes, tendências ao aumento foram também observadas no grupo

4T1PS_{MO} em relação ao grupo 4T1 ou ao grupo 4T1+SN_{MO}, no tempo de 24 h. Estes resultados indicam que a expressão reduzida da proteína independe dos níveis altos do transcrito de *Tnfaip2* e podem ser devidos a mecanismos de regulação pós-transcricionais.

Em contraste com as células 4T1, macrófagos após cocultura com células tumorais (MOPS_{4T1}) apresentam tendência ao aumento na expressão gênica de *Tnfaip2* em 12 h e 24 h, acompanhando os dados obtidos na expressão proteica. Entretanto, no tempo de 48 h, os MOPS_{4T1} demonstraram tendência a reduzir a expressão genica do *Tnfaip2*, mesmo que tenha aumento na expressão da proteína, o que sugere mais uma vez participação de mecanismos de regulação pós-transcricional.

Embora a função do gene *Tnfaip2* ainda seja pouco conhecida, sua expressão foi considerada anormal em doenças infecciosas virais e bacterianas (34). Em diversos tipos de câncer foi considerado oncogene com base em seu envolvimento no crescimento, proliferação, angiogênese e motilidade (34), inclusive em modelo de câncer de mama, a depleção da expressão desse gene induziu diminuição da adesão, migração e invasão celular (35).

Associando os resultados até então obtidos, pode-se observar que cocultivo de células 4T1 e MO induziram aumento de estruturas tipo TNTs e que por sua vez foram induzidas pela proteína Tnfaip2, cuja expressão gênica estava aumentada em ambas as células em até 24 h. Entretanto ao observar a expressão da proteína, somente em macrófagos estava aumentada, enquanto que em células 4T1 estava diminuída, sugerindo que, mecanismos de controle epigenético induzidos pelo contato com macrófagos podem estar participando da *downregulation* dessa proteína em células tumorais.

Sabendo que um dos mecanismos epigenéticos envolve a regulação da tradução de proteínas via microRNAs específicos para cada proteína alvo, sete (7) microRNAs, cujo alvo molecular é a Tnfaip2, foram avaliados tanto no RNA total das células 4T1 e macrófagos, antes e após contato físico (cocultivos) ou interação com fatores solúveis de ambas as células. Dos 7, três (3) microRNAs foram selecionados da literatura (miR-221, miR-184 e miR-145) por apresentarem estudos relacionados ao câncer e/ou com Tnfaip2 (62–64), enquanto os outros quatro (4) foram sugeridos por predição pela bioinformática (miR-7066^{NEW}, miR-5107^{NEW}, miR-3569^{NEW}, miR-3103^{NEW}) e não existiam estudos publicados correlacionando-os com câncer ou Tnfaip2.

A participação de microRNAs como potentes reguladores da expressão genica, têm sido descritos em diversas doenças. No câncer, observa-se frequentemente redução de miRNAs maduros como consequência de alterações genéticas, modulação epigenética, disfunção em sua biogênese ou repressão transcricional generalizada (43,65). Os microRNAs aqui avaliados

demonstraram expressões variadas nos diferentes tipos celulares e períodos observados.

Em geral, células 4T1 após contato com macrófagos e separadas por *cell sorter* (4T1/PS_{MO}) exibiram aumento dos miR-7066^{NEW}, miR-5107^{NEW}, miR-3569^{NEW}, miR-3103^{NEW}, miR-211 e miR-184 em 48 h. Esses resultados sugerem que esses microRNAs estiveram envolvidos na regulação da expressão da proteína Tnfaip2, uma vez que os níveis do transcrito desse gene estavam aumentados, porém a expressão da proteína estava diminuída. Em contraste, dados preliminares realizados com um pool de três amostras individuais de macrófagos cocultivos com células 4T1 e separados por *cell sorting* (MOPS_{4T1}) exibiram aumento em geral dos miR-7066^{NEW}, miR-5107^{NEW}, miR-3569^{NEW}, miR-221, miR-184 e miR-145 no tempo de 24 h, porém no tempo de 48 h os miR-7066^{NEW}, miR-5107^{NEW}, miR-221, miR-184 e miR-145 apresentaram redução e, somente o miR-3569^{NEW} apresentou tendência ao aumento.

Esses achados podem indicar uma possível transferência desses microRNAs via TNTs dos MO para células 4T1, talvez com o intuito de regular a expressão da proteína Tnfaip2 nas células tumorais e possível mecanismo de controle da tumorigênese e/ou progressão/invasão tumoral. A transferência intercelular de miRNA pode ser mediada por diferentes vias, como exossomos e contatos diretos célula-célula via Junção Gap ou TNTs (66–68), inclusive o transporte de miRNAs via TNTs já foi descrita *in vitro* entre modelos de células estromais, osteossarcoma e câncer de ovário (69).

Dentre os microRNAs descritos na literatura, destaca-se um trabalho de revisão que indicou o envolvimento do miR221 em diversos processos na carcinogênese, tais como proliferação, apoptose, metástase e quimioresistência (70). Outros estudos demonstraram que o miR-221 participa da regulação de alguns supressores tumorais como p27 e p57 em diversos tipos de câncer (71). Comumente encontra-se super expresso em cânceres epiteliais, incluindo mama (72) e foi correlacionado com menor sobrevida em pacientes com cânceres de pâncreas e colorretal (73,74). Em relação a Tnfaip2, o miR-221 regulou negativamente a expressão pós transcricional da proteína, e reverteu resposta inflamatória e apoptose de células neuronais, após lesão isquêmica de medula espinhal (62).

O miR-184 já foi correlacionado com o gene *Tnfaip2* em um estudo que demonstrou que um polimorfismo no sítio de ligação do microRNA está associado ao risco de câncer gástrico (63). Em gliomas, a mimetização da super expressão do miR-184 *in vitro*, indicou diminuição da proliferação e invasão celular e, *in vivo*, demonstrou redução do tumor xenoenxertado com aumento de apoptose (75). Entretanto em outro estudo, o miR-184 estava super expresso em tumores de língua, e sua inibição provocou aumento da porcentagem de

células apoptóticas e redução da proliferação celular, indicando seu potencial oncogênico nesse modelo (76). Em neuroblastoma, a super expressão de miR-184 demonstrou *in vitro* efeito antiproliferativo, e *in vivo* redução do crescimento tumoral do xenoinxerto (77).

O miR-145 quando super expresso foi capaz de reduzir a expressão da proteína Tnfaip2, reduzindo a migração, invasão e viabilidade celular em câncer de pulmão de células não pequenas (64). Um artigo de revisão verificou que regulação positiva do miR-145 induziu maior sensibilidade à radioterapia e aos mediadores quimioterápicos, em diversos tipos de câncer (78). Outro estudo demonstrou ainda que a regulação positiva desse microRNA está diretamente relacionada com a modulação de genes envolvidos na formação de metástases, podendo ser considerado um possível alvo terapêutico (79).

Com o intuito de correlacionar a expressão de microRNAs e a expressão proteica de Tnfaip2, análises de correlação de Person foram realizadas em todos os grupos experimentais avaliados, entretanto não foram encontrados dados de significância que comprovem correlação entre eles. Em paralelo, levando em consideração que a expressão de miRNAs é diretamente regulada pela expressão de enzimas participantes da sua biogênese, a expressão dos transcritos destas enzimas foi também avaliado. Assim, células 4T1PS_{MO} demonstraram aumento significativo da expressão da Droscha em 48 h e redução significativas das enzimas Dicer em 12 h e Expo5 em 12 e 24 h. Já nos MOPS_{4T1} apresentaram aumento da Droscha em 24 h e redução em 48 h. As enzimas Dicer e Expo5 estavam reduzidas em relação ao grupo MO nos tempos de 24 e 48 h. Estes dados, sugerem fortemente que nas células 4T1PS_{MO} os microRNAs são liberados “sem restrições” e por isso conseguem regular/impedir o aumento da expressão proteica de Tnfaip2. Já nos MOPS_{4T1} os transcritos destas enzimas estão em geral reduzidos, portanto os microRNAs são retidos e não conseguem impedir a expressão da proteína.

Em estudos com câncer de mama e ovário, foi observada regulação negativa da expressão das enzimas Dicer e Droscha, participantes do processo de maturação dos microRNAs (80,81). No entanto, em estudos com adenocarcinoma de pulmões e próstata, foram observados super expressão de Dicer em determinadas fases da carcinogênese, inclusive sendo correlacionada com pior prognóstico (82,83). Em outro estudo elegante observaram variações das expressões de Dicer e Droscha em diferentes estágios do câncer de pele (84).

Considerando que a proteína Tnfaip2 têm sido associada com progressão e metástases de células tumorais (27), a redução da expressão dessa proteína nas células 4T1 pode indicar possível diminuição do potencial metastático dessas células após contato com MO. Assim, este achado, correlaciona com dados anteriores do grupo, nos quais demonstraram que em ensaios *in vitro* de *wound healing*, células 4T1 após contato com MO diminuem

significativamente sua capacidade migratória. Trabalhos semelhantes corroboram com os resultados observados nesse estudo, demonstrando que a depleção da proteína Tnfaip2 reduziu drasticamente a proliferação, migração e invasão celular em células HK1 de carcinoma nasofaríngeo e carcinoma esofágico de células escamosas em humanos (85,86).

Em paralelo, uma vez que fatores solúveis presente no microambiente também podem influenciar o fenótipo das células tumorais favorecendo migração, invasão e metástases, no presente estudo também foram avaliados os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias. Resultados mostraram predomínio da expressão da citocina MCP-1, com aumento significativo nos cocultivos de células 4T1 e MO, 4T1+SN_{MO} nos tempos 12 e 24 h, e do grupo 4T1+SN_{MO} no tempo 48 h. Já as citocinas TNF, IL-10 e IL-6 não foram expressas pelas células 4T1, entretanto essas células tumorais induziram a diminuição dessas citocinas, principalmente do TNF nos macrófagos após interação de ambas células, o que sugere uma forte regulação do processo inflamatório que pode favorecer em parte a progressão tumoral.

A citocina MCP-1 também chamada CCL2 é uma proteína quimioatraente de monócitos (precursores de macrófagos), e está envolvida em doenças inflamatórias e cânceres (87). No microambiente tumoral é altamente expressa em células tumorais e não tumorais, sendo associada com crescimento, motilidade, invasão e metástase em diferentes tipos de câncer (87). Em um trabalho com células de câncer de mama 4T1, o aumento da citocina MCP-1 produzida por células estromais promoveu metástase pulmonar, no entanto a mesma citocina produzida pelas células 4T1 pareceu não ter o mesmo efeito na cascata metastática (88). Nesse mesmo estudo a deficiência de MCP-1 no ambiente tumoral resultou em necrose precoce, diminuição da infiltração de macrófagos e redução da angiogênese (88). Em outro estudo, pacientes com caquexia no câncer pancreático apresentaram baixos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β , IFN- γ e TNF, apresentando aumento apenas da MCP-1(89). Em associação com os trabalhos mencionados, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram aumento da expressão de MCP-1 pelas células 4T1, talvez com o intuito de atrair macrófagos e subverte-los a um perfil facilitador na progressão tumoral, já no contexto de redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-6), pode sugerir um mecanismo de regulação do processo inflamatório como descrito acima.

Tomando em conjunto os dados do presente trabalho, o modelo atual apresenta evidências que macrófagos regulam o fenótipo agressivo das células 4T1 reduzindo a expressão da proteína Tnfaip2 nessas células após 48h, por mecanismos epigenéticos envolvendo a participação dos miR-211, miR-184 e dos microRNAs inéditos na literatura miR-7066^{NEW}, miR-5107^{NEW}, miR-3569^{NEW} e miR-3103^{NEW}, que poderiam inclusive ser transportados via

TNTs dos MO para as células 4T1.

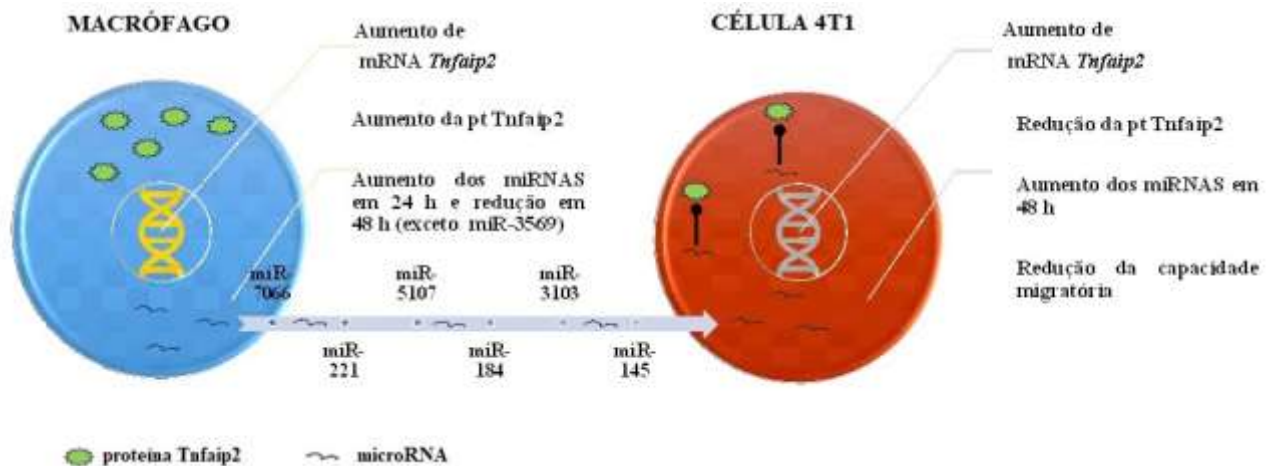
Embora ensaios adicionais sejam necessários para melhor caracterizar e quantificar TNTs nas células 4T1 após contato com MO, os dados aqui apresentados são inéditos e sugerem que as estruturas tipo TNTs quantificadas neste trabalho possam ser saliências citoplasmáticas diferentes dos TNTs, uma vez que a proteína Tnfaip2 associada com a formação de TNTs em MO foi reduzida nas células 4T1 após contato com MO. Ou ainda possam ser TNTs predominantemente oriundos de macrófagos, uma vez que a proteína estava aumentada nessas células, talvez estimulados para transporte de material e possível controle da tumorigênese.

Contudo, os dados aqui apresentados mostram de forma inédita que a *downregulation* da proteína Tnfaip2 via microRNAs nas células tumorais pode ser um mecanismo molecular importante para controle de metástases em cânceres agressivos como é o adenocarcinoma mamário. Portanto, estes dados são de grande relevância porque além de contribuir na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas interações entre células tumorais e células do sistema imunológico, mostram a participação de novos miRNAs na regulação de possíveis alvos terapêuticos para o controle ou prevenção de metástases.

7. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos nesse estudo foi possível concluir que, as células tumorais 4T1 apresentam redução da proteína Tnfaip2 após contato direto com macrófagos, com fortes evidências que envolvem regulação epigenética mediada por microRNAs. Além disso, como a proteína Tnfaip2 está diretamente envolvida na formação de nanotubos de tunelamento, facilitando a carcinogênese, a participação dos macrófagos nesse modelo sugere ação inibitória, por possível transferência de microRNAs regulatórios dos macrófagos às células tumorais, provavelmente por contato direto via nanotubos de tunelamento.

Figura 18 - Esquema dos resultados obtidos.



Fonte: Próprio autor

8. PERSPECTIVAS

MicroRNAs são importantes moduladores epigenéticos e seu papel funcional na carcinogênese tem muito a ser elucidado. Nossos achados são considerados inéditos em células 4T1 e alta relevância para estudos adicionais mais aprofundados para melhor compreensão dos mecanismos epigenéticos envolvidos na modulação da expressão da proteína *Tnfaip2* e sua participação na formação de TNTs em células tumorais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory [Internet]. [citado 12 de maio de 2023]. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>
2. Cassali GD, Lavalle GE, Nardi AB de, Ferreira E, Bertagnolli AC, Estrela-Lima A, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz J Vet Pathol* [Internet]. 2011 [citado 5 de abril de 2023];4(2):153–80. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113227023>
3. Owen LN. A comparative study of canine and human breast cancer. *Invest Cell Pathol*. 1º de outubro de 1979;2(4):257–75.
4. Deitas TFH, Gaspary JFP. Efeitos biopsicossociais e psiconeuroimunológicos do câncer sobre o paciente e familiares. *Rev Bras Cancerol* [Internet]. 1997 [citado 21 de julho de 2023];43(2):117–25. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/2844>

5. O conceito de câncer na perspectiva de tutores de cães e gatos investigação. [citado 21 de julho de 2023]; Disponível em: <https://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/article/view/1225>
6. Pfuetzenreiter MR, Zylbersztajn A, Avila-Pires FD de. Evolução histórica da medicina veterinária preventiva e saúde pública. *Ciênc Rural* [Internet]. outubro de 2004 [citado 5 de julho de 2023];34:1661–8. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/7hTnJvzGvvLSHrnk9gZmRfv/?lang=pt>
7. Vieira DSC, Dufloth RM, Schmitt FCL, Zeferino LC. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. *Rev Bras Ginecol E Obstetrícia* [Internet]. janeiro de 2008 [citado 5 de abril de 2023];30:42–7. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rbgo/a/S8V9byPjWjHrFZWQtcXt7qL/?lang=pt>
8. Oncoguia I. Instituto Oncoguia. [citado 12 de maio de 2023]. Tipos de Câncer de Mama. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tipos-de-cancer-de-mama/1382/34/>
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [Internet]. 4 de março de 2011 [citado 30 de abril de 2021];144(5):646–74. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(11\)00127-9](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(11)00127-9)
10. Onuchic AC, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. *Rev Med* [Internet]. 19 de março de 2010 [citado 13 de novembro de 2020];89(1):21–31. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/46269>
11. Digital PE. Câncer de mama e o microambiente tumoral: uma perspectiva molecular e evolutiva [Internet]. Plataforma Espaço Digital. [citado 23 de maio de 2023]. Disponível em: <https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/19027>
12. Yang M, McKay D, Pollard JW, Lewis CE. Diverse Functions of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* :13.
13. Sousa S, Brion R, Lintunen M, Kronqvist P, Sandholm J, Mönkkönen J, et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res* [Internet]. dezembro de 2015 [citado 23 de novembro de 2020];17(1):101. Disponível em: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-015-0621-0>
14. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res.* novembro de 2016;39(11):1588–96.
15. Williams CB, Yeh ES, Soloff AC. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *Npj Breast Cancer* [Internet]. dezembro de 2016 [citado 23 de novembro de 2020];2(1):15025. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/npjbcancer201525>
16. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* [Internet]. 13 de agosto de 2014 [citado 23 de novembro de 2020];6(3):1670–90. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2072-6694/6/3/1670>

17. Mills CD. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. *Front Immunol* [Internet]. 5 de maio de 2015 [citado 27 de maio de 2023];6:212. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4419847/>
18. Hu W, Li X, Zhang C, Yang Y, Jiang J, Wu C. Tumor-associated macrophages in cancers. *Clin Transl Oncol* [Internet]. 1º de março de 2016 [citado 23 de novembro de 2020];18(3):251–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1373-0>
19. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Interleukin-13–regulated M2 Macrophages in Combination with Myeloid Suppressor Cells Block Immune Surveillance against Metastasis. *Cancer Res* [Internet]. 15 de dezembro de 2005 [citado 23 de novembro de 2020];65(24):11743–51. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-0045>
20. Ch'ng ES, Tuan Sharif SE, Jaafar H. In human invasive breast ductal carcinoma, tumor stromal macrophages and tumor nest macrophages have distinct relationships with clinicopathological parameters and tumor angiogenesis. *Virchows Arch Int J Pathol*. março de 2013;462(3):257–67.
21. Silvestro DOM. Caracterização morfológica e funcional dos macrófagos RAW 264.7 após interações com células de adenocarcinoma mamário 4T1 (estudo in vitro); 2018; São Paulo. Disponível em: https://repositorio.unip.br/wp-content/uploads/tainacan-items/212/22729/patologia_deboradeoliveiramsilvestro.pdf
22. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. *Science* [Internet]. 13 de fevereiro de 2004 [citado 17 de setembro de 2020];303(5660):1007–10. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/303/5660/1007>
23. Zurzolo C. Tunneling nanotubes: Reshaping connectivity. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 1º de agosto de 2021 [citado 26 de abril de 2023];71:139–47. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067421000375>
24. Sisakhtnezhad S, Khosravi L. Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur J Cell Biol* [Internet]. outubro de 2015 [citado 28 de julho de 2020];94(10):429–43. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171933515000692>
25. Nawaz M, Fatima F. Extracellular Vesicles, Tunneling Nanotubes, and Cellular Interplay: Synergies and Missing Links. *Front Mol Biosci* [Internet]. 18 de julho de 2017 [citado 3 de setembro de 2020];4:50. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2017.00050/full>
26. Ariazi J, Benowitz A, De Biasi V, Den Boer ML, Cherqui S, Cui H, et al. Tunneling Nanotubes and Gap Junctions—Their Role in Long-Range Intercellular Communication during Development, Health, and Disease Conditions. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 17 de outubro de 2017 [citado 26 de agosto de 2020];10:333. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00333/full>
27. Lou E. Intercellular Conduits in Tumors: The New Social Network. *Trends Cancer* [Internet]. janeiro de 2016 [citado 26 de agosto de 2020];2(1):3–5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405803315000849>

28. Önfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K, Davis DM. Cutting Edge: Membrane Nanotubes Connect Immune Cells. *J Immunol* [Internet]. 1º de agosto de 2004 [citado 26 de julho de 2023];173(3):1511–3. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1511>
29. Bukoreshtliev NV, Wang X, Hodneland E, Gurke S, Barroso JFV, Gerdes HH. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett*. 6 de maio de 2009;583(9):1481–8.
30. Hanna SJ, McCoy-Simandle K, Leung E, Genna A, Condeelis J, Cox D. Tunneling nanotubes, a novel mode of tumor cell–macrophage communication in tumor cell invasion. *J Cell Sci* [Internet]. 1º de fevereiro de 2019 [citado 13 de novembro de 2020];132(3):jcs223321. Disponível em: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.223321>
31. Hanna SJ, McCoy-Simandle K, Miskolci V, Guo P, Cammer M, Hodgson L, et al. The Role of Rho-GTPases and actin polymerization during Macrophage Tunneling Nanotube Biogenesis. *Sci Rep* [Internet]. dezembro de 2017 [citado 13 de novembro de 2020];7(1):8547. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-08950-7>
32. Guo F, Yuan Y. Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Proteins in Malignant Tumors: Progress and Prospects. *OncoTargets Ther* [Internet]. abril de 2020 [citado 13 de novembro de 2020];Volume 13:3303–18. Disponível em: <https://www.dovepress.com/tumor-necrosis-factor-alpha-induced-proteins-in-malignant-tumors-progr-peer-reviewed-article-OTT>
33. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. setembro de 2003;3(9):745–56.
34. Jia L, Shi Y, Wen Y, Li W, Feng J, Chen C. The roles of TNFAIP2 in cancers and infectious diseases. *J Cell Mol Med* [Internet]. novembro de 2018 [citado 13 de novembro de 2020];22(11):5188–95. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcmm.13822>
35. Jia L, Zhou Z, Liang H, Wu J, Shi P, Li F, et al. KLF5 promotes breast cancer proliferation, migration and invasion in part by upregulating the transcription of TNFAIP2. *Oncogene* [Internet]. abril de 2016 [citado 30 de abril de 2021];35(16):2040–51. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/onc2015263>
36. Niwa N, Tanaka N, Hongo H, Miyazaki Y, Takamatsu K, Mizuno R, et al. TNFAIP2 expression induces epithelial-to-mesenchymal transition and confers platinum resistance in urothelial cancer cells. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. novembro de 2019;99(11):1702–13.
37. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. junho de 2002;3(6):415–28.
38. Dai H, Wang Z. Histone Modification Patterns and Their Responses to Environment. *Curr Environ Health Rep* [Internet]. março de 2014 [citado 19 de abril de 2021];1(1):11–21. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40572-013-0008-2>
39. Ibeagha-Awemu EM, Zhao X. Epigenetic marks: regulators of livestock phenotypes and conceivable sources of missing variation in livestock improvement programs. *Front Genet*

- [Internet]. 2015 [citado 19 de maio de 2021];6. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2015.00302/full>
40. Bohacek J, Mansuy IM. A guide to designing germline-dependent epigenetic inheritance experiments in mammals. *Nat Methods* [Internet]. março de 2017 [citado 19 de maio de 2021];14(3):243–9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmeth.4181>
 41. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. setembro de 2016 [citado 29 de abril de 2021];8(9). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5008069/>
 42. Moosavi A, Ardekani AM. Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran Biomed J* [Internet]. novembro de 2016 [citado 29 de abril de 2021];20(5):246–58. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5075137/>
 43. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* [Internet]. 1º de dezembro de 2012 [citado 7 de fevereiro de 2023];6(6):590–610. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1574789112000981>
 44. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*. junho de 2008;9(6):465–76.
 45. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 10 de agosto de 2001;293(5532):1074–80.
 46. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 23 de fevereiro de 2007;128(4):693–705.
 47. Lin SL, Miller JD, Ying SY. Intronic MicroRNA (miRNA). *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2006 [citado 23 de maio de 2021];2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1559912/>
 48. Pennisi E. ENCODE Project Writes Eulogy for Junk DNA. *Science* [Internet]. 7 de setembro de 2012 [citado 4 de fevereiro de 2023];337(6099):1159–61. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.337.6099.1159>
 49. Palazzo AF, Lee ES. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet* [Internet]. 2015 [citado 3 de fevereiro de 2023];6. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2015.00002>
 50. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. julho de 2004;5(7):522–31.
 51. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA—implications for cancer. *Virchows Arch* [Internet]. 1º de janeiro de 2008 [citado 7 de abril de 2023];452(1):1–10. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00428-007-0532-2>
 52. Amaral BA do, Nonaka CFW, Freitas R de A, Souza LB de, Pinto LP. MicroRNAs: biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. *Odontol Clínico-Científica Online* [Internet]. junho de 2010 [citado 27 de maio de 2023];9(2):105–9. Disponível em: http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1677-38882010000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

53. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 1º de fevereiro de 2007;302(1):1–12.
54. Winkle M, El-Daly SM, Fabbri M, Calin GA. Noncoding RNA therapeutics — challenges and potential solutions. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. agosto de 2021 [citado 7 de abril de 2023];20(8):629–51. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41573-021-00219-z>
55. Xavier V. Avaliação e caracterização de vesículas extracelulares liberadas por células de adenocarcinoma mamário 4T1 após interação com macrófagos RAW 264.7. São Paulo. 2018; Disponível em: https://repositorio.unip.br/wp-content/uploads/tainacan-items/212/22693/medvet_VanessaXavier.pdf
56. Valappil DK, Raghavan A, Nath S. Detection and Quantification of Tunneling Nanotubes Using 3D Volume View Images. *J Vis Exp JoVE.* 31 de agosto de 2022;(186).
57. Austefjord MW, Gerdes HH, Wang X. Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure. *Commun Integr Biol* [Internet]. 30 de janeiro de 2014 [citado 5 de abril de 2023];7(1):e27934. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cib.27934>
58. Franchi M, Piperigkou Z, Riti E, Masola V, Onisto M, Karamanos NK. Long filopodia and tunneling nanotubes define new phenotypes of breast cancer cells in 3D cultures. *Matrix Biol Plus* [Internet]. 1º de maio de 2020 [citado 26 de abril de 2023];6–7:100026. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590028520300077>
59. Carter KP, Hanna S, Genna A, Lewis D, Segall JE, Cox D. Macrophages enhance 3D invasion in a breast cancer cell line by induction of tumor cell tunneling nanotubes. *Cancer Rep* [Internet]. 28 de agosto de 2019 [citado 30 de abril de 2023];2(6):e1213. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7254960/>
60. Wang Y, Cui J, Sun X, Zhang Y. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ* [Internet]. abril de 2011 [citado 30 de julho de 2023];18(4):732–42. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3131904/>
61. Hase K, Kimura S, Takatsu H, Ohmae M, Kawano S, Kitamura H, et al. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nat Cell Biol* [Internet]. dezembro de 2009 [citado 3 de setembro de 2020];11(12):1427–32. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ncb1990>
62. Zhao D, Deng SC, Ma Y, Hao YH, Jia ZH. miR-221 alleviates the inflammatory response and cell apoptosis of neuronal cell through targeting TNFAIP2 in spinal cord ischemia–reperfusion. *NeuroReport* [Internet]. 23 de maio de 2018 [citado 28 de maio de 2023];29(8):655. Disponível em: https://journals.lww.com/neuroreport/Abstract/2018/06010/miR_221_alleviates_the_inflammatory_response_and.8.aspx
63. Xu Y, Ma H, Yu H, Liu Z, Wang LE, Tan D, et al. The miR-184 Binding-Site rs8126 T>C Polymorphism in TNFAIP2 Is Associated with Risk of Gastric Cancer. *PLOS ONE* [Internet]. 28 de maio de 2013 [citado 3 de maio de 2023];8(5):e64973. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064973>

64. Li J, Song Y, Yu B, Yu Y. TNFAIP2 Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Targeted by miR-145-5p. *DNA Cell Biol.* julho de 2020;39(7):1256–63.
65. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* [Internet]. março de 2012 [citado 7 de fevereiro de 2023];4(3):143–59. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1002/emmm.201100209>
66. Bayraktar R, Van Roosbroeck K, Calin GA. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Mol Oncol* [Internet]. dezembro de 2017 [citado 26 de abril de 2023];11(12):1673–86. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1878-0261.12144>
67. Lemcke H, Steinhoff G, David R. Gap junctional shuttling of miRNA — A novel pathway of intercellular gene regulation and its prospects in clinical application. *Cell Signal* [Internet]. 1º de dezembro de 2015 [citado 26 de abril de 2023];27(12):2506–14. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656815002740>
68. Dupont M, Souriant S, Lugo-Villarino G, Maridonneau-Parini I, Vétellet C. Tunneling Nanotubes: Intimate Communication between Myeloid Cells. *Front Immunol* [Internet]. 25 de janeiro de 2018 [citado 3 de setembro de 2020];9:43. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00043/full>
69. Thayanithy V, Dickson EL, Steer C, Subramanian S, Lou E. Tumor-stromal cross talk: direct cell-to-cell transfer of oncogenic microRNAs via tunneling nanotubes. *Transl Res* [Internet]. novembro de 2014 [citado 5 de agosto de 2020];164(5):359–65. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524414001984>
70. Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, Condorelli G. miR221/222 in Cancer: Their Role in Tumor Progression and Response to Therapy. *Curr Mol Med* [Internet]. janeiro de 2012 [citado 28 de maio de 2023];12(1):27–33. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3673714/>
71. Song Q, An Q, Niu B, Lu X, Zhang N, Cao X. Role of miR-221/222 in Tumor Development and the Underlying Mechanism. *J Oncol* [Internet]. 24 de dezembro de 2019 [citado 28 de maio de 2023];2019:7252013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6942871/>
72. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 14 de fevereiro de 2006 [citado 28 de maio de 2023];103(7):2257–61. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1413718/>
73. Sarkar S, Dubaybo H, Ali S, Goncalves P, Kollepara SL, Sethi S, et al. Down-regulation of miR-221 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells through up-regulation of PTEN, p27(kip1), p57(kip2), and PUMA. *Am J Cancer Res.* 2013;3(5):465–77.
74. Liao D, Li T, Ye C, Zeng L, Li H, Pu X, et al. miR-221 inhibits autophagy and targets TP53INP1 in colorectal cancer cells. *Exp Ther Med* [Internet]. fevereiro de 2018 [citado

- 28 de maio de 2023];15(2):1712–7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5774445/>
75. Cheng Z, Wang HZ, Li X, Wu Z, Han Y, Li Y, et al. MicroRNA-184 inhibits cell proliferation and invasion, and specifically targets TNFAIP2 in Glioma. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 26 de março de 2015;34(1):27.
 76. Wong TS, Liu XB, Wong BYH, Ng RWM, Yuen APW, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res* [Internet]. 1º de maio de 2008 [citado 8 de maio de 2023];14(9):2588–92. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0666>
 77. Tivnan A, Foley NH, Tracey L, Davidoff AM, Stallings RL. MicroRNA-184-Mediated Inhibition of Tumour Growth in an Orthotopic Murine Model of Neuroblastoma. *Anticancer Res* [Internet]. 1º de novembro de 2010 [citado 8 de maio de 2023];30(11):4391–5. Disponível em: <https://ar.iarjournals.org/content/30/11/4391>
 78. Xu W, Hua Y, Deng F, Wang D, Wu Y, Zhang W, et al. MiR-145 in cancer therapy resistance and sensitivity: A comprehensive review. *Cancer Sci* [Internet]. 2020 [citado 8 de maio de 2023];111(9):3122–31. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cas.14517>
 79. Zeinali T, Mansoori B, Mohammadi A, Baradaran B. Regulatory mechanisms of miR-145 expression and the importance of its function in cancer metastasis. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 1º de janeiro de 2019 [citado 8 de maio de 2023];109:195–207. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218341635>
 80. Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med*. 18 de dezembro de 2008;359(25):2641–50.
 81. Yan M, Huang HY, Wang T, Wan Y, Cui SD, Liu Z zhen, et al. Dysregulated Expression of Dicer and Drosha in Breast Cancer. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 1º de abril de 2012 [citado 26 de abril de 2023];18(2):343–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12253-011-9450-3>
 82. Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, Luo J, Mantha G, Sobol RW, et al. Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1º de março de 2007;67(5):2345–50.
 83. Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, Acquafondata M, McHale T, Sobol RW, et al. Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol*. novembro de 2006;169(5):1812–20.
 84. Sand M, Gambichler T, Skrygan M, Sand D, Scola N, Altmeyer P, et al. Expression Levels of the microRNA Processing Enzymes Drosha and Dicer in Epithelial Skin Cancer. *Cancer Invest* [Internet]. 1º de junho de 2010 [citado 26 de abril de 2023];28(6):649–53. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/07357901003630918>
 85. Chen LC, Chen CC, Liang Y, Tsang NM, Chang YS, Hsueh C. A novel role for TNFAIP2: its correlation with invasion and metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Mod Pathol*

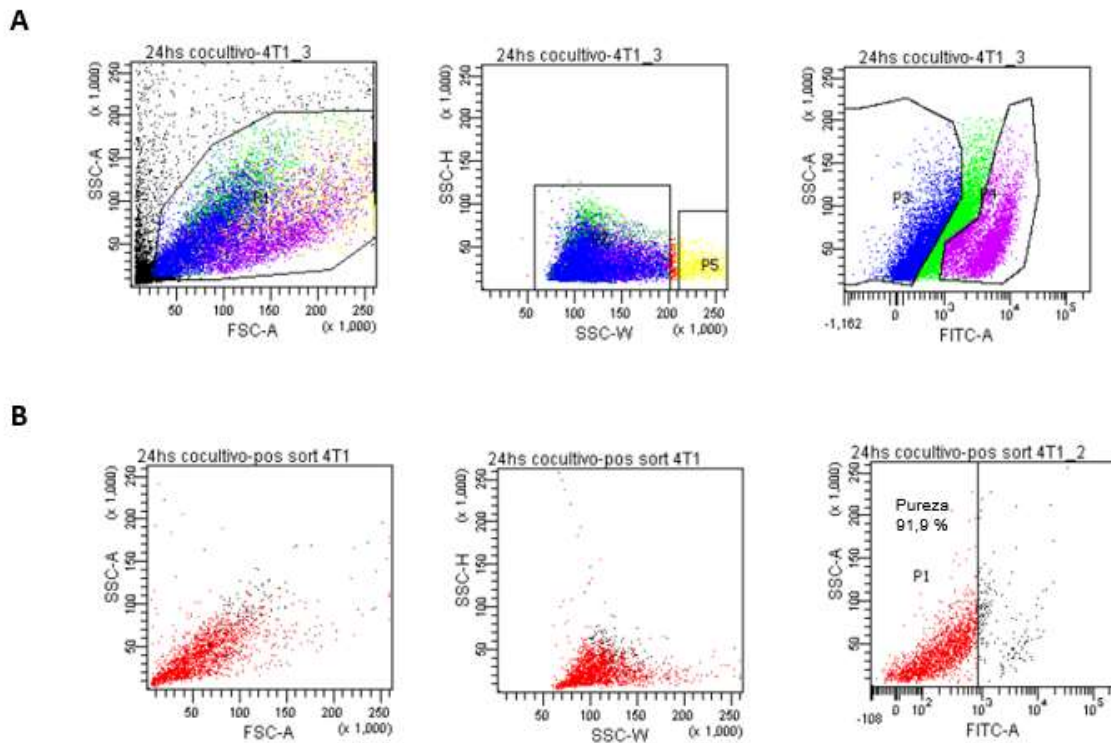
- [Internet]. 1º de fevereiro de 2011 [citado 17 de junho de 2023];24(2):175–84. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089339522202912X>
86. Xie Y, Wang B. Downregulation of TNFAIP2 suppresses proliferation and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncol Rep.* maio de 2017;37(5):2920–8.
 87. Liu JF, Chen PC, Chang TM, Hou CH. Monocyte Chemoattractant Protein-1 promotes cancer cell migration via c-Raf/MAPK/AP-1 pathway and MMP-9 production in osteosarcoma. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 23 de novembro de 2020 [citado 20 de julho de 2023];39(1):254. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01756-y>
 88. Yoshimura T, Howard OMZ, Ito T, Kuwabara M, Matsukawa A, Chen K, et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCL2 Produced by Stromal Cells Promotes Lung Metastasis of 4T1 Murine Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 18 de março de 2013 [citado 30 de julho de 2023];8(3):e58791. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601078/>
 89. Talbert EE, Lewis HL, Farren MR, Ramsey ML, Chakedis JM, Rajasekera P, et al. Circulating monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is associated with cachexia in treatment-naïve pancreatic cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* [Internet]. 2018 [citado 25 de julho de 2023];9(2):358–68. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcsm.12251>

10. MATERIAL SUPLEMENTAR

10.1. Purificação de células de adenocarcinoma mamário 4T1 pela técnica de *cell sorter* após cocultivo com macrófagos.

Células de adenocarcinoma mamário 4T1 cocultivadas com macrófagos foram submetidas à técnica de *cell sorter* para obtenção de populações de células 4T1 puras (single cells). Conforme demonstrado na Figura 19, foi utilizada a estratégia de *gates* para análises de populações viáveis (P1, Figura 19 A), após exclusão de doublets (P2, Figura 19 A) e as respectivas populações desejadas: macrófagos (P4: Anti-CD45/ FITC-A +) ou só 4T1 (P3: FITC-A -). Após separação, macrófagos e células tumorais 4T1 dos cocultivos foram coletadas com pureza de 91,9% (Figura 19 B).

Figura 19 - Purificação de células de adenocarcinoma mamário 4T1 após cocultivo com macrófagos. Macrófagos marcados (Anti-CD 45/ FITC +) e células tumorais 4T1 (Anti-CD 45/ FITC -), foram cultivadas por 48 horas para posterior purificação pela técnica de *cell sorter*. (A) *Pré-sorting* (B) *Pós-sorting*.



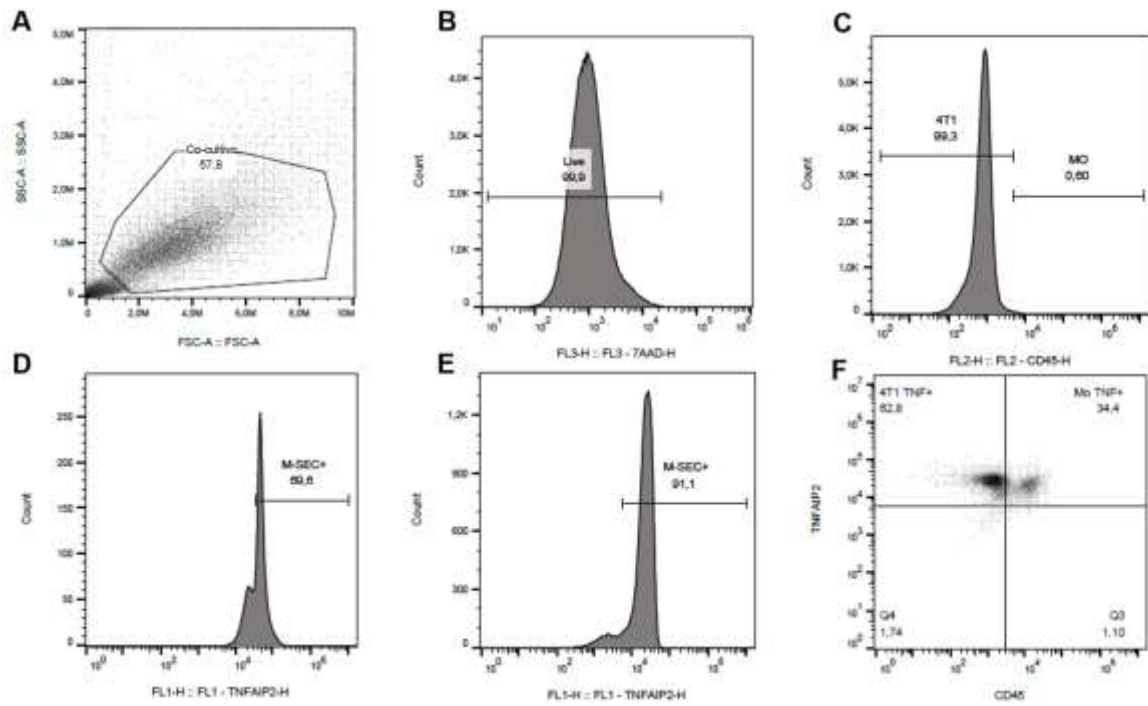
Fonte: Próprio autor

10.2. Estratégias de *gates* utilizadas na citometria de fluxo para análise da proteína

Tnfaip2.

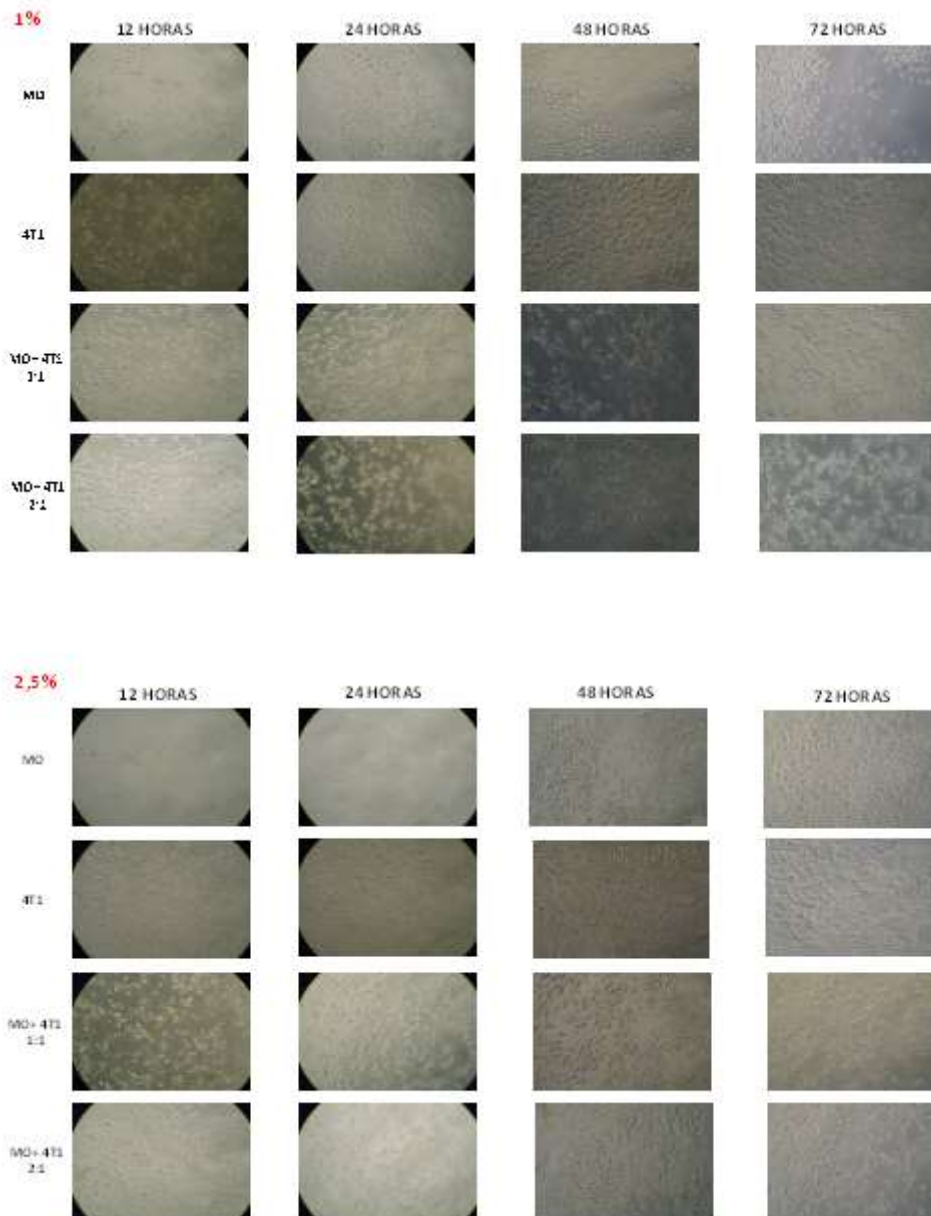
Conforme demonstrado em Figura 20, foram utilizadas estratégias de *Gates* para selecionar populações celulares de interesse e obtenção de médias de intensidade de fluorescência (MFI), na expressão positiva da proteína Tnfaip2 em células de adenocarcinoma mamário 4T1 e macrófagos, após cocultivos de ambas as células ou exposição aos seus sobrenadantes.

Figura 20 - Estratégias de *gates* utilizadas para análise da proteína Tnfaip2. Populações celulares foram selecionadas em R1 de acordo com a granulosidade (A). Células viáveis foram determinadas por marcadores 7AAD em Live cells (B). Macrófagos foram selecionados por expressão positiva para CD45+ e células de adenocarcinoma mamário 4T1 por expressão negativa para CD45- (C). Macrófagos (D) e células 4T1 (E) foram determinados para obter a média de intensidade de fluorescência (MFI) do marcador da proteína Tnfaip2+ (F).



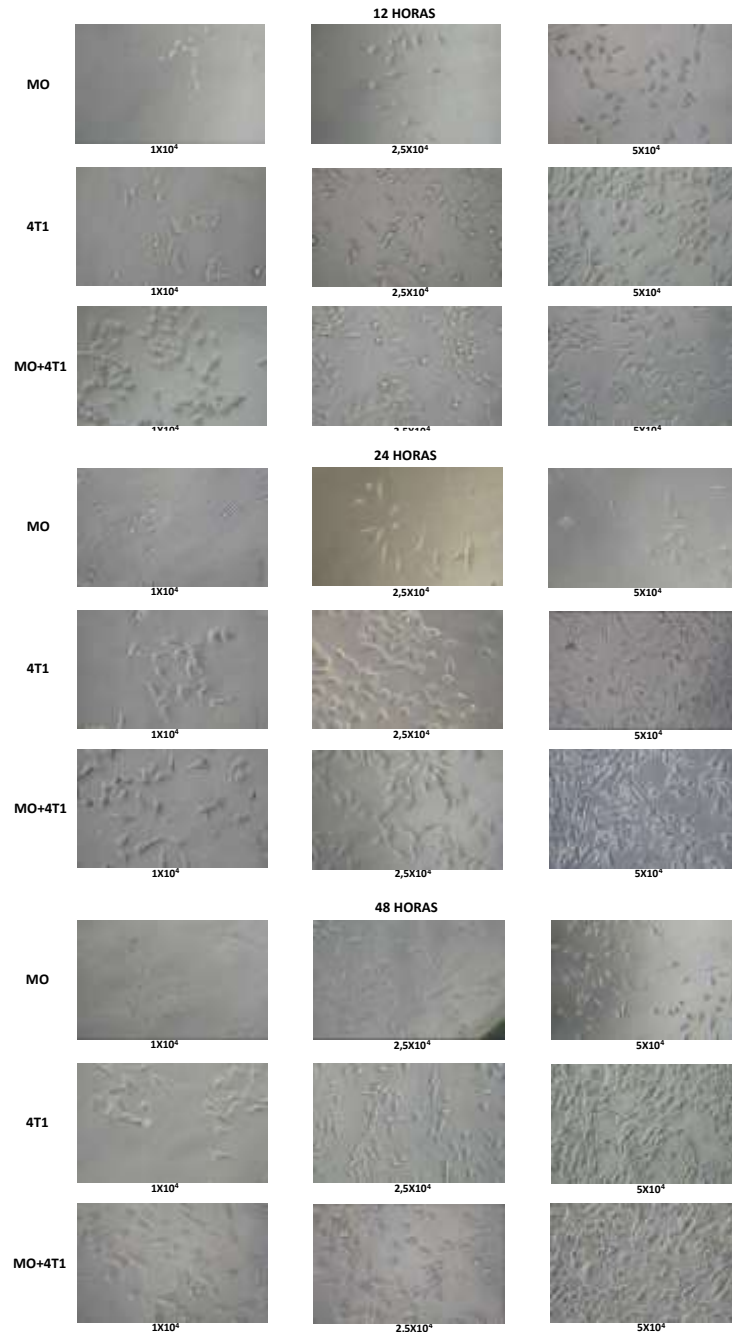
Fonte: Próprio autor

Figura 20 - Segunda padronização de culturas celulares para caracterização e quantificação de nanotubos. Monoculturas de macrófagos (MO), monoculturas de células de adenocarcinoma mamário (4T1) e coculturas de macrófagos e células tumorais (MO+4T1), foram cultivadas em diferentes concentrações e proporções, em placas de 24 poços, em meio indutor de TNT com concentração de 1% e 2,5 % de Soro fetal bovino. As placas foram observadas nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas por microscopia de contraste de fase, com aumento de 10x.



Fonte: Próprio autor

Figura 21 - Quarta padronização de culturas celulares para caracterização e quantificação de nanotubos. Monoculturas de macrófagos (MO), monoculturas de células de adenocarcinoma mamário (4T1) e coculturas de macrófagos e células tumorais (MO+4T1), foram cultivadas em diferentes concentrações, em placas de 24 poços, em meio indutor de TNT e meio R10. As placas foram observada nos tempos de 12, 24 e 48 horas por microscopia de contraste de fase, com aumento de 20x



Fonte: Próprio autor