

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DOS
MACRÓFAGOS RAW 264.7 APÓS INTERAÇÕES COM
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO 4T1
(ESTUDO *IN VITRO*)

DÉBORA DE OLIVEIRA MARES SILVESTRO

SÃO PAULO
2018

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DOS
MACRÓFAGOS RAW 264.7 APÓS INTERAÇÕES COM
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO 4T1
(ESTUDO *IN VITRO*)

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

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

DÉBORA DE OLIVEIRA MARES SILVESTRO

SÃO PAULO

2018

Silvestro, Débora de Oliveira Mares.

Caracterização morfológica e funcional dos macrófagos RAW 264.7 após interações com células de adenocarcinoma mamário 4T1 / Débora de Oliveira Mares Silvestro. - 2018.

53 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Biologia da Diferenciação e Transformação Celular: Modulação por Fatores Endógenos e Exógenos

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

1. Câncer de mama. 2. Fagócitos. 3. Interações físicas. I. Pérez Hurtado, Elizabeth Cristina (orientadora). II. Título.

DÉBORA DE OLIVEIRA MARES SILVESTRO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DOS
MACRÓFAGOS RAW 264.7 APÓS INTERAÇÕES COM
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO 4T1
(ESTUDO *IN VITRO*)**

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

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

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

_____/_____/_____
Prof.^a Dr.^a Patrícia Xander Batista
UNIFESP

_____/_____/_____
Prof. Dr. Giovani Bravin Peres
Universidade Paulista – UNIP

Dedico esse trabalho a minha família!

Aos meus pais Kleber e Cleusa (*in memoriam*) pelo amor que me
orientou.

Ao meu marido Paolo Silvestro pelo incentivo, apoio e paciência nessa
fase da minha vida.

AGRADECIMENTOS

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

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

Aos meus colegas da UNIP, em especial José Renildo de Carvalho e Thiago Albuquerque Viração por toda disposição e cooperação.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Na maioria dos tumores, os macrófagos representam a maior população de células do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral. Na dependência do estímulo que recebem, os macrófagos podem polarizar-se em dois grupos funcionais distintos: M1 (pró-inflamatório) ou M2 (imunossupressor). Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) compartilham características fenotípicas do perfil M2 favorecendo a progressão tumoral e formação de metástases. Entretanto, ainda não estão completamente elucidados os mecanismos pelos quais células tumorais influenciam o padrão de polarização dos macrófagos no microambiente tumoral. Assim, o intuito do presente estudo foi avaliar *in vitro* a influência das células de adenocarcinoma mamário no perfil de ativação e capacidade funcional dos macrófagos, seja por fatores solúveis ou por interações físicas. Para isto, macrófagos foram cultivados sozinhos, ou com células de adenocarcinoma mamário 4T1, ou com o sobrenadante de cultura de células tumorais por 48 horas, para caracterização fenotípica por citometria de fluxo e análises morfológicas por microscopia óptica, eletrônica de varredura e confocal. Para avaliação da capacidade funcional dos macrófagos após interações físicas ou mediados por fatores solúveis, macrófagos após culturas foram purificados por *cell sorter* e, em seguida submetidos a ensaios *in vitro* de fagocitose com leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*. Sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagens de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), citocinas do padrão Th1/Th2/Th17 e quantificação de metaloproteases 2 e 9. Resultados obtidos nesses ensaios e apresentados no presente trabalho em formato de artigo, sugerem que tanto interações físicas com células de adenocarcinoma mamário como exposição aos fatores solúveis produzidos por elas, modularam o perfil de ativação e capacidade funcional dos macrófagos.

Palavras-chave: câncer de mama, microambiente tumoral, fagócitos, perfil M1/M2, interações físicas, metaloproteases.

ABSTRACT

In most tumors, macrophages represent the largest population of immune system cells present in the tumor microenvironment. Depending on the stimulus macrophages can polarize in two distinct functional groups: M1 (pro-inflammatory) or M2 (immunosuppressive). Tumor-associated macrophages (TAMs) share phenotypic characteristics of the M2 profile favoring tumor progression and metastasis formation. However, the mechanisms by which tumor cells influence the macrophage polarization pattern in the tumor microenvironment are not yet fully elucidated. Thus, the aim of the present study was to evaluate the influence of mammary adenocarcinoma cells on the activation profile and functional capacity of macrophages, either by soluble factors or by physical interactions. For this purpose, macrophages were cultured alone, either with 4T1 mammary adenocarcinoma cells or with the tumor cell culture supernatant for 48 hours. Phenotypic characterization was performed by flow cytometry and morphological analyzes by optical, scanning electron and confocal microscopy. To evaluate the functional capacity of macrophages after physical interactions or mediated by soluble factors, macrophages after cultures were purified by cell sorter and then subjected to *in vitro* phagocytosis assays with *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. Culture supernatants were collected for quantification of nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H₂O₂), Th1 / Th2 / Th17 cytokine and metalloproteases 2 and 9 levels. Results obtained in these analyses are described in the present article format. Together, results suggest that physical interactions and soluble factors both produced with mammary adenocarcinoma modulate the activation profile and functional capacity of macrophages in an *in vitro* model.

Keywords: Breast cancer, tumor microenvironment, phagocytes, M1 / M2 profile, physical interactions, metalloproteases.

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| 1- | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: | 12 |
| 2- | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 17 |
| 3- | ARTIGO | 20 |
| 3.1- | Introdução | 21 |
| 3.2- | Material e Métodos | 22 |
| 3.2-1. | Cultura de células | 22 |
| 3.2-2. | Viabilidade Celular | 23 |
| 3.2-3. | Determinação do perfil de ativação dos macrófagos pela técnica de citometria de fluxo..... | 23 |
| 3.2-4. | Marcação de populações celulares para purificação por cell sorter..... | 24 |
| 3.2-5. | Separação celular por cell sorter..... | 25 |
| 3.2-6. | Avaliação da capacidade fagocítica dos macrófagos por ensaio de fagocitose in vitro com leveduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 25 |
| 3.2-7. | Coloração de Giemsa | 26 |
| 3.2-8. | Dosagem de nitrito..... | 26 |
| 3.2-9. | Dosagem de peróxido de hidrogênio | 27 |
| 3.2-10. | Determinação de citocinas Th1/ Th2/ Th17 | 28 |
| 3.2-11. | Quantificação de proteínas pelo método BCA | 28 |
| 3.2-12. | Dosagem de metaloproteases 2 e 9 pela técnica de zimografia | 28 |
| 3.2-13. | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 30 |
| 3.2-14. | Microscopia confocal..... | 30 |
| 3.2-15. | Análises estatísticas | 31 |
| 3.3- | Resultados..... | 31 |
| 3.3-1. | Células tumorais 4T1 interagem com macrófagos em cultura | 31 |
| 3.3-2. | Células 4T1 induzem aumento da expressão de moléculas coestimulatórias sobre macrófagos RAW 264.7, seja por interações célula-célula ou mediadas por produtos solúveis. | 33 |

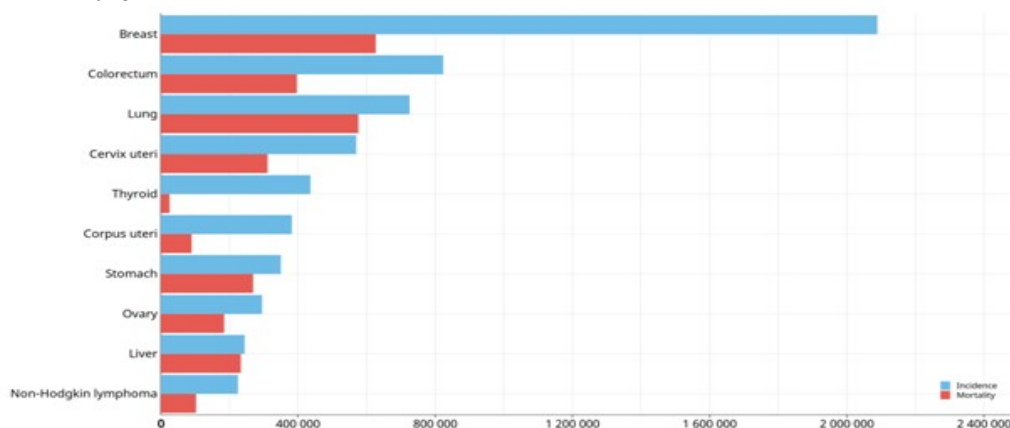
| | |
|---|----|
| 3.3-3. Produção de IL-10, TNF e IL-6 por macrófagos sofrem interferência na presença das células 4T1 ou de seus produtos | 34 |
| 3.3-4. Células 4T1 modulam de formas distintas a capacidade fagocítica de macrófagos..... | 36 |
| 3.3-5. Macrófagos após interações com células 4T1 e principalmente com seus produtos tendem a produzir citocinas de perfil pró-inflamatório | 37 |
| 3.3-6. Macrófagos após interações físicas com células 4T1 reduzem liberação de peróxido de hidrogênio | 39 |
| 3.3-7. Atividade das metaloproteases (MMPs) 2 e 9 | 42 |
| 3.3-8. Interações com células de adenocarcinoma mamário 4T1 ou seus produtos solúveis. | 43 |
| 3.4- Discussão | 44 |
| 3.5- Conclusão | 48 |
| 3.6- Declaração de financiamento..... | 48 |
| 3.7- Material Suplementar..... | 49 |
| 3.7-1. Estratégias de gates utilizados na citometria de fluxo | 49 |
| 3.7-2. Purificação de macrófagos pela técnica de cell sorter após cocultivo com células de adenocarcinoma mamário 4T1. | 50 |
| 3.8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |

.....

1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

Câncer é o termo genérico utilizado para definir uma doença extremamente complexa e amplamente diversificada em sua origem genética e histopatológica, que apresenta diferentes níveis de agressividade, progressão, prognóstico e tratamento (1). Caracteriza-se pelo crescimento desordenado e descontrolado das células, causando disfunção do tecido acometido (2). Além do tecido primário de origem, podem acometer tecidos circundantes ou distantes, formando tumores secundários ou metástases que caracterizam neoplasias malignas. (1,3). As neoplasias malignas se originam a partir de uma população clonal de células que acumulam alterações genéticas herdadas ou adquiridas e passam a exibir oito características biológicas comuns que as diferem das células normais: sinal de proliferação continuada, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, evasão de supressores tumorais, desregulação energética celular, evasão à resposta imunológica, indução de angiogênese, ativação de invasão e metástases (1,4). A presença de metástases indica pior prognóstico da doença, uma vez que é a principal causa de morte na maioria dos cânceres (1,3). Entre as neoplasias malignas, o câncer de mama é a maior causa de óbitos na população feminina (Gráfico 1), tanto no Brasil com 15.403 óbitos em 2015 (2), como no mundo, com 626.679 óbitos estimados para 2018 (5). Estima-se que para o biênio de 2018/2019 serão diagnosticados aproximadamente 59.700 novos casos de câncer de mama no Brasil (2), enquanto que até 2040, serão diagnosticados aproximadamente 980.000 de novos casos no mundo (5).

Gráfico 1- Número estimado de incidência de casos e mortes por câncer no mundo, mulheres, de todas as idades em 2018.



Fonte: Global Cancer Observatory-World Health Organization, 2018.

O adenocarcinoma é o tipo mais frequente de câncer de mama, sendo uma neoplasia derivada de células glandulares e com alto poder de metastatização. Pode acometer quase todos os órgãos como: fígado, intestino, pulmões, esôfago, pâncreas e colo uterino (2).

O sistema imunológico competente é o principal aliado na vigilância e eliminação de células neoplásicas. Para um tumor maligno se desenvolver é necessário que ocorra a evasão da resposta imunológica, que passa por três etapas. As células neoplásicas ao sofrerem mutações genéticas passam a expressar e secretar antígenos imunogênicos. A imunovigilância inicialmente reconhece os antígenos expressos e aciona a resposta antitumoral. Posteriormente, ocorre o equilíbrio e adaptação da resposta, momento em que o sistema imunológico mantém o controle da proliferação das células neoplásicas, porém demonstra incapacidade em eliminá-las por completo. Por último, ocorre a imunoedição, fase em que o sistema imunológico exerce pressão seletiva sobre as células neoplásicas, que possuem alto poder de mutação, selecionando células cancerosas adaptadas e mais resistentes, capazes de evadir por completo a resposta antitumoral (1).

Para progressão tumoral é necessário que haja condições ambientais favoráveis ao seu crescimento e estabilidade (4). O microambiente tumoral (MAT) participa ativamente na tumorigenese, sendo composto por células neoplásicas, não neoplásicas (leucócitos, fibroblastos e células endoteliais) e produtos celulares que interagem entre si (6,7). A inflamação é um fator ambiental preponderante e ambíguo na tumorigenese. Em fase aguda auxilia o sistema imunológico na resposta antitumoral, porém em condições crônicas torna-se deletéria e favorece a carcinogênese. Um ambiente de intenso e contínuo estresse oxidativo propicia instabilidade genética, neoangiogênese, proliferação e sobrevivência celular. O tumor não só consegue evadir o sistema imunológico como utiliza a resposta inflamatória a seu favor (1).

Os macrófagos são as células do sistema imunológico presentes em maior quantidade no microambiente tumoral, sendo o principal elo entre inflamação e câncer. Participam da imunidade inata e adquirida. Possuem ampla plasticidade e mobilidade, atuando efetivamente nas fases iniciais e tardias das respostas imunológicas contra infecções, processos inflamatórios, reconhecimento de células neoplásicas, cicatrização e reparo celular. Sua principal função é a fagocitose e secretam diversos produtos biologicamente ativos tais como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, fatores angiogênicos, metaloproteases, espécies reativas de oxigênio (óxido nítrico e peróxido de hidrogênio) e nitrogênio, dentre outros (1,8). Diferenciam-se em fenótipos heterogêneos em resposta aos estímulos que

recebem. Atualmente estão classificados em dois grupos fenotípicos distintos: M1 com perfil pró-inflamatório e antitumoral e, M2 com perfil imunossupressor e pró-tumoral. A classificação do perfil de ativação é determinada por moléculas expressas, fatores liberados e respostas induzidas (conforme descrito na Tabela 1) (9,10,11).

Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) são recrutados ao microambiente tumoral (MAT) podendo ser de origem mieloide (derivados de monócitos do sangue periférico e produzidos na medula óssea) ou de macrófagos residentes nos tecidos (derivados do saco vitelino na fase embrionária). Representam entre 5% a 40% da massa total do tumor e quanto maior a densidade de TAMs no MAT pior o prognóstico (7,10). Os TAMs compartilham muitas características fenotípicas de perfil M2 (imunossupressor). Estudos demonstram que a prevalência de macrófagos com esse perfil regulatório no microambiente tumoral encontra-se amplamente correlacionado com maior progressão tumoral e formação de metástases (11,12). Maior densidade de macrófagos M2 em estroma e ninho tumoral correlacionou-se com tumores de altos índices mitóticos e maior densidade microvascular, respectivamente (13). Em contraste, animais com depleção de macrófagos M2 rejeitaram metástases de tumor mamário murino, com ótima sobrevida após a remoção cirúrgica do tumor primário (14). Os TAMs participam ativamente de todas as etapas da progressão tumoral, seja na formação das células tronco tumorais, na imunossupressão, no metabolismo das células neoplásicas, angiogênese e cascata metastática, como na resposta aos tratamentos atuais disponíveis contra o câncer (11,15).

A principal resposta imunológica antitumoral depende da atuação de células T CD8 citotóxicas, sendo os TAMs de perfil M2 os principais supressores dessas células no microambiente tumoral, além de induzirem células T reguladoras (Tregs) (11). Os TAMs são fontes importantes de fatores angiogênicos. Para que ocorra a proliferação e sobrevivência das células tumorais é essencial que haja aporte de nutrientes e oxigênio fornecidos pela vascularização no microambiente tumoral. Hipóxia e necrose tumoral são fatores principais na indução da angiogênese, bem como no recrutamento e aumento da densidade de macrófagos no MAT (7). Interações parácrinas ocorrem entre os macrófagos e células tumorais. O fator estimulador de colônias (CSF1) é o principal regulador e fator quimiotático para a maioria das populações de macrófagos, seja derivado da medula óssea ou saco vitelino (9). As células tumorais secretam CSF1 que atrai macrófagos e os estimula a produzir fator de crescimento endotelial (VEGF) para formação de novos vasos (16). Os TAMs podem produzir além de VEGF, vários outros fatores angiogênicos inclusive alguns fatores que induzem a

linfagiogênese tumoral (17,18).

Estudos sugerem que a interação dos TAMS com as células tumorais favorecem a transição epitélio-mesenquimal (EMT), processo essencial na formação de metástases (19). Os TAMS favorecem formação e proliferação de metástases, pois são fontes elevadas de metaloproteases como MMP2, MMP7 e MMP9 que são capazes de clivar a matriz extracelular permitindo que as células tumorais migrem para sítios distantes (7). Auxiliam também no estabelecimento de um nicho pré-metastático quando secretam TNF- α , VEGF e fator de crescimento transformador β (TGF- β) que atingem órgãos alvos através da circulação sanguínea e induzem a produção de fatores atrativos de macrófagos e células tumorais ao sítio metastático (20). Neste contexto, diversos estudos demonstraram que os TAMs influenciam a resposta mal direcionada de reparo tecidual, frente aos tratamentos de quimioterapia ou radioterapia, favorecendo a quimiorresistência (21). Células tumorais quando tratadas com o quimioterápico e cocultivadas com macrófagos perfil M2, apresentaram índice reduzido de apoptose induzida, em relação às células cocultivadas com macrófagos perfil M1 (22). Contudo, diante da possibilidade de reversão dos macrófagos para perfil M1 houve aumento da eficácia do tratamento quimioterápico (23,24). No tratamento radioterápico ocorre aumento significativo do recrutamento de macrófagos ao local da lesão, devido à morte celular e hipóxia provocadas por danos ao DNA alvo (25). Inibidores da via estimulada pela hipóxia ou bloqueio da via CSF1R, produziram menor recrutamento de células mieloides no MAT e como resultado apresentaram melhor resposta ao tratamento (26,27). Por outro lado, apesar dos TAMs favorecerem a progressão tumoral, na presença de anticorpos direcionados ao tumor eles demonstram grande capacidade de manter a função tumoricida (28).

Diante da inquestionável relevância dos macrófagos no microambiente tumoral, seja inibindo ou favorecendo a progressão do tumor, os TAMs já são vistos como potenciais biomarcadores, possíveis alvos terapêuticos ou adjuvantes nos tratamentos disponíveis contra o câncer. Entretanto, os mecanismos envolvidos no perfil de ativação e resposta dos macrófagos frente à tumorigenese ainda não estão completamente esclarecidos. Portanto, o intuito do presente estudo foi investigar se as células de adenocarcinoma mamário são capazes de modular o perfil de ativação e capacidade funcional dos macrófagos, seja por interações físicas e/ ou exposição aos seus fatores solúveis.

Tabela 1- Perfil de diferenciação dos macrófagos

| Perfil | Subtipos | Respostas | Modos de ativação | Marcadores Produtos | Funções |
|--------|----------|--|--|--|---|
| M1 | | Pró-inflamatória TH1 Antitumoral | Produtos microbianos IFN- γ | IL12, IL23, IL18, IFN- γ , TNF- α iNOS Quimiocinas | Fagocitose e Apresentação de antígenos em infecções Ativação da Imunidade adquirida |
| M2 | a | Resposta Anti- inflamatória TH2 Pró Tumoral | Fungos Helmintos IL-4 IL-13 | Arginase-1 CD163 CD206 MHC-II TGM2 IL-10 TGF- β IL-1ra | Fagocitose de células apoptóticas Reparo tecidual, Remodelamento Angiogênese |
| | b | | LPS Complexos imunológicos | CD86 MHC-II IL-1, IL-6 IL-10 TNF- α | |
| | c | | IL10 Glicocorticoides | CD163 CD206 IL-10 TGF- β MERTK ECM | |
| | d | | IL-6 Adenosina | VEGF-A IL-10 IL-12 TNF- α TGF- β | |

Fonte: Tamás Ryszer, 2015 (29).

CD: Classe de diferenciação, MHC: Complexo maior de histocompatibilidade, iNOS: óxido nítrico sintase induzida, LPS: Lipopolissacarídeo, IFN: Interferon, TNF: Fator de necrose tumoral, TGF: Fator transformador de crescimento, IL: Interleucina, ECM: Componentes de matriz extracelular, MERTK: Mer Tirosina kinase, TGM2: enzima transglutaminase2

2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sato, Renata de Freitas; Lana, Marlous Vinicius Gomes; Medrano, Ruan F. V.; Chammas R. Fundamentos de Oncologia Molecular. 1a. Edição. São Paulo: Editora Atheneu; 2015.
2. INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [Internet]. [cited 2018 Feb 20]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>
3. Kitamura T, Qian B-Z, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. Nat Rev Immunol [Internet]. 2015 Feb 1;15(2):73–86. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri3789>
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
5. World Health Organization [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 15]. p. www.who.int/cancer/en/. Available from: www.who.int/cancer/en/%0D
6. Teng F, Tian WY, Wang YM, Zhang YF, Guo F, Zhao J, et al. Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. J Hematol Oncol [Internet]. 2016;9(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-015-0231-4>
7. Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. Vol. 10, Journal of hematology & oncology. 2017. p. 58.
8. Leite RB, Santos HBP, Lúcio PSC, Alvez PM, Godoy GP, Nonaka CFW. Macrófagos e sua Relação com o Carcinoma de Células Escamosas Oral. Rev Faculdade Odontol Lins [Internet]. 2015;25(1):37–46. Available from: <http://www.bibliotekevirtual.org/index.php/2013-02-07-03-02-35/2013-02-07-03-03-11/1207-fol/v25n01/12911-macrophagos-e-sua-relacao-com-o-carcinoma-de-celulas-escamosas-oral.html>
9. Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization lessons and open questions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;
10. 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. 2015;17(1).
11. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. Archives of Pharmacal Research. 2016.
12. Hu W, Li X, Zhang C, Yang Y, Jiang J, Wu C. Tumor-associated macrophages in cancers. Vol. 18, Clinical and Translational Oncology. 2016.

13. 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.* 2013;462(3).
14. 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.* 2005;65(24):11743–51.
15. Williams CB, Yeh ES, Soloff AC. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *npj Breast Cancer.* 2016;
16. Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. *Rev Med (Puebla).* 2010;89(1):21–31.
17. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell.* 2010;141(1):39–51.
18. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. Vol. 5 MAR, *Frontiers in Physiology.* 2014.
19. Deng Y-R, Liu W-B, Lian Z-X, Li X, Hou X. Sorafenib inhibits macrophage-mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(25):38292–305. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/9438>
20. Tomita T, Sakurai Y, Ishibashi S, Maru Y. Imbalance of Clara cell-mediated homeostatic inflammation is involved in lung metastasis. *Oncogene.* 2011;30(31):3429–39.
21. Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp Med.* 2015;212(4).
22. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer.* 2015;
23. Wang Y, Lin Y-X, Qiao S-L, An H-W, Ma Y, Qiao Z-Y, et al. Polymeric nanoparticles promote macrophage reversal from M2 to M1 phenotypes in the tumor microenvironment. *Biomaterials* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2018 May 30];112:153–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961216305178>
24. Song M, Liu T, Shi C, Zhang X, Chen X. Supporting Materials for Man-HA-MnO₂ Nanoparticles Enhance Chemotherapy Response by Priming Tumor-Associated Macrophages toward M1-like Macrophages and Attenuating Tumor Hypoxia. 2017;10(1):633–47.

25. De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* [Internet]. 2013;23(3):277–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.013>
26. Cui R, Yue W, Lattime EC, Stein MN, Xu Q, Tan X-L. Targeting tumor-associated macrophages to combat pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016;7(31).
27. Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(3):694–705.
28. Grugan KD, McCabe FL, Kinder M, Greenplate AR, Harman BC, Ekert JE, et al. Tumor-Associated Macrophages Promote Invasion while Retaining Fc-Dependent Anti-Tumor Function. *J Immunol*. 2012;189(11).
29. Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. Vol. 2015, *Mediators of Inflammation*. 2015.

3- ARTIGO

INTERNATIONAL JOURNAL OF INFLAMMATION INTERAÇÕES FÍSICAS E FATORES SOLÚVEIS DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO 4T1 MODULAM O PERFIL DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS

Débora O. M. Silvestro,¹ Thiago A. Viração,¹ José Renildo de Carvalho¹, Fabiana Toshie Konno¹, Anuska Marcelino Alvarez Saraiva², Vanessa Xavier¹, Giovani Bravin Peres¹, Paulo Ricardo Dell' Armelina Rocha¹, Maria Anete Lallo¹ e Elizabeth C. P. Hurtado¹

¹ Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, SP, Brasil.

² Instituto de Ciências da atividade física e esportes, Universidade Cruzeiro do Sul (UNICSUL), São Paulo, SP, Brasil.

Resumo

Macrófagos são células do sistema imunológico presentes em maior quantidade no microambiente tumoral, sendo o principal elo entre o câncer e inflamação. Podem polarizar-se em dois grupos fenotípicos distintos: M1 (pró-inflamatório) ou M2 (imunossupressor), dependendo dos estímulos que recebem. Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) compartilham características fenotípicas de perfil M2 favorecendo a progressão tumoral e formação de metástases. Entretanto, os mecanismos envolvidos na ativação de macrófagos no microambiente tumoral ainda não estão completamente elucidados. O intuito do presente estudo foi avaliar *in vitro* a influência das células de adenocarcinoma mamário no perfil fenotípico e funcional dos macrófagos, seja por fatores solúveis ou por interações físicas. Para isto, macrófagos foram cultivados sozinhos, ou com células de adenocarcinoma mamário 4T1, ou com o sobrenadante de cultura de células tumorais por 48 horas, para caracterização fenotípica por citometria de fluxo e purificação pela técnica de cell sorter. Foram realizados ensaios *in vitro* de fagocitose com leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*. Sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagens de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), citocinas do padrão Th1/Th2/Th17 e quantificação de metaloproteases 2 e 9. Análises de microscopia óptica, eletrônica de varredura e confocal foram realizadas para caracterizações morfológicas. Os resultados demonstraram que macrófagos cocultivados com células tumorais expressaram aumento de marcadores M1 e M2. Adicionalmente exibiram aumento

do índice fagocítico, redução da produção de H_2O_2 e produção reduzida das citocinas TNF- α e IL-10. Macrófagos expostos ao sobrenadante de células tumorais demonstraram maior expressão de marcadores M1, redução do índice fagocítico e aumento da produção da citocina IL-6. Alterações microscópicas foram observadas em ambos os grupos experimentais. Em conjunto, os dados aqui apresentados sugerem que tanto interações físicas como fatores solúveis de células de adenocarcinoma mamário 4T1 influenciam o perfil de ativação e capacidade funcional dos macrófagos.

3.1- Introdução

O adenocarcinoma é um tipo de neoplasia maligna derivada de células glandulares, com alto poder de metastatização, sendo o tipo mais comum de câncer de mama. (1) O câncer de mama é a maior causa de óbitos na população feminina no mundo (2).

Para um tumor maligno se desenvolver é necessário que haja condições ambientais favoráveis ao seu crescimento e estabilidade (3). O microambiente tumoral participa ativamente da tumorigenese e progressão tumoral. É composto por células neoplásicas, não neoplásicas como leucócitos, fibroblastos e células endoteliais, além dos produtos celulares como citocinas, fatores de crescimento, metaloproteases, entre outros, que interagem entre si. (4). A inflamação é um fator ambiental preponderante e ambíguo na tumorigenese. Em fase aguda auxilia o sistema imunológico na resposta antitumoral, porém em condições crônicas favorece a carcinogênese. Um ambiente de intenso e contínuo estresse oxidativo favorece a instabilidade genética, neoangiogênese, proliferação e sobrevivência celular (5).

Um sistema imunológico competente é o principal aliado na vigilância e eliminação de células neoplásicas, entretanto o tumor não só consegue evadir o sistema imunológico, como utiliza a resposta inflamatória a seu favor (5). Os macrófagos são as células do sistema imunológico presentes em maior quantidade no microambiente de tumores sólidos, sendo o principal elo entre a inflamação e o câncer. Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) são recrutados ao microambiente tumoral (MAT) e podem se diferenciar em dois perfis fenotípicos distintos: perfil pró-inflamatório ou M1 e perfil imunossupressor ou M2 (6,7).

Os TAMs compartilham muitas características fenotípicas do perfil M2 e são correlacionados com maior progressão tumoral e formação de metástases (8,9). Os TAMs participam ativamente de todas as etapas da tumorigenese, seja na formação das células tronco tumorais quando propiciam ambiente inflamatório e mutagênico, na imunossupressão por suprimir respostas antitumorais, na angiogênese por serem fontes importantes de fatores

angiogênicos ativados pela hipóxia e necrose tumoral, na cascata metastática por serem fontes de metaloproteases capazes de clivar a matriz extracelular permitindo que as células tumorais migrem para sítios distantes e por auxiliar no estabelecimento do nicho pré-metastático quando secretam fatores que medeiam o recrutamento de macrófagos e células tumorais ao sítio metastático. Além disso, podem orquestrar respostas mal direcionadas de reparo tecidual frente aos tratamentos de quimioterapia ou radioterapia, favorecendo a quimiorresistência. (4,10–17).

Diante da relevância que os macrófagos assumem no microambiente tumoral, seja inibindo ou favorecendo a progressão tumoral, os TAMs já são vistos como potenciais biomarcadores, possíveis alvos terapêuticos ou adjuvantes nos tratamentos disponíveis contra o câncer. Entretanto, ainda são necessários estudos para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na aquisição do perfil de ativação dos macrófagos no microambiente tumoral. No presente estudo, utilizando um modelo *in vitro* de cocultivo, foi investigada a influência de interações físicas e de fatores solúveis das células de adenocarcinoma mamário sobre o perfil fenotípico e capacidade funcional dos macrófagos.

3.2- Material e Métodos

3.2-1. Cultura de células

Foram cultivadas duas linhagens celulares: células tumorais de adenocarcinoma mamário 4T1 (4T1) e macrófagos RAW 264.7 (MO). Todas as células foram cultivadas com meio completo (R10), preparado com 90% de RPMI- 1640 (Gibco- Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) acrescido de 10% de soro bovino fetal inativado (SFB) (Gibco - Thermo Fisher,) e solução antibiótica de estreptomicina e penicilina (100 unidades/ mL de cada antibiótico, Gibco- Thermo Fisher), mantidas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Para avaliação dos fatores solúveis, macrófagos foram cultivados em meio completo contendo 20% de sobrenadante de cultura de células 4T1, coletado após 24 horas de cultura dessas células e centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos. Para cocultivos, concentrações e proporções de células 4T1 e macrófagos foram padronizadas. Cocultivos foram realizados utilizando proporção de 1:1 (2x 10⁶ células de cada tipo celular) para posterior ensaio com *cell sorter*. Para otimização das coculturas, macrófagos foram plaqueados 4 horas antes da adição das células 4T1. Coculturas e monoculturas foram mantidas por 48 horas sem mudança de meio em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂.

3.2-2. *Viabilidade Celular*

Para contagem das células viáveis utilizadas nos cocultivos, foi realizado o ensaio de exclusão por *Trypan blue*, no qual células mortas foram excluídas por marcação com o corante. Para isto a 10 µL de suspensão celular foram acrescentados em 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.

3.2-3. *Determinação do perfil de ativação dos macrófagos pela técnica de citometria de fluxo*

Macrófagos foram cultivados sozinhos contendo meio completo (MO), ou com células 4T1 (MO+4T1) ou com 20% de sobrenadante de cultura de células tumorais (MO+sobre), nas condições descritas no item 3.2-1. Para avaliação da produção de citocinas por citometria, após 44 horas de cultura, células foram ou não tratadas com 1 µL de Golgi plug (BD Biosciences, New Jersey, USA). Após 48 horas de cultura as células tratadas e não tratadas com Golgi plug foram coletadas e incubadas com anti-CD16/CD32 para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após 20 min de incubação no gelo, células tratadas com Golgi plug foram incubadas para marcação de superfície com anti-CD45 conjugado a FITC (Isotiocianato de fluoresceína) e anti-CD206 conjugado a APC (*Allophycocyanin*). Após incubação de 20 min no gelo e protegidas da luz, células foram submetidas a protocolo de permeabilização para marcação intracelular utilizando os anticorpos anti- IL-10 conjugado a Percp-Cy5.5 (*peridinin-chlorophyll-protein Cy5*) e anti- iNOS conjugado a PE (*Phycoerythrin*). Após 20 min de incubação no gelo e protegidas da luz, células foram lavadas e ressuspensas em tampão fosfato salino 1X (PBS, *phosphate buffered saline*) para aquisição em citômetro Accuri™C6 (BD Biosciences, New Jersey, USA). Em paralelo, células não tratadas com Golgi plug, após incubação com anti-CD16/CD32 foram marcadas com *cell viability* APC, anti-F480 conjugado a PE, anti-CD80/CD86 conjugado a FITC, e anti- CD40 conjugado a PE-Cy5. Após 20 min de incubação no gelo e protegidas da luz, células foram lavadas e ressuspensas em PBS para aquisição em citômetro Accuri™C6. As análises dos dados foram realizadas no *software* BD CSampler. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS conforme recomendações do fornecedor BD Biosciences. As estratégias de Gates utilizadas

encontram-se descritas na figura S1 do item 3.7-1 do material suplementar.

As moléculas analisadas foram:

Painel 1

- Viability: células viáveis
- CD45: proteína transmembrana expressa por leucócitos
- CD80/CD86: proteínas expressas por macrófagos, fornecem sinais coestimulatórios para ativação e sobrevivência das células T, pelos ligantes CD28 e CTLA4, respectivamente. Maior expressão em perfil de ativação M1.
- CD40: proteína transmembrana coestimulatória para ativação de linfócitos B, células NK e NKt. Maior expressão em perfil de ativação M1.

Painel 2

- F480: glicoproteína expressa por macrófagos
- iNOS: óxido nítrico sintase induzida, enzima que participa da síntese de l-arginina em óxido nítrico. Maior expressão em perfil de ativação M1.
- CD206: proteína transmembrana, receptor de manose envolvido na fagocitose. Maior expressão em perfil de ativação M2.
- IL-10: citocina antiinflamatória e imunossupressora. Maior expressão em perfil de ativação M2.

3.2-4. Marcação de populações celulares para purificação por cell sorter

Macrófagos e células 4T1 foram marcadas conforme instruções dos kits *cell proliferation dye*TM 670 (APC) e *cell trace Violet (Pacific blue)*, (ambos Invitrogen -Thermo Fisher Scientific, Massachussetts, USA). Para isto, macrófagos foram marcados com *cell proliferation Dye* eFluor 670 (APC *allophycocyanin*) diluídos em PBS e incubados por 10 min em banho úmido a 37°C e protegidos da luz. Em seguida, R10 gelado foi acrescentado e as células foram incubadas por mais 5 minutos no gelo e protegidos da luz. Células foram lavadas duas vezes com PBS, e ressuspendidas em meio R10 para plaqueamentos em garrafas médias na concentração de 2×10^6 células. Após 4 h de incubação, células não aderidas foram removidas e meio novo contendo células 4T1 marcadas foi acrescentado nas garrafas correspondentes ao grupo MO+4T1, na mesma concentração de 2×10^6 células. Para marcação, as células 4T1 foram lavadas 1X com PBS e em seguida marcadas com *cell trace Violet (Pacific blue)* diluído em PBS, para incubação por 20 min em banho úmido a 37°C protegidas

da luz. Após adição de R10 gelado e incubação de 5 minutos no gelo e protegidos da luz, células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em meio R10 para cultivo. Monoculturas de macrófagos e células 4T1, ambas marcadas foram cultivadas nas mesmas condições. Monoculturas e coculturas celulares foram mantidas por 48 h sem troca de meio para posteriores ensaios.

3.2-5. *Separação celular por cell sorter*

Para separação de macrófagos e células 4T1 após cocultivos, células previamente marcadas e cultivadas de acordo com protocolo descrito acima, foram coletadas e submetidas à separação celular utilizando o equipamento BD FACSAria II Cell Sorter e o software FACSDiva (BD Biosciences, New Jersey, USA), conforme representado na Figura S2 do item 3.7-2 do Material Suplementar. Para a separação, *doublets* foram excluídos e células contendo só *cell proliferation dye*TM 670 (MO) ou *cell trace Violet* (células 4T1) foram coletadas em tubos contendo SFB. Após verificação de pureza $\geq 95\%$, *single cells* foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e submetidas à cultura ou ensaios posteriores. Para manter as mesmas condições células de monoculturas de ambas as células foram também submetidas à separação celular.

3.2-6. *Avaliação da capacidade fagocítica dos macrófagos por ensaio de fagocitose in vitro com leveduras de Saccharomyces cerevisiae*

Macrófagos cultivados em diferentes condições e coletados após *cell sorter* foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro, na concentração de 3×10^5 células. Após adesão das células *overnight*, os sobrenadantes de cultura foram coletados para posteriores ensaios e as células aderidas foram lavadas e em seguida incubadas com meio completo contendo ou não leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann, Rio de Janeiro, Brasil) na proporção de 1:10, respectivamente (1 macrófago: 10 leveduras). Para preparo, leveduras foram dissolvidas em PBS e submetidas três (3) vezes ao protocolo de esterilização (15 min, temperatura 121°C e pressão 1 Kg/cm^2) para inativação. Após autoclavadas, leveduras foram contadas e quantidade necessária foi ressuspensa em meio R10 (500 μl /poço). Macrófagos contendo ou não leveduras foram incubados por 2 horas nas mesmas condições de cultura. Em seguida, sobrenadantes de cultura contendo ou não leveduras foram coletados para posteriores ensaios. Células aderidas nas lamínulas foram

lavadas 3 X com PBS e, em seguida lamínulas foram coletadas e coradas com Giemsa para determinação do índice fagocítico no tempo de 2 h nos diferentes tratamentos. Para avaliação do tempo de 24h, lamínulas contendo macrófagos após 2h de incubação com leveduras, foram lavadas 3X com PBS e em seguida meio R10 novo foi adicionado para incubação por mais 24 horas nas mesmas condições de cultura. Após período, sobrenadantes de cultura contendo ou não leveduras foram coletados para posteriores ensaios, lamínulas contendo os macrófagos foram lavadas e retiradas da placa para coloração pelo método de Giemsa, para determinação do índice fagocítico dos macrófagos no tempo de 24 h nos diferentes tratamentos. Lamínulas dos tempos 2 h e 24 h foram analisadas no microscópio óptico de luz Eclipse E200 (Nikon Inc. USA), com objetiva de imersão com aumento de 1000 vezes. A determinação do índice fagocítico (IF) corresponde ao número médio de leveduras fagocitadas x porcentagem de macrófagos que fagocitaram, determinado em 100 macrófagos por lâmina, conforme descrito por Barbuddhe, (11).

3.2-7. Coloração de Giemsa

Lamínulas contendo macrófagos incubados ou não com leveduras foram retiradas da placa e submetidas à coloração pelo método de Giemsa. Para isto, lamínulas foram fixadas por 2 min com metanol absoluto. Em seguida, foi acrescentado corante Giemsa (Laborclin, Paraná, Brasil) e mantido por 3 min em temperatura ambiente. Logo, após lavagem com água destilada e secas ao ar, lamínulas foram montadas em lâminas contendo uma gota de *entellam*® (Merck, Darmstadt, Germany), para posteriores análises no microscópio óptico Nikon eclipse E200 (Nikon Inc. USA).

3.2-8. Dosagem de nitrito

A quantidade de nitrito presente no meio condicionado das culturas foi mensurado como indicador indireto da produção de óxido nítrico (NO) por meio da Reação de Griess. Para isto, 100 µL do sobrenadante de cultura de macrófagos cultivados sozinhos, com células tumorais ou com 20% do seu sobrenadante de cultura, foram adicionados em placa de 96 poços contendo igual volume do reagente de Griess preparado com naftil-etilenodiamino dihidroclorídrico 0,1% (NEED, N9125, Sigma) e 1% de sulfanilamida (SULFA, S9251, Sigma), ambos diluídos em ácido acético (5 mg de NEED diluídos em 2,5 ml de ácido acético 60% e 50 mg de SULFA diluídos em 2,5 ml de ácido acético 30%). Após incubação em

temperatura ambiente por 10 minutos protegida da luz, a placa foi submetida à leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm em Leitor de ELISA (Thermoplate, MecLab, Jacareí, SP, Brasil). Como branco da reação foi utilizado meio completo sem células.

O cálculo de nitrito nas amostras teve como base a curva padrão obtida a partir de diluições seriadas de solução mãe de NaNO_2 (Sigma) preparado com 140 mg de nitrito de sódio- S-2252 em 10 mL de água destilada.

3.2-9. Dosagem de peróxido de hidrogênio

Para dosagem de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado o método colorimétrico de oxidação do vermelho de fenol em presença de peroxidase, seguindo a metodologia adaptada de Pick & Mizel, 1981 (12). Os macrófagos antes e após cocultura com células tumorais ou seus produtos foram plaqueados em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células por poço, com 100 μL de meio completo. Após 4 horas de incubação células aderidas foram lavadas e meio completo contendo ou não leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* na proporção de 1:10 por poço foi acrescido, para ensaio de fagocitose. Após 2 horas, sobrenadantes contendo ou não leveduras foram descartados e células aderidas foram lavadas 3X com PBS. Em seguida, foram adicionados 100 μL por poço de solução tampão com pH 7 a 37°C , para detecção de H_2O_2 . A solução tampão foi preparada com solução A (80 mL de água destilada, 8 g de NaCl 137 mM; 0,2 g de KCl 7 mM; 1,15 g de Na_2HPO_4 10 mM e 0,2 g de KH_2PO_4 2 mM), solução B (30 mL de água destilada e 0,3 g de CaCl_2) e solução C (30 mL de água destilada com 0,64 g de MgCl_2), sendo todos os sais e reagentes provenientes da DINÂMICA® (Indaiatuba, SP, Brasil), acrescidos de 50 μL de vermelho fenol 1% (Sigma), 50 μL de Peroxidase (Sigma P-850, 5 unidades), 1,0 mL de glicose (DINÂMICA) e 7,8 mL de água destilada,. Em seguida, foram adicionados 10 μL de acetato de miristato de forbol (PMA) (Sigma), para incubação por 1 h a 37°C em estufa de CO_2 . Para bloqueio da reação 10 μL de NaOH 1N (Dinâmica) foram acrescentados. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Thermoplate, MecLab) com filtro de 620nm. Para análise do tempo de 24 h, a placa foi incubada com 500 μL de meio completo em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO_2 por 24 horas. Finalizado este período, o protocolo descrito acima foi realizado para quantificação da produção de H_2O_2 nas mesmas condições, após 24 h de cultura.

3.2-10. *Determinação de citocinas Th1/ Th2/ Th17*

Amostras dos sobrenadantes das monoculturas e coculturas de macrófagos e células 4T1 após ensaio ou não de fagocitose, foram coletadas e mantidas a -80°C, para posterior determinação de citocinas relacionadas aos padrões Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-17, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) utilizando a técnica de CBA (BD Biosciences). Para isto, 50 μ L de cada amostra (incluindo a curva padrão) foram incubadas com 50 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 tampão respectivo do kit. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro AccuriTMC6 (BD Biosciences) com total de 2100 eventos correspondendo a 300 *beads* por analito a ser investigado. A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* de análises para CBA (FCAP Array software – BD Biosciences).

3.2-11. *Quantificação de proteínas pelo método BCA*

Para quantificação de proteínas presentes nos sobrenadantes de cultura dos grupos amostrais foi utilizado o método do ácido bicinonínico (BCA), *Protein Assay Kit* (Sigma), conforme instruções do fabricante. Primeiramente, curva padrão foi realizada por diluição seriada do padrão de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma) em concentrações que variaram de 0,78 – 12,5 mg/mL, em placas de 96 poços. Para o branco, dois poços foram preparados apenas com o diluente do kit. Após a preparação da curva, as amostras a serem dosadas foram diluídas em água destilada e depois adicionadas na placa. A placa foi incubada com os reagentes específicos do Kit (50 partes do reagente A para 1 parte do reagente B) por 30 min a 37°C. Em seguida, densidade óptica (D.O) foi determinada em leitor de ELISA (Thermoplate, MecLab) no comprimento de onda de 550 nm. Os dados da D.O gerados permitiram a construção da curva padrão e o cálculo da equação da reta para a posterior quantificação de proteínas nas amostras.

3.2-12. *Dosagem de metaloproteases 2 e 9 pela técnica de zimografia.*

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo substrato enzimático (gelatina do tipo A) foi realizada em banho úmido com gelo. O gel de corrida foi preparado com 4,0 mL de gelatina tipo A 1 mg/mL (Sigma), 3,3 mL de Acrilamida/ Bis (30:0,8) (Dinâmica), 2,5 mL de Tris- HCl 1 M (Dinâmica) com pH 8,8 , 100 μ L de SDS 1 % (Sigma), 100 μ L de

Persulfato de amônio (PSA) 10% (Sigma) e 4 µL TEMED (Sigma). Após a polimerização foi acrescentado o gel de empilhamento preparado com 2,1 mL de água destilada, 500 µL de Acrilamida/ Bis (30:0,8) (Dinâmica), 380 µL de Tris- HCl 1 M (Dinâmica) com pH 6,8, 30 µL de SDS 0,5% (Sigma), 100 µL de PSA 10% (Sigma) e 43 µL de TEMED (Sigma). Após polimerização os géis foram colocados na cuba de eletroforese vertical Mini VE (Amersham/ General Electric Company, Boston, Massachusetts, USA) e completados com tampão de corrida 10x para zimografia preparado com 30,2 g de Tris base 250 mM (Dinâmica), 144 g de Glicina 1,92 M (Dinâmica), 10 g de SDS 1% (Sigma) e 1000 mL de água destilada com pH 8,3. As amostras foram pipetadas no gel no volume de 10 µL, com concentração proteica de 30 µg, determinada após dosagem de proteína com *BCA Protein Assay Kit* (Sigma), conforme descrito acima. Foram acrescentados 10 µL de tampão de amostra (gel mix) preparado com 2 mL de Glicerol 10% (Dinâmica), 0,4 g de SDS 4% (Sigma), 0,5 g de Azul de bromofenol (Sigma) e 10 mL de Tris-HCl 0,125 M (Dinâmica) com pH 6,8. Em cada gel, foram utilizados controles de amostras positivas representados por MMP-2 e MMP-9. As amostras foram diluídas na proporção 1:1 (10 µL amostra e 10 µL de tampão de amostra). A corrida de eletroforese foi feita a 110 V e 50 mA por três horas. Após a eletroforese, o duodecil sulfato de sódio (SDS) foi removido com duas lavagens de Triton-X-100 a 2,5% (Sigma) por 30 minutos em temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, o gel contendo as amostras foi incubado *overnight*, a temperatura de 37°C em solução de Tris preparado com 6,057 g de Tris 50 mM (Dinâmica), 1,11 g de g de CaCl₂ 10 mM (Sigma), 0,65 g de NaN₃ 10 mM (Sigma), 2 mL de Brij 35* a 0,2% (Sigma) em 1000 mL de água destilada com pH de 7,6, para que as enzimas renaturassem e degradassem o substrato proteico. Após a incubação, o gel foi corado por 30 minutos com 1 g de Azul de Comassie R-250 0,5% (Sigma) acrescidos de 200 mL de solução fixadora/ descorante. Logo, o gel foi descorado com a solução fixadora/ descorante preparada com 500mL de álcool metílico (Dinâmica), 100mL de ácido acético glacial (Dinâmica) e 400 mL de água destilada, por 2 vezes de 20 minutos cada para visualização das bandas e incubado por 24 horas, em recipiente contendo água destilada para hidratar e melhorar o contraste. A imagem do gel foi obtida com fotodocumentadora GE ImageQuant LAS4000 (General Electric Company, Boston, Massachusetts, USA). Quantificação do potencial de atividade enzimática das MMPs foi determinada pelo cálculo de volume dos pixels das bandas utilizando *software* Totallab Versão 20 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK), conforme metodologia utilizada por Pistol et al. em 2007 (13). Posterior cálculo de razão foi realizado entre amostras experimentais e controles.

3.2-13. *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi realizada no laboratório de pesquisas da Universidade Paulista (UNIP) com o equipamento JSM 6510 (JEOL, Tokio, Japan). Macrófagos e células 4T1 foram cultivadas em placas de 24 poços, contendo lamínulas previamente mantidas em extran 4% *overnight*, lavadas com abundante água destilada, limpas com álcool 70% e autoclavadas. Células foram mantidas em cultura por 48 horas sem mudança de meio. Após este período, sobrenadantes foram removidos para posteriores ensaios, células aderentes foram lavadas 2X com PBS filtrado e em seguida fixadas por 1 h a temperatura ambiente com 300 µL de tampão de fosfato contendo 2,5% de glutaraldeído, em tampão cacodilato (0,1 M e pH 7,2). Lamínulas fixadas foram encaminhadas para processamento ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), onde foram realizadas quatro lavagens com tampão cacodilato 0,1 M nos seguintes tempos: 2X de 10 segundos cada, 1X *overnight* e 1X por 10 segundos. Após as lavagens, as amostras foram fixadas em tetróxido de ósmio 1% em água durante 30 segundos, e novamente lavadas em água 2X por 5 segundos. Ao final das lavagens, foi realizada desidratação em série gradual de etanol (50% 2X por 10 s; 70% 1X por 10 s e 1X *overnight*; 90% 2X por 10 s e 100% 3X por 10 s). Em seguida, foi realizada a secagem no aparelho de ponto crítico usando CO₂. Finalmente a montagem foi realizada no suporte porta-amostras do MEV (*stub*) usando Super BonderTM (Loctite, Henkel, São Paulo, Brasil) e recobrindo com ouro por *sputtering* (pulverização catódica) de 25 nm.

3.2-14. *Microscopia confocal*

A análise por microscopia eletrônica confocal foi realizada no Instituto Butantan com o equipamento TCS SP8 (Leica, Wetzlar, Germany). Macrófagos foram marcados com CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl diacetate Ester*) diluído em PBS, incubados por 15 min em banho úmido a 37°C e protegidos da luz. Células foram lavadas 1X com meio completo e em seguida plaqueadas sob lamínulas contidas em placas de 24 poços. Após 4 horas de cultura, sobrenadantes foram descartados e meio completo contendo ou não células de adenocarcinoma mamário (4T1) foram adicionados. Células 4T1 foram marcadas previamente com *cell proliferation Dye* eFluor 670 (APC *allophycocyanin*) diluídos em PBS, incubados por 10 min em banho úmido a 37°C e protegidos da luz. Em seguida foi acrescido meio completo gelado e as células foram novamente incubadas por mais 5 minutos no gelo e

protegidos da luz. Células foram lavadas 2X com PBS e ressuspensas em meio completo para cultivo. Após 48 horas de cultura, lamínulas foram lavadas 3X com PBS e em seguida fixadas com 500 µL de Paraformaldeído (PFA) 4% por 30 min a temperatura ambiente. Após este período, lamínulas foram lavadas e retiradas das placas e em seguida colocadas de forma invertida sob lâminas contendo 50 µL de Duolink (*In Situ mounting médium with DAPI*) (Sigma). Lâminas contendo duplicatas de cada grupo foram mantidas protegidas da luz em temperatura ambiente, até leitura em microscópio confocal.

3.2-15. Análises estatísticas

Para comparações estatísticas a abordagem utilizada foi variância ANOVA de uma via. Para respeitar os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias entre os grupos, foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, considerando $p > 0,05$. Dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados por raiz quadrada. Para grupos com variâncias homogêneas utilizou-se o pós teste de Bonferroni ou Dunnett e para grupos com variâncias não homogêneas utilizou-se o pós teste de Dunnett T3. Todos os valores foram representados como média \pm desvio padrão, com significância de 95%, considerando $p < 0,05$. Análises e gráficos foram realizados utilizando os *softwares* IBM SPSS *Statistics* Versão 21 (New York, USA) e Prisma Versão 5 (GraphPad, Lajolla, CA, USA).

3.3- Resultados

3.3-1. Células tumorais 4T1 interagem com macrófagos em cultura

As técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 1 (a)) e microscopia confocal (Figura 1 (b)) foram utilizadas para visualização das interações físicas entre as populações celulares macrófagos e células tumorais 4T1.

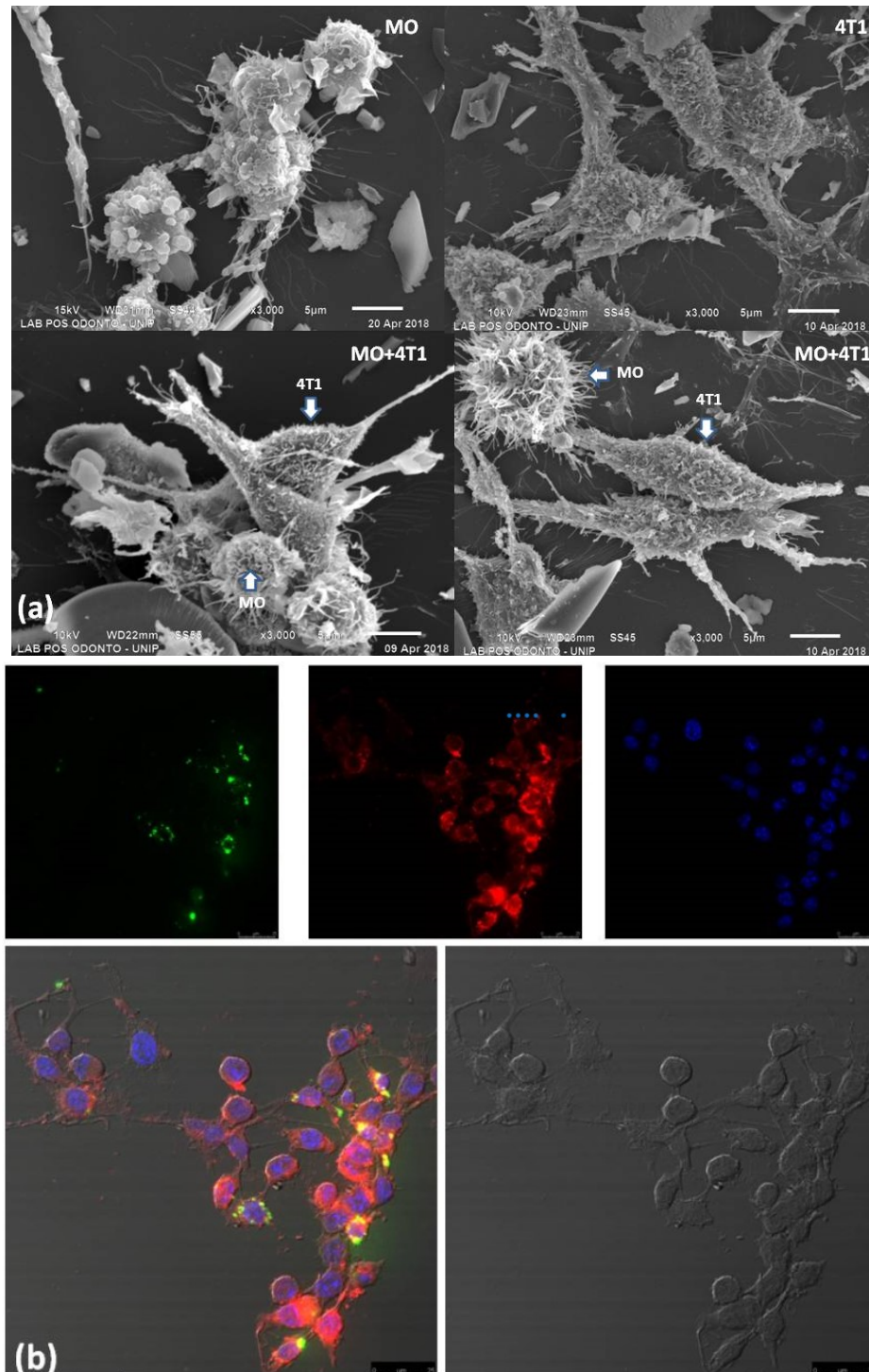


Figura 1- Visualização das populações celulares utilizando microscopia eletrônica de varredura e confocal. (a) Microscopia eletrônica de varredura com imagens em aumento 3000x, demonstrou monoculturas de macrófagos (MO), monoculturas de células tumorais (4T1) e interações celulares de coculturas de macrófagos com células tumorais 4T1 (MO+4T1). (b) Microscopia eletrônica confocal com imagens de macrófagos marcados com CFSE *Carboxyfluorescein succinimidyl diacetate Ester* e células tumorais 4T1 marcadas com *cell proliferation Dye eFluor 670*. Posteriormente foram cocultivadas em placas de 24 poços com laminulas. Após o tempo específico as células foram fixadas e laminulas montadas sobre laminas com Duolink (*In Situ mounting médium with DAPI*).

3.3-2. Células 4T1 induzem aumento da expressão de moléculas coestimulatórias sobre macrófagos RAW 264.7, seja por interações célula-célula ou mediadas por produtos solúveis.

Para caracterização fenotípica dos macrófagos após 48 horas de cultura com células tumorais ou com seu sobrenadante, foram utilizados 2 painéis com marcadores específicos de diferenciação: perfil M1 (CD80/86, CD40 e iNOS) e perfil M2 (CD206 e IL-10). Medianas de intensidade de fluorescência foram obtidas das células com expressões positivas para as moléculas analisadas. Conforme pós teste de Dunnett T3 observou-se aumento significativo da expressão de CD80/CD86 (Figura 2 (a)) nos grupos de macrófagos cocultivados com células tumorais (MO+4T1) e macrófagos expostos ao sobrenadante de células tumorais (MO+sobre) em relação ao grupo de macrófagos cultivados sozinhos (MO) [$F(2,6)= 462,99$, $p < 0,05$]. O pós teste de Dunnett demonstrou redução significativa da expressão de moléculas iNOS (Figura 2 (c)) nos grupos de macrófagos cocultivados com células tumorais 4T1 (MO+4T1) e macrófagos expostos ao sobrenadante de células tumorais (MO+sobre), em relação ao grupo controle de macrófagos cultivados sozinhos (MO) [$F(2,6)= 39,25$, $p < 0,001$]. Os marcadores CD206 e IL-10 (Figuras 2 (d) e 2 (e), respectivamente) exibiram expressões aumentadas no grupo de macrófagos cocultivados com células tumorais, apesar de não representarem significância estatística nos testes aplicados. A expressão do marcador CD40 (Figura 2 (b)) não foi estatisticamente diferente nos grupos experimentais (MO+4T1) e (MO+sobre), quando comparados com o grupo controle (MO).

Estes dados sugerem que células 4T1, seja por interações célula-célula ou mediados por fatores solúveis, modulam o fenótipo de macrófagos RAW 264.7 aumentando expressão de moléculas coestimulatórias que podem favorecer polarização para perfil de ativação M1 ou M2.

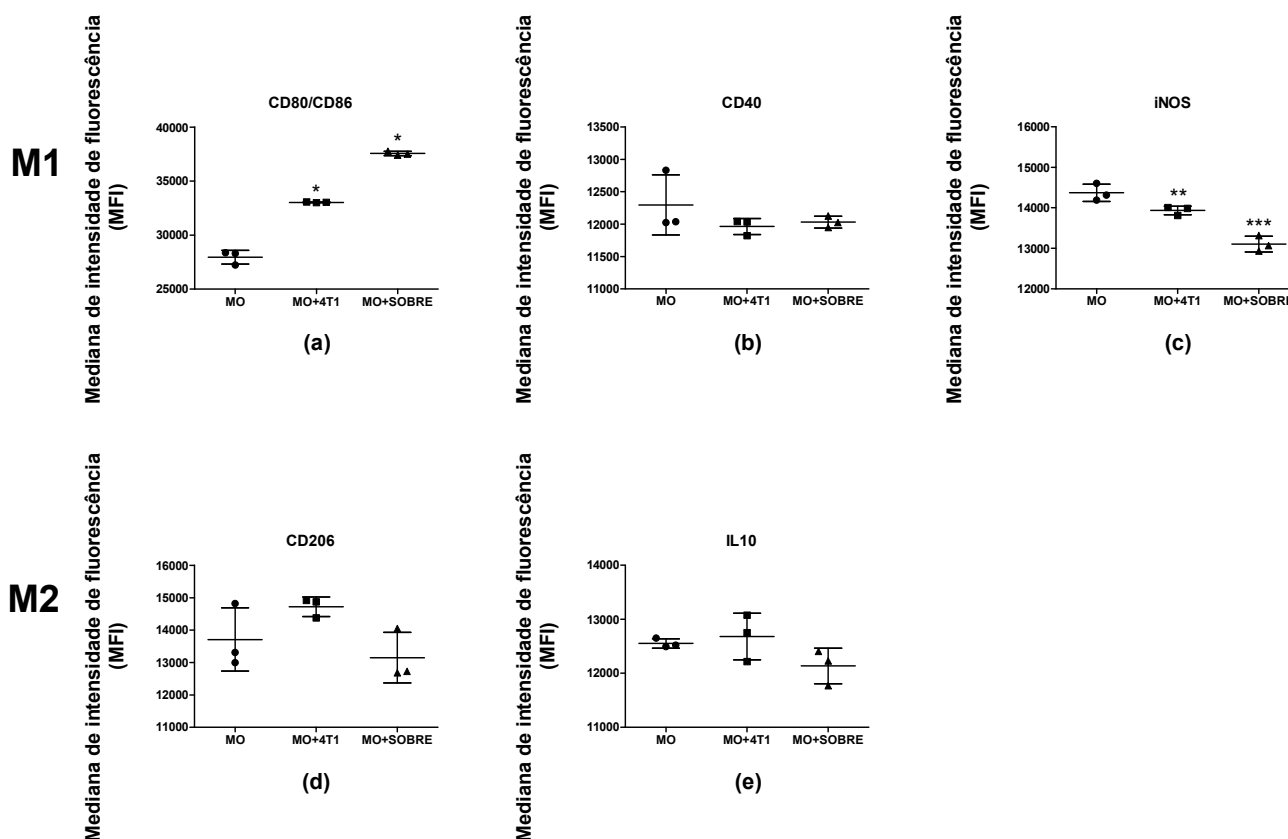


Figura 2- Perfil de ativação de macrófagos antes e após interações com células de adenocarcinoma mamário 4T1. Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) por citometria de fluxo, da expressão de moléculas associadas ao perfil M1: CD80/CD86 (a), CD40 (b) e iNOS (c), ou ao perfil M2: CD206 (d) e IL-10 (e) em cultura de 48 horas nos grupos de macrófagos cultivados sozinhos (MO), macrófagos cocultivados com células tumorais (MO+4T1) e macrófagos cultivados com sobrenadante de células tumorais (MO+sobre). Teste ANOVA de uma via, pós teste de Dunnett T3 (CD80/CD86) e pós-teste de Dunnett (iNOS, CD40, IL-10 e CD206) * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$

3.3-3. *Produção de IL-10, TNF e IL-6 por macrófagos sofrem interferência na presença das células 4T1 ou de seus produtos*

Análises de citocinas do padrão Th1/Th2/Th17 presentes em sobrenadantes de culturas de macrófagos após 48 h de interações com células de adenocarcinoma mamário ou com seu sobrenadante, exibiram concentrações expressivas das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-6 (Figuras 3 (a), 3 (b) e 3 (c), respectivamente). Os níveis de IL-2, IFN- γ , IL-17 A e IL-4 foram quase indetectáveis na maioria das amostras (Figura 3 (d), 3 (e), 3 (f) e 3 (g), respectivamente). O pós teste de Dunnett T3 evidenciou que o grupo de macrófagos cocultivados com células tumorais 4T1 (MO+4T1) apresentou redução significativa na produção das citocinas TNF- α (Figura 3 (a)) [$F(3,8) = 114,957$, $p < 0,05$] e IL10 (Figura 3 (b)) [$F(3,8) = 30,072$, $p < 0,05$] em relação ao grupo controle de macrófagos cultivados sozinhos

(MO). O pós teste de Dunnett demonstrou que o grupo de macrófagos cultivados previamente com sobrenadante de 4T1 apresentou aumento significativo da concentração da citocina IL-6 em relação ao grupo controle de macrófagos (Figura 3 (c)) [$F(2,2,88)=193,125$, $p<0,05$].

Os resultados demonstram que culturas de macrófagos em presença de células 4T1 reduzem a produção de $TNF\alpha$ e IL-10. Em contraste, macrófagos cultivados em presença de fatores solúveis de células 4T1 apresentaram aumento da produção de citocinas pro inflamatórias IL-6.

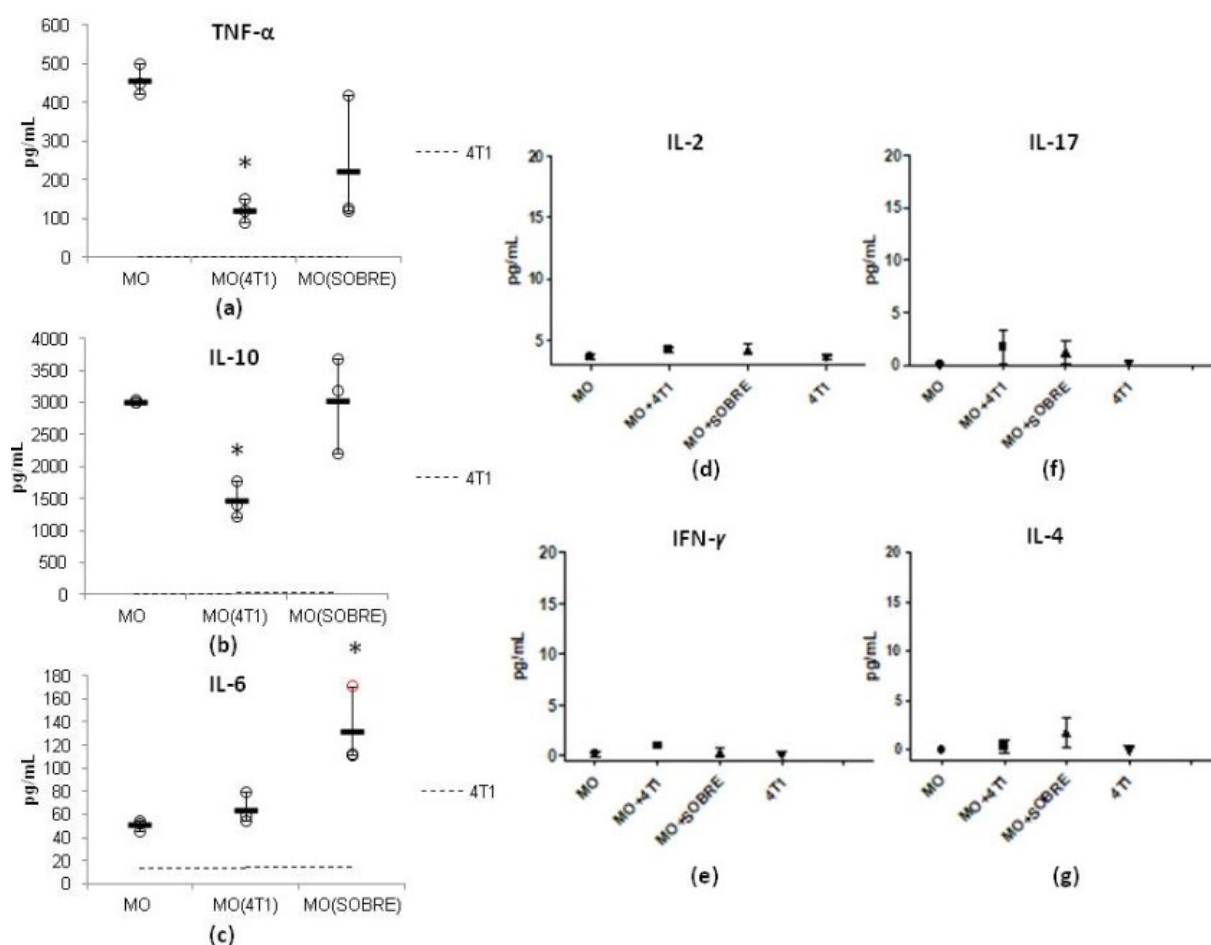


Figura 3- Avaliação do perfil de citocinas em culturas de macrófagos após 48 horas de interações com células tumorais 4T1. Determinação da produção de citocinas por macrófagos após 48 horas de interações físicas com células de adenocarcinoma mamário 4T1 ou exposição aos seus fatores solúveis. Após respectivo período, sobrenadantes foram coletados para determinação do perfil de citocinas pela técnica CBA. As citocinas com expressões significativas foram $TNF-\alpha$ (a), IL-10 (b), e IL-6 (c). Teste Anova de uma via, pós teste de Dunnett ($TNF-\alpha$ e IL-10), pós teste de Dunnett (IL-6) * $p<0.05$.

3.3-4. Células 4T1 modulam de formas distintas a capacidade fagocítica de macrófagos

Uma vez que a fagocitose é crucial nas respostas mediadas por macrófagos, foi determinado o índice fagocítico dessas células após interações físicas com células 4T1 ou seus produtos, utilizando o modelo *in vitro* de fagocitose com leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*. O pós teste de Dunnett, em análise referente a 2 h de fagocitose (Figura 4 (a)), demonstrou que os macrófagos cocultivados com células tumorais 4T1 [MO (4T1)] apresentaram aumento significativo do índice fagocítico em relação ao grupo controle de macrófagos (MO) [$F(2,6) = 37,87$, $p < 0,05$], enquanto que o grupo de macrófagos cultivados com sobrenadante de células tumorais [MO (sobre)], exibiu redução significativa do índice fagocítico em relação ao grupo controle [$F(2,6) = 37,87$, $p < 0,01$]. Em análise referente ao tempo de 24 horas após o ensaio de fagocitose (Figura 4 (b)), os grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas do índice fagocítico. O pós teste de Bonferroni foi conduzido para avaliar os grupos individualmente e comparar o índice fagocítico entre os tempos 2 h e 24h, com o objetivo de avaliar a eficiência dos macrófagos em eliminar as leveduras fagocitadas após 24 horas do desafio (Figura 4 (c)). A análise apontou redução significativa do índice fagocítico no grupo controle de macrófagos (MO) entre os tempos 24 h e 2 h [$F(5,12) = 14,65$, $p < 0,0001$]. Ocorreu também redução significativa do índice fagocítico em 24 h no grupo de macrófagos cocultivados previamente com células tumorais [MO (4T1)] em relação ao mesmo grupo em 2 h [$F(5,12) = 14,65$, $p < 0,05$]. Entretanto, o grupo de macrófagos expostos previamente ao sobrenadante de células tumorais [MO (sobre)], não apresentou diferenças estatísticas entre os tempos 2 h e 24 h.

Resultados obtidos com as análises do índice fagocítico demonstram que células 4T1 podem tanto aumentar como diminuir a capacidade fagocítica de macrófagos na dependência, respectivamente da presença de interações célula-célula ou fatores solúveis por elas produzidos. Entretanto, esse aumento ou diminuição da fagocitose não está associado necessariamente ao aumento na eliminação dos produtos fagocitados.

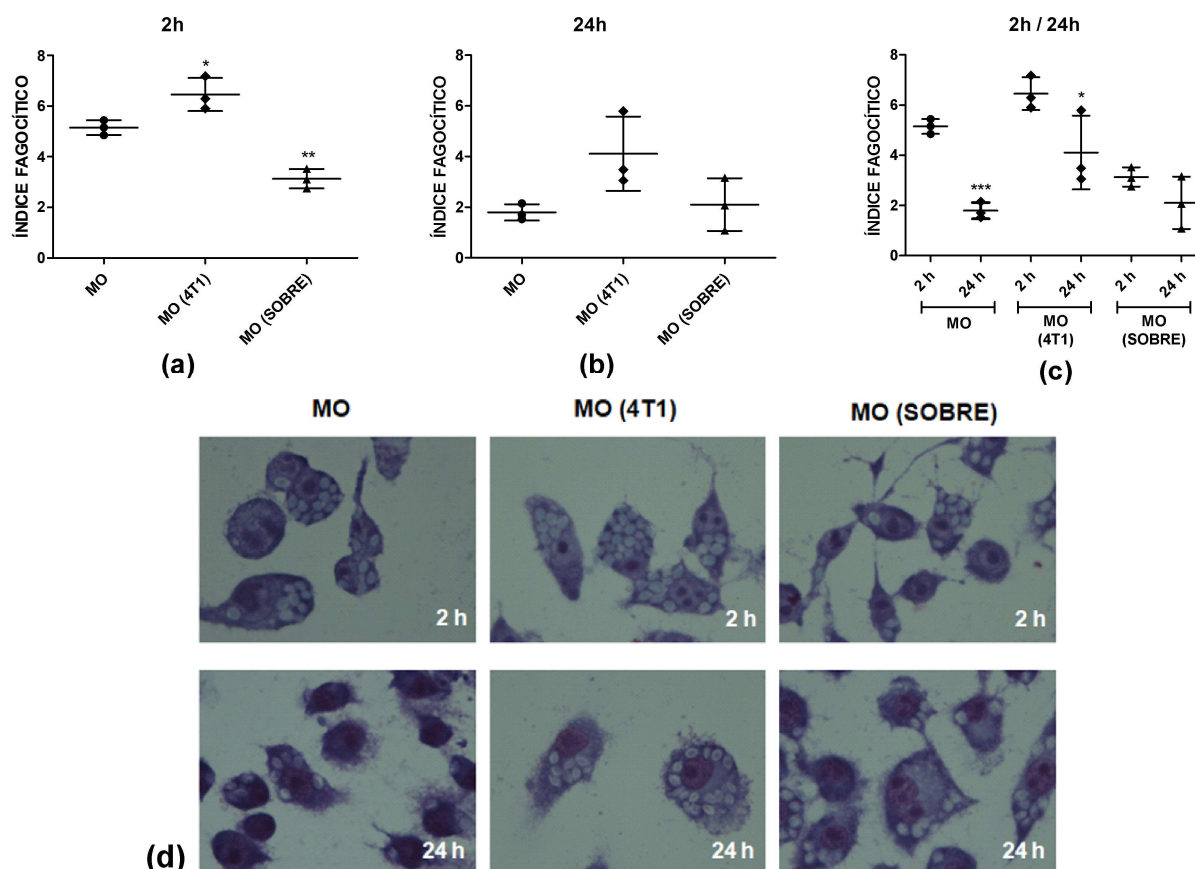


Figura 4- Influência das células de adenocarcinoma mamário no índice fagocítico dos macrófagos em 2 h e 24 h. Macrófagos purificados por cell sorter cultivados previamente sozinhos [MO] ou com células de adenocarcinoma mamário [MO (4T1)] ou com seu sobrenadante [MO (sobre)] foram cultivados em lamínulas de vidro com leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* na proporção de 1:10, respectivamente. Após 2 horas do desafio, células aderentes foram lavadas 3X com PBS (1X) e lamínulas foram coletadas (a). Novo cultivo foi realizado nos grupos de 24 h com meio novo livre de leveduras e após respectivo período lamínulas foram coletadas (b). As lamínulas foram coradas por Giemsa e analisadas por microscopia óptica (d) para determinação do índice fagocítico (Média de leveduras fagocitadas * percentagem de macrófagos que fagocitaram). Análise individual dos grupos foi realizada para comparação do índice fagocítico nos tempos analisados (2 h e 24 h) para avaliação da eficácia dos macrófagos na eliminação das leveduras fagocitadas (c) Teste Anova de uma via, pós teste de Dunnett (a) e (b) e pós teste de Bonferroni (c) * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$.

3.3-5. *Macrófagos após interações com células 4T1 e principalmente com seus produtos tendem a produzir citocinas de perfil pró-inflamatório*

Já tem sido amplamente descrito que no microambiente tumoral macrófagos modulam o fenótipo de células tumorais para comportamentos mais agressivos, por favorecer ambiente rico em citocinas imunossupressoras. Entretanto, de que forma as células tumorais modulam os macrófagos ainda são questões a serem respondidas. Assim, com o intuito de avaliar o perfil de citocinas produzidas por macrófagos após interações com células tumorais, macrófagos purificados após coculturas com células 4T1 ou seus produtos foram cultivados e

submetidos ou não ao ensaio de fagocitose com *S. cerevisiae* conforme descrito previamente. Sobrenadantes de culturas foram coletados após 24 h do desafio e demonstraram produção aumentada de TNF- α e IL-6 no grupo de macrófagos expostos previamente ao sobrenadante de células tumorais e cultivados com leveduras, porém os resultados não representaram significância estatística no teste aplicado. Outras citocinas também analisadas: IL-2, IL-10, IL-17 A, IFN- γ e IL-4 (Figuras 5 (c), 5 (d), 5 (e) e 5 (f), respectivamente) não exibiram concentrações significativas nos grupos amostrais analisados.

O pós teste de Dunnett T3 comparou os grupos sem leveduras de macrófagos previamente cocultivados com células tumorais [MO(4T1)] e macrófagos expostos previamente ao sobrenadante de células 4T1 [MO(sobre)], com o grupo controle de macrófagos previamente cultivados sozinhos (MO), comparou ainda os grupos com leveduras [MO(4T1)+LEV] e [MO(sobre)+LEV] em relação ao grupo controle de macrófagos com leveduras (MO+LEV) e para ambas as situações as concentrações das citocinas TNF- α (Figura 5 (a)) e IL-6 (Figura 5 (b)), não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Estes resultados sugerem que macrófagos após contato com células 4T1 e principalmente com seus produtos, tendem a aumentar a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6.

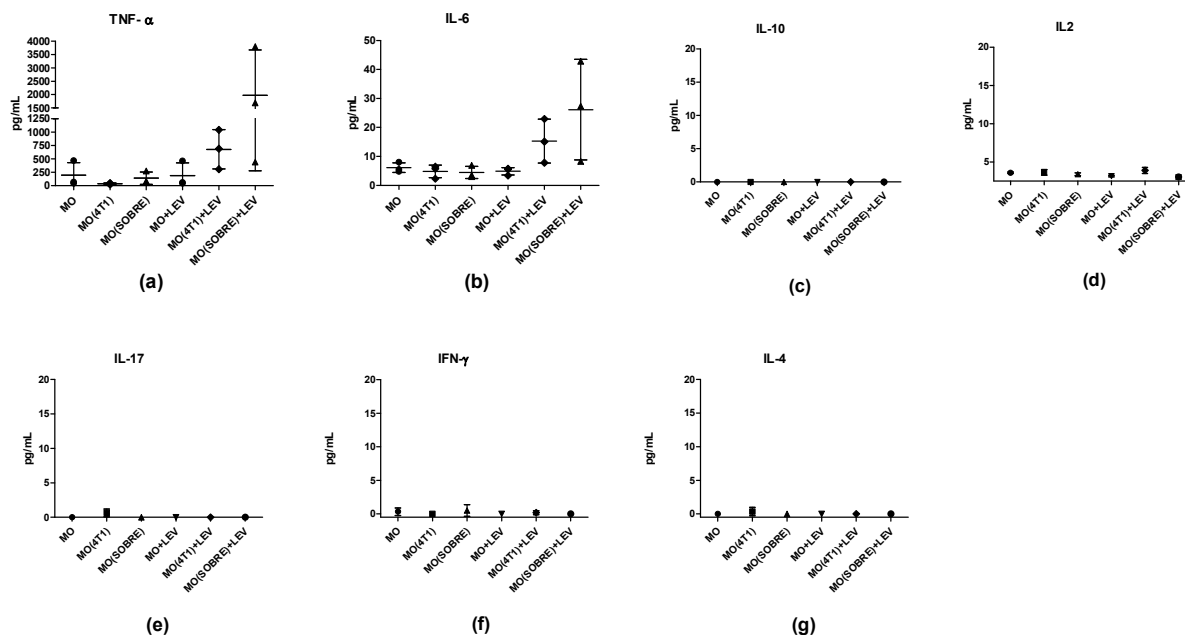


Figura 5- Avaliação do perfil de citocinas pela técnica de CBA após 24 horas do ensaio de fagocitose com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Macrófagos purificados por cell sorter cultivados previamente sozinhos [MO] ou com células de adenocarcinoma mamário [MO (4T1)] ou com seu sobrenadante [MO (sobre)] foram desafiados ou não com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* na proporção de 1:10, respectivamente. Após 2 h de cocultura, células aderentes foram lavadas 3X com PBS (1X) e cultivadas com meio novo livre de leveduras por 24 h. Após respectivo período, sobrenadantes foram coletados para determinação do perfil de citocinas pela técnica CBA. As citocinas com expressões significativas foram TNF- α (a) e IL-6 (b). As citocinas IL-10 (c), IL-2 (d), IL-17 (e), IFN- γ (f), e IL-4 (g) não apresentaram dosagens expressivas no tempo avaliado. Teste Anova de uma via e pós teste de Dunnett T3.

3.3-6. *Macrófagos após interações físicas com células 4T1 reduzem liberação de peróxido de hidrogênio*

Considerando que um dos principais mecanismos microbicidas dos macrófagos é a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, foi avaliada a produção de NO e H₂O₂ em macrófagos antes e após contato com células 4T1 ou com seus produtos e, desafiados ou não com leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*.

Referente à dosagem de NO, o pós teste de Bonferroni demonstrou que ambos os grupos amostrais [MO (4T1)] e [MO (sobre)], não apresentaram diferenças estatísticas na liberação de nitrito quando comparados ao grupo controle (MO), nos tempos de 2 horas (Figura 6 (a)) e/ ou 24 horas (Figura 6 (b)). Durante o ensaio de fagocitose com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, os macrófagos dos grupos [MO (4T1)+LEV] e [MO (sobre)+LEV], não apresentaram resultados estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (MO+LEV) na liberação de NO, nos tempos de 2 horas (Figura 6 (a)) e/ ou 24 horas (Figura 6 (b)) após o desafio.

Em relação à dosagem de H₂O₂, o pós teste de Bonferroni indicou que no tempo de

2 horas (Figura 6 (c)), o grupo de macrófagos previamente cocultivados com células tumorais, [MO (4T1)], apresentou redução significativa da concentração de H_2O_2 quando comparado ao grupo controle de macrófagos (MO) [$F(2,6) = 8,607$, $p < 0,05$]. Resultados semelhantes foram observados nesse mesmo grupo de macrófagos previamente cocultivados com células tumorais e desafiados com leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* [MO (4T1) + LEV], que apresentou redução significativa da concentração de H_2O_2 em relação ao grupo controle de macrófagos com leveduras (MO + LEV) no tempo de 2 h (Figura 6 (c)) [$F(2,6) = 24,46$, $p < 0,01$]. Os grupos analisados no tempo de 24 horas não demonstraram diferenças estatísticas significativas (Figura 6 (d)).

Apesar do modelo utilizado não permitir evidenciar o papel do NO como mecanismo microbicida utilizado na eliminação de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*, é possível observar que macrófagos após interações físicas com células 4T1 ou com seus produtos, mantiveram os níveis de NO inalterados ou com tendência a redução, respectivamente. Em paralelo, os valores de H_2O_2 diminuiu significativamente nos macrófagos que interagiram fisicamente com células 4T1, sugerindo que as células 4T1 modulam a capacidade microbicida dos macrófagos provavelmente por redução na liberação de NO e H_2O_2 .

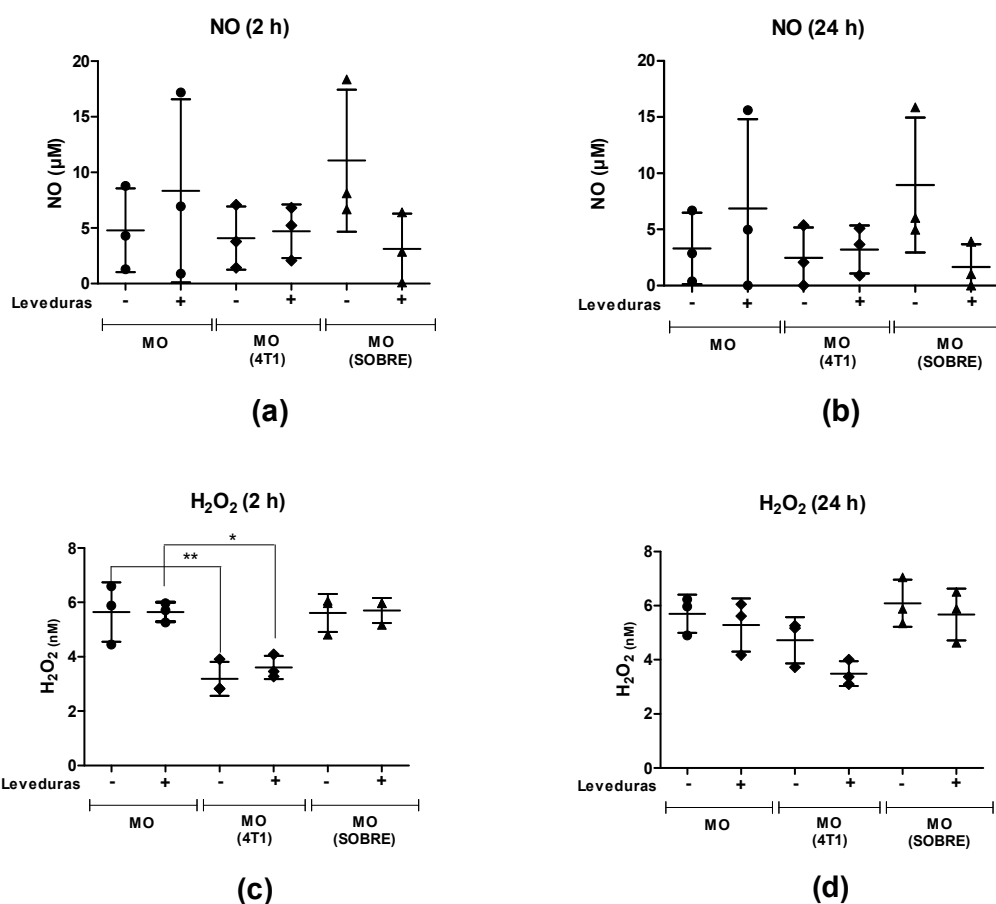


Figura 6- Influência das células de adenocarcinoma mamário na produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio pelos macrófagos. Macrófagos purificados por cell sorter cultivados previamente sozinhos [MO] ou com células de adenocarcinoma mamário 4T1 [MO (4T1)] ou com seu sobrenadante [MO (sobre)] foram cultivados para ensaio de fagocitose. Para dosagem de NO macrófagos foram plaqueados em placa de 24 poços, os grupos foram desafiados ou não com leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* na proporção de 1:10, respectivamente. Após 2 horas do desafio sobrenadantes dos grupos sem ou com leveduras foram coletados, e células aderentes foram lavadas 3X com PBS para cultivo com meio novo livre de leveduras (a). Após 24 h de cultura, sobrenadantes dos grupos com ou sem leveduras foram coletados (b), para posterior quantificação dos níveis de nitrito pelo método de Griess como medida indireta da produção de NO. Para dosagem de H₂O₂ macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços com ou sem leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* na proporção de 1:10, respectivamente. Após 2 h de fagocitose, células aderentes foram lavadas 3X com PBS e a reação colorimétrica de oxidação do vermelho de fenol em presença de peroxidase foi aplicada nos tempos 2 horas (c) e 24 horas (d). Teste Anova de uma via e pós teste de Bonferroni *p<0.05 **p<0.01.

3.3-7. Atividade das metaloproteases (MMPs) 2 e 9

Uma vez que a produção de metaloproteases pode ser um mecanismo relevante no favorecimento da migração e invasão de células tumorais e, que os macrófagos são fontes importantes dessas proteínas, foi investigado a presença de metaloproteases 2 e 9 em sobrenadantes de cultura de macrófagos purificados, após contato com células 4T1. O pós teste de Bonferroni demonstrou que os grupos experimentais 4T1 [MO (4T1)] e 4T1 [MO (sobre)] não evidenciaram diferenças estatísticas na liberação das MMPs Pró 9 (Figura 7 (a)) e/ou Pró 2 (Figura 7 (b)) em relação ao grupo controle de macrófagos (MO), nos tempos de 24 horas e 48 horas de cultura. Os grupos experimentais também não exibiram expressão significativa da MMPs 9 e 2 ativadas nos tempos de 24 horas e 48 horas.

Análises da zimografia revelam que células 4T1 tendem a aumentar a produção de MMP 2 pelos macrófagos que se associa principalmente ao padrão de resposta de M2.

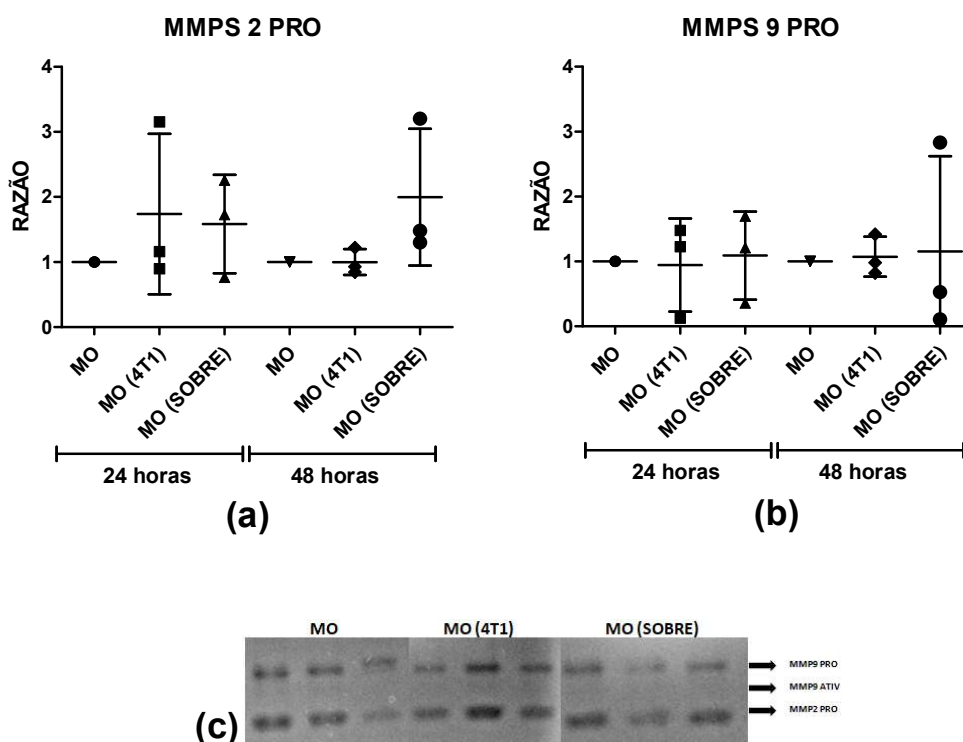


Figura 7- Produção e atividade das metaloproteases 2 e 9 por macrófagos após 24 h e 48 h de interações com células de adenocarcinoma mamário. Macrófagos purificados por cell sorter cultivados previamente sozinhos [MO] ou com células de adenocarcinoma mamário 4T1 [MO (4T1)] ou com seu sobrenadante [MO (sobre)], foram plaqueados em placas de 24 poços por 24 horas e 48 horas, e sobrenadantes foram coletados para avaliação da produção e ativação das metaloproteases 2 (a) e 9 (b) por zimografia. Volume do pixel foi obtido pelo software Totallab e a razão calculada entre amostras experimentais / controle (c). Teste Anova de uma via e pós teste de Bonferroni.

3.3-8. *Interações com células de adenocarcinoma mamário 4T1 ou seus produtos solúveis.*

A técnica de microscopia óptica foi realizada para caracterização morfológica dos macrófagos após interações prévias com células de adenocarcinoma mamário ou com seus produtos solúveis. Como observado na Figura 8, o grupo [MO (4T1)] demonstrou aumento de agregados celulares em relação aos macrófagos cultivados sozinhos. No grupo de macrófagos expostos previamente ao sobrenadante de células tumorais, observaram-se núcleos picnóticos e vacuolização do citoplasma, sugerindo maior sofrimento e morte celular.

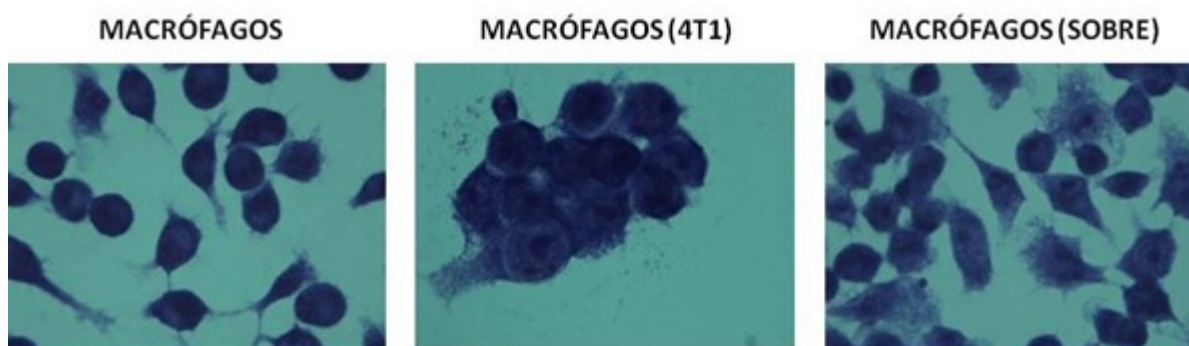


Figura 8- Visualização dos macrófagos após interações com células tumorais utilizando microscopia óptica. Imagens com aumento de 1000x demonstram macrófagos purificados por cell sorter após interações com células tumorais 4T1. Macrófagos cultivados sozinhos (macrófagos), macrófagos cocultivados previamente com células tumorais [Macrófagos (4T1)] e macrófagos expostos previamente ao sobrenadante de células tumorais [macrófagos (sobre)] foram plaqueados em lamínulas por 24 horas e corados por método Giemsa.

3.4- Discussão

Células tumorais evadem o sistema imunológico e condicionam o microambiente que estão inseridas a trabalhar em seu favor. Os macrófagos são células altamente plásticas que representam a principal população de células do sistema imunológico no microambiente tumoral. Em resposta a sinais microambientais os TAMs (macrófagos associados ao tumor) sofrem alterações genéticas, fenotípicas e funcionais que possibilitam reversão do seu perfil de ativação mesmo após polarização específica. No presente trabalho foi demonstrado que interações físicas com células tumorais ou com seus produtos modulam o fenótipo funcional de Macrófagos de linhagem RAW 264.7.

Análises do perfil fenotípico dos macrófagos cultivados em presença de células 4T1 (MO+4T1) ou seus produtos (MO+sobre) demonstraram expressão mista dos marcadores de ativação. Prévio estudo com metodologia semelhante demonstrou que meio condicionado de células de câncer de mama humano induziram macrófagos M0 ao perfil de ativação M2 (21). Outro estudo experimental demonstrou que macrófagos ativados nos perfis M1 e M2 quando tratados com meio condicionado de células de câncer de mama humano, não exibiram perfis característicos, e sim perfis mistos de ativação. A combinação de estímulos anti e pro inflamatórios levam os TAMs a coexpressarem tanto marcadores do perfil M1 como do perfil M2, dificultando a caracterização fenotípica dos mesmos (22).

O perfil de citocinas encontrado em culturas de 48 horas demonstrou redução da produção de TNF- α e IL-10 no grupo do cocultivo de MO com células 4T1. Essas citocinas normalmente apresentam correlação inversa em respostas anti ou pró inflamatórias, entretanto um estudo com macrófagos indiferenciados e induzidos aos perfis de ativação M1 e M2 para avaliar a capacidade antitumoral contra células de câncer de cólon, demonstrou decréscimo da concentração de ambas as citocinas quando dosadas em fases intermediárias de transição do perfil M1 para perfil M2 (23). Esse dado corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho, pois sugerem que os macrófagos cocultivados com células tumorais 4T1 no momento que foram avaliados, exibiam marcadores de ativação M1, porém poderiam se encontrar em fase intermediária de polarização para perfil M2, explicado pelo aumento da expressão do marcador CD206. Em contraste, o grupo de macrófagos expostos aos fatores solúveis de células tumorais demonstrou produção aumentada de IL-6. Este dado juntamente com o aumento da expressão de marcadores CD80/CD86 sugerem tendência a um perfil de ativação pró inflamatório.

A principal função dos macrófagos é a fagocitose, porém os mecanismos pelos quais os macrófagos fagocitam células tumorais vivas ainda não são completamente conhecidos. Além de favorecer a eliminação de células neoplásicas na imunovigilância, a fagocitose propicia que antígenos tumorais sejam processados e apresentados aos linfócitos T. Os macrófagos cocultivados com células tumorais apresentaram aumento do índice fagocítico e boa capacidade de eliminação das leveduras fagocitadas em 24 horas. Já os macrófagos expostos previamente ao sobrenadante de células tumorais apresentaram redução da função fagocítica e incapacidade de eliminação das leveduras fagocitadas em 24 horas.

Resultados de um estudo com macrófagos induzidos à diferenciação M1 ou M2 por citocinas, demonstraram diferentes respostas de fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio. Os macrófagos de perfil M2 induzidos por IL-10 e IL-4 indicaram aumento do índice fagocítico em relação aos macrófagos do perfil M1 estimulados por IFN- γ (24). Esses dados contribuem com os resultados aqui apresentados e acrescentam indícios de que os macrófagos quando cocultivados com células tumorais tendem a um perfil de ativação M2, com maior índice fagocítico, enquanto os macrófagos expostos ao sobrenadante de células tumorais tendem ao perfil de ativação M1, com redução do índice fagocítico.

Em paralelo, análises do perfil de citocinas em 24 horas após o ensaio de fagocitose exibiu tendência de aumento de TNF- α e IL-6, porém sem significância estatística entre os grupos amostrais, independente do cultivo ou não com leveduras. Estudo semelhante demonstrou que macrófagos M0 e cultivados com meio condicionado de células tumorais 4T1 quando estimulados com LPS, demonstraram aumento da produção de TNF- α e IL-6, com IL-10 inalterada (25).

Avaliação da atividade microbicida mediada pela liberação de NO não demonstrou resultados estatisticamente diferentes nos grupos amostrais, independente do contato prévio com células tumorais ou do cultivo ou não com leveduras. Na literatura encontram-se efeitos contraditórios envolvidos na morte celular induzida por NO (apoptose ou necrose). Os mecanismos envolvidos dependem da concentração, das células envolvidas, e duração do evento (26). O excesso de NO pode provocar danos ao DNA favorecendo a mutagênese celular e progressão do tumor. Contudo, sabe-se que o dano ao DNA desencadeia respostas de reparo que induzem o bloqueio da proliferação celular e estímulo de apoptose, o que contraria o perfil de alta proliferação e imortalidade das células tumorais. Dados da literatura demonstram que em concentrações moderadas por tempo prolongado, o NO causa instabilidade do DNA com comprometimento da função de reparo, sem influenciar a

proliferação celular (27). Outro estudo demonstrou que o aumento de NO foi capaz de influenciar o recrutamento e atividade de TAMs, inibindo o crescimento de tumores de próstata (28).

Quanto ao peróxido de hidrogênio houve redução significativa da concentração de H_2O_2 nos sobrenadantes dos grupos de macrófagos cocultivados com células tumorais, na presença ou não de leveduras, contrariando o esperado de produção aumentada de H_2O_2 durante a fagocitose. Esse achado sugere que houve possível comprometimento da função microbicida dos macrófagos quando em contato prévio com células tumorais, o qual não foi revertido após estímulo da fagocitose. As células tumorais produzem níveis elevados de espécies reativas de oxigênio, devido à sua maior atividade metabólica. Altos níveis de H_2O_2 provocam inflamação, favorecendo a proliferação de células neoplásicas, formação de metástases e angiogênese, porém, em altas concentrações podem estimular a apoptose (29). Células tumorais utilizam mecanismos de defesa e sobrevivência contra o estresse oxidativo, induzindo regulação positiva de enzimas antioxidantes (30). Esses dados podem sugerir que redução da concentração de H_2O_2 observada nos macrófagos cocultivados previamente com células tumorais, pode ser efeito de mecanismos redox desencadeados pelas células tumorais contra danos oxidativos.

Diversos trabalhos com células estaminais hematopoiéticas demonstram que espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas com cascatas de sinalização celular relacionadas ao processo de renovação, proliferação e diferenciação (31). Estudos demonstraram que níveis reduzidos de ROS provocam depleção da função das células tronco hematopoiéticas, comprometimento do sistema imunológico e aparecimento de infecções oportunistas. Em contrapartida, níveis aumentados de ROS provocam exaustão de células tronco, inflamação crônica e transformação celular (32). O peróxido de hidrogênio testado em concentrações baixas (5 μM) induziram necrose e apoptose de células leucêmicas sem interferir na proliferação de células normais. Isso pode corresponder ao fato que as células tumorais possuem constitutivamente maior concentração intracelular de ROS do que as células normais (33). Diante dos resultados obtidos no presente estudo e pela diversidade de efeitos que o ROS possam estar envolvidos, novos estudos devem ser realizados incluindo avaliação metabólica e vias de sinalização para melhor compreensão dos mecanismos pelos quais as células 4T1 induzem diminuição na produção de H_2O_2 pelos macrófagos.

Por outro lado, as metaloproteases de matriz (MMPs) 2 e 9 fazem parte de um grupo de enzimas proteolíticas que participam na progressão tumoral e formação de metástases. São

capazes de degradar a membrana basal e matriz extracelular, permitindo que as células tumorais infiltrem no estroma e possam migrar para sítios distantes (34). Os resultados obtidos no presente trabalho, não evidenciaram diferenças estatísticas na liberação de MMPs 2 e 9 nos macrófagos cultivados previamente com células 4T1 ou com seus produtos presentes no sobrenadante de cultura dessas células tumorais. Esses achados contradizem dados da literatura, que apontam que células tumorais sintetizam e induzem aumento da síntese de MMPs 2 e 9 por outras células no microambiente tumoral. Conforme estudo que analisou cortes histológicos de diversos tipos de câncer de mama, alta expressão de MMP 9 correlacionou-se significativamente com maior agressividade, pior prognóstico e menor sobrevida global (35). Entretanto, algumas dificuldades e limitações do método possam ter influenciado os resultados, novas análises de zimografia devem ser realizadas a fim de confirmar os dados obtidos.

Análises morfológicas dos grupos celulares apresentaram características sugestivas de sofrimento e morte celular no grupo de macrófagos expostos previamente ao sobrenadante de células tumorais. Já no grupo de macrófagos cocultivados previamente com células tumorais, observamos formações de agregados celulares e maior aderência entre as células. Esses dados sugerem que as interações celulares e moleculares com células tumorais provocaram mudanças estruturais nos macrófagos. Dados obtidos em um estudo com microscopia de força atômica demonstrou que interações com células cancerosas induziram alterações mecânicas, porém não morfológicas nas células do sistema imunológico (36)

Com o avanço das pesquisas e o surgimento de técnicas cada vez mais sensíveis para caracterizações fenotípicas dos macrófagos, estudos ressaltam a grande heterogeneidade dessas células, com diversas combinações e vias de ativação, resultando em perfis mistos e complexos. Diversos autores sugerem revisão dos modelos atuais de classificação dos macrófagos, pois alegam que a polarização em dois perfis tem se mostrado insuficiente e inespecífica para a diversidade encontrada (37).

Em busca de novas alternativas para prevenção, diagnóstico ou tratamento de neoplasias agressivas como o adenocarcinoma mamário, os resultados aqui apresentados podem ser úteis para novas pesquisas que envolvam mecanismos de interações entre células tumorais e sistema imunológico, ressaltando a necessidade de análises complementares e novas abordagens para melhor compreensão das vias de ativação dos macrófagos frente à tumorigenese.

3.5- Conclusão

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que tanto o contato físico com células de adenocarcinoma mamário como exposição aos seus fatores solúveis foram capazes de modular o perfil fenotípico e funcional dos macrófagos.

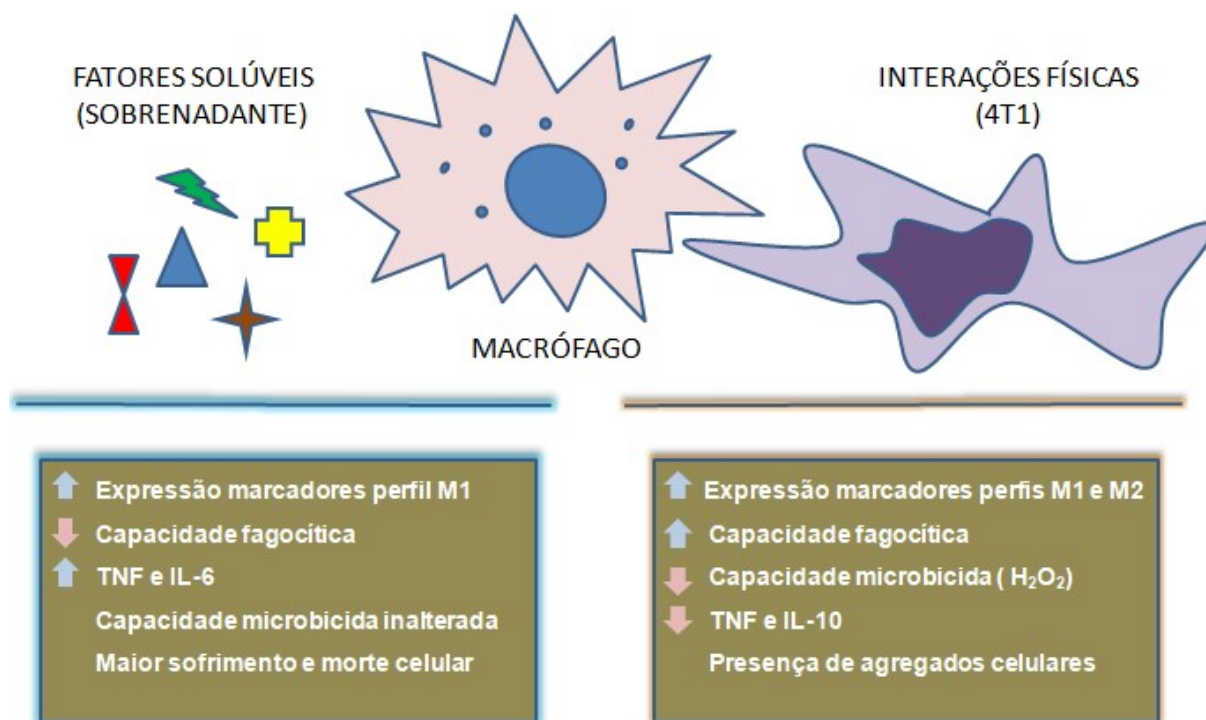


Figura 9- Interações físicas com células de adenocarcinoma mamário e exposição aos seus fatores solúveis modularam o perfil de ativação e capacidade funcional dos macrófagos.

3.6- Declaração de financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

3.7- Material Suplementar

3.7-1. Estratégias de gates utilizados na citometria de fluxo

Estratégias de Gates utilizadas para selecionar populações celulares de interesse e obtenção de medianas de intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores fenotípicos dos macrófagos, após cocultivo com células de adenocarcinoma mamário ou exposição aos seus produtos.

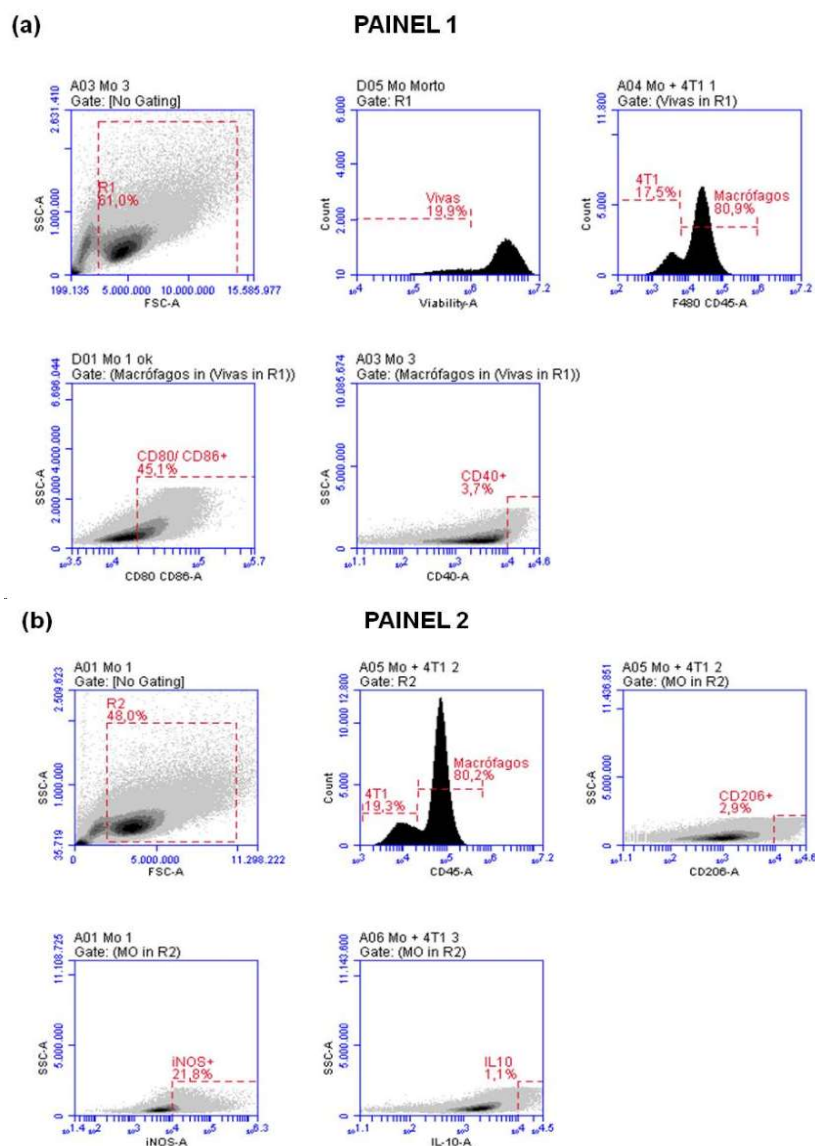


Figura S1- Estratégias de gates utilizadas para caracterização dos macrófagos. (a). Populações celulares foram selecionadas em R1 de acordo com a granulosidade. Células viáveis foram determinadas utilizando populações de macrófagos mortos marcados com Viability. Macrófagos foram selecionados por marcadores específicos F480/ CD45. Macrófagos com expressão positiva para CD80/ CD86 e CD40 foram utilizados para obter mediana de intensidade de fluorescência (MFI).

(b). Populações celulares foram selecionadas em R2 de acordo com a granulosidade. Macrófagos foram selecionados por marcadores específicos CD45. Macrófagos com expressão positiva para CD206, iNOS e IL-10 foram utilizados para obter mediana de intensidade de fluorescência (MFI).

3.7-2. Purificação de macrófagos pela técnica de cell sorter após cocultivo com células de adenocarcinoma mamário 4T1.

Macrófagos cultivados sozinhos, macrófagos cocultivados com células de adenocarcinoma mamário 4T1 ou expostos ao fatores solúveis de células tumorais presentes no sobrenadante de 4T1, foram submetidos à técnica de *cell sorter* para obtenção de populações de macrófagos puros (*single cells*). Conforme demonstrado na Figura 1, foi utilizada a estratégia de *gates* para análises de populações viáveis (P1, Figura 1 (a)), após exclusão de *doublets* (P2, Figura 1(a)) e as respectivas populações desejadas: macrófagos (P4: APC+) ou só 4T1 (P3: Pacific blue+). Após separação, os macrófagos dos cocultivos com células tumorais 4T1 foram coletados com pureza de 99,6% (Figura 1 (b)).

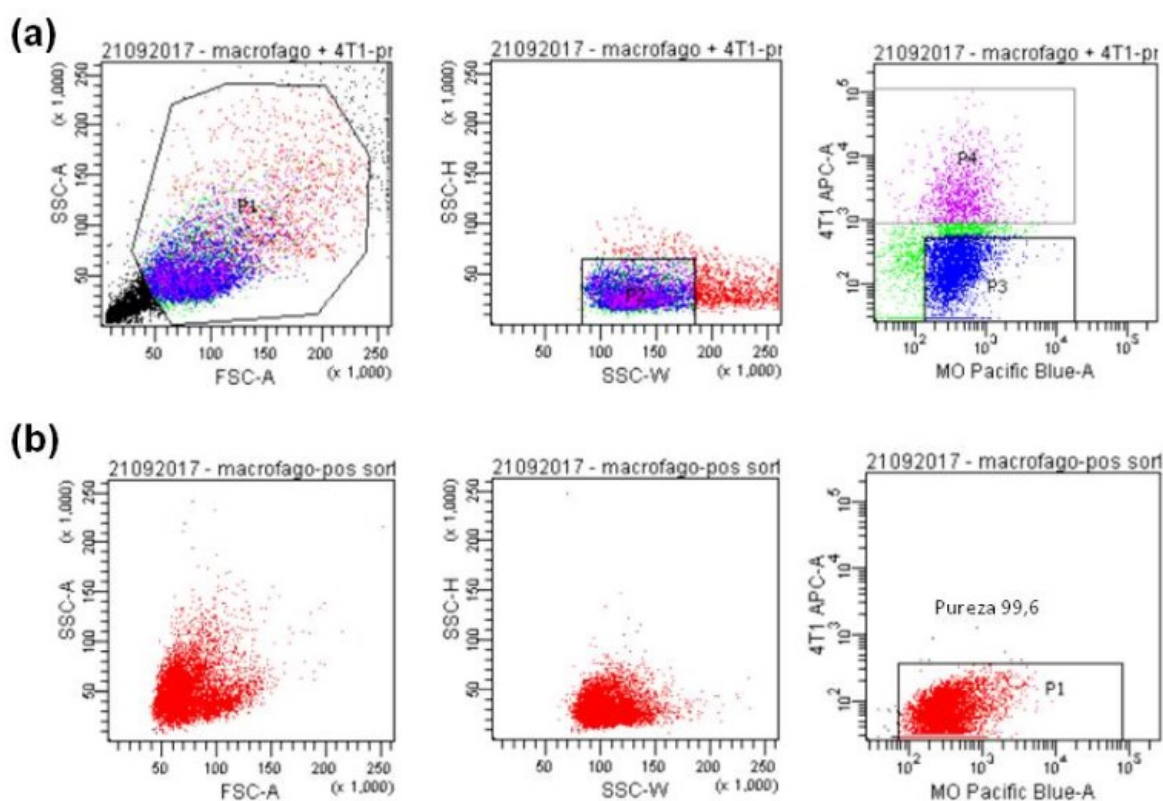


Figura S2- Purificação dos macrófagos após interação com células de adenocarcinoma mamário 4T1. Macrófagos marcados com Pacific Blue e células tumorais 4T1 marcadas com APC, foram cultivadas por 48 horas em grupos de macrófagos cultivados sozinhos, macrófagos cocultivados com células tumorais 4T1 e macrófagos cultivados com 20% de sobrenadante de células tumorais para posterior purificação pela técnica de cell sorter. (a) Pré-sorting (b) Pós- sorting

3.8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [Internet]. [cited 2018 Feb 20]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>
2. World Health Organization [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 15]. p. www.who.int/cancer/en/. Available from: www.who.int/cancer/en/%0D
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
4. Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. *Rev Med (Puebla)*. 2010;89(1):21–31.
5. Sato, Renata de Freitas; Lana, Marlous Vinicius Gomes; Medrano, Ruan F. V.; Chammas R. *Fundamentos de Oncologia Molecular*. 1a. Edição. São Paulo: Editora Atheneu; 2015.
6. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677–86.
7. Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. Vol. 2015, *Mediators of Inflammation*. 2015.
8. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Archives of Pharmacal Research*. 2016.
9. Hu W, Li X, Zhang C, Yang Y, Jiang J, Wu C. Tumor-associated macrophages in cancers. Vol. 18, *Clinical and Translational Oncology*. 2016.
10. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. Vol. 39, *Archives of Pharmacal Research*. 2016.
11. Williams CB, Yeh ES, Soloff AC. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *npj Breast Cancer*. 2016;
12. Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. Vol. 10, *Journal of hematology & oncology*. 2017. p. 58.
13. Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;
14. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39–51.

15. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. Vol. 5 MAR, *Frontiers in Physiology*. 2014.
16. Tomita T, Sakurai Y, Ishibashi S, Maru Y. Imbalance of Clara cell-mediated homeostatic inflammation is involved in lung metastasis. *Oncogene*. 2011;30(31):3429–39.
17. Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp Med*. 2015;212(4).
18. Barbuddhe S., Malik SV., Gupta LK. Effect of in vitro monocyte activation by *Listeria Monocytogenes* antigens on phagocytosis and production of reactive oxygen and nitrogen radicals in bovines. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 1998 Jul 8 [cited 2018 Jun 3];64(2):149–59. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242798001299>
19. Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* [Internet]. 1981 Oct 30 [cited 2018 Oct 14];46(2):211–26. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175981901381?via%3Dihub>
20. Pistol G, Matache C, Calugaru A, Stavaru C, Tanaseanu S, Ionescu R, et al. Roles of CD147 on T lymphocytes activation and MMP-9 secretion in Systemic Lupus Erythematosus. *J Cell Mol Med*. 2007;11(2):339–48.
21. 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*. 2015;17(1).
22. Chimal-Ramírez GK, Espinoza-Sánchez NA, Chávez-Sánchez L, Arriaga-Pizano L, Fuentes-Pananá EM. Monocyte Differentiation towards Protumor Activity Does Not Correlate with M1 or M2 Phenotypes. *J Immunol Res*. 2016;2016.
23. Engström A, Erlandsson A, Delbro D, Wijkander J. Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2. *Int J Oncol*. 2014;44(2):385–92.
24. Mendoza-Coronel E, Ortega E. Macrophage polarization modulates FcγR- and CD13-mediated phagocytosis and reactive oxygen species production, independently of receptor membrane expression. *Front Immunol*. 2017;8(MAR).
25. Madera L, Greenshields A, Power Coombs MR, Hoskin DW. 4T1 Murine Mammary Carcinoma Cells Enhance Macrophage-Mediated Innate Inflammatory Responses.

26. Costa MT, Fabeni R de C, Aptekmann KP, Machado RR. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. *Ciência Rural* [Internet]. 2003;33(5):967–74. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782003000500027&lng=pt&tlng=pt
27. Yakovlev VA. Nitric oxide-dependent downregulation of BRCA1 expression promotes genetic instability. *Cancer Res.* 2013;73(2):706–15.
28. Arora H, Panara K, Kuchakulla M, Kulandavelu S, Burnstein KL, Schally A V., et al. Alterations of tumor microenvironment by nitric oxide impedes castration-resistant prostate cancer growth. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2018 Oct 30 [cited 2018 Nov 11];115(44):11298–303. Available from: <http://www.pnas.org/content/115/44/11298>
29. Lo M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. 2007;252:1–8.
30. Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B. Hydrogen peroxide – production , fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2015;1–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12964-015-0118-6>
31. Nogueira-Pedro A, Dias CC, Regina H, Segreto C, Addios PC, Lungato L, et al. Nitric oxide-induced murine hematopoietic stem cell fate involves multiple signaling proteins, gene expression, and redox modulation. *Stem Cells.* 2014;32(11):2949–60.
32. Ludin A, Gur-Cohen S, Golan K, Kaufmann KB, Itkin T, Medaglia C, et al. Reactive Oxygen Species Regulate Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal, Migration and Development, As Well As Their Bone Marrow Microenvironment. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2014;21(11):1605–19. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2014.5941>
33. Nogueira-Pedro A, Cesário TAM, Dias CC, Origassa CST, Eça LPM, Paredes-Gamero EJ, et al. Hydrogen peroxide (H₂O₂) induces leukemic but not normal hematopoietic cell death in a dose-dependent manner. *Cancer Cell Int.* 2013;13(1):1–9.
34. Nabeshima K, Iwasaki H, Nishio J, Koga K, Shishime M, Kikuchi M. Expression of emmprin and matrix metalloproteinases (MMPs) in peripheral nerve sheath tumors: Emmprin and membrane-type (MT)1-MMP expressions are associated with malignant potential. *Anticancer Res.* 2006;26(2 B):1359–67.
35. Merdad A, Karim S, Schulten H, Dallol A. Expression of MMPs in Primary Human Breast Cancer 201. 2014;1366:1355–66.
36. Li M, Liu LQ, Xi N, Wang YC, Xiao X Bin, Zhang WJ. Effects of temperature and cellular interactions on the mechanics and morphology of human cancer cells investigated by atomic force microscopy. *Sci China Life Sci.* 2015;58(9):889–901.
37. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6.