

ISTÉFANI LUCIENE DAYSE DA SILVA

**EXPRESSÃO DE Qa-2 E SUA RELAÇÃO COM O INFILTRADO LINFOCÍTICO E A
DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM DOIS MODELOS MURINOS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO**

**Belo Horizonte - MG
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG
FACULDADE DE MEDICINA**

TESE DE DOUTORADO

**EXPRESSÃO DE Qa-2 E SUA RELAÇÃO COM O INFILTRADO LINFOCÍTICO E A
DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM DOIS MODELOS MURINOS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO**

**Belo Horizonte - MG
2017**

ISTÉFANI LUCIENE DAYSE DA SILVA

**EXPRESSÃO DE Qa-2 E SUA RELAÇÃO COM O INFILTRADO LINFOCÍTICO E A
DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM DOIS MODELOS MURINOS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais como parte
dos requisitos para a obtenção do título de Doutor
em Patologia – área de concentração em Patologia
Geral.

Orientador: Prof. Dr. Enio Ferreira
Orientador estrangeiro: Prof. Dr. Miguel Quintanilla
Co-Orientadora: Profa. Dra. Renata Toscano Simões

**Belo Horizonte – MG
Faculdade de Medicina da UFMG
2017**

S586e Silva, Istefani Luciene Dayse da.
Expressão de Qa-2 e sua relação com o infiltrado linfocítico e a diferenciação celular em dois modelos murinos de adenocarcinoma mamário [manuscrito]. / Istefani Luciene Dayse da Silva. - - Belo Horizonte: 2017.
167f.: il.
Orientador: Enio Ferreira.
Coorientador: Miguel Quintanilla; Renata Toscano Simões.
Área de concentração: Patologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Carcinoma de Ehrlich. 2. Neoplasias da Mama. 3. Imuno-Histoquímica. 4. Quinases da Família src. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Ferreira, Enio. II. Quintanilla, Miguel. III. Simões, Renata Toscano. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.
NLM: QZ 206



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA ISTEFANI LUCIENE DAYSE DA SILVA

Realizou-se, no dia 26 de junho de 2017, às 08:30 horas, Sala de Videoconferência do CPG, 5º andar, Faculdade de Medicina da UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *EXPRESSÃO DE Qa-2 E SUA RELAÇÃO COM O INFILTRADO LINFOCÍTICO E A DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM DOIS MODELOS MURINOS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO*, apresentada por ISTEFANI LUCIENE DAYSE DA SILVA, número de registro 2013656143, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Profº. Enio Ferreira - Orientador (UFMG), Profª Renata Toscano Simoes (IEP), Profª. Helen Lima Del Puerto (UFMG), Profº. Dawidson de Assis Gomes (UFMG), Profª. Jose Augusto Nogueira Machado (IEP), Profª. Rosario Perona Abellón (Inst. de Investigaciones Biomédicas "Alberto s.").

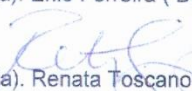
A Comissão considerou a tese:

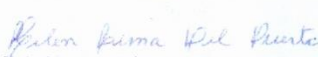
☒ Aprovada

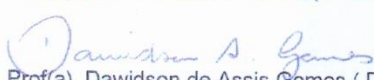
☐ Reprovada

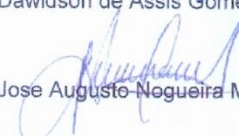
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 26 de junho de 2017.


Prof(a). Enio Ferreira (Doutor)


Prof(a). Renata Toscano Simões (Doutor)


Prof(a). Helen Lima Del Puerto (Doutor)


Prof(a). Dawidson de Assis Gomes (Doutor)


Prof(a). Jose Augusto Nogueira Machado (Doutor)


Prof(a). Rosario Perona Abellón (Doutora)

“Quem se arrisca a andar por ares nunca antes respirados ou pensar fora da curva, tem grandes chances de encontrar pedras no caminho. No entanto, ninguém é digno de contribuir para a ciência se não usar suas dores e insônias nesse processo. Risos e lágrimas, sucessos e fracassos, aplausos e vaias fazem parte do currículo de cada ser humano, em especial daqueles que são apaixonados por produzir novas ideias. “

Augusto Cury, 2014

*Dedico esse trabalho àqueles que
dedicaram sua vida a mim:
minha mãe e meu pai.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Dr. Enio Ferreira, a quem admiro e respeito. Obrigada por confiar em meu trabalho e também por sua amizade e compreensão.

Ao meu orientador estrangeiro Dr. Miguel Quintanilla. Obrigada por confiar em uma desconhecida e por não medir esforços para a realização do nosso trabalho.

A minha co-orientadora Dra. Renata Simões, amiga de longa data. Obrigada por todo apoio com a Biologia Molecular durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Geovanni Cassali, por compartilhar conosco seu espaço, equipamentos e principalmente pelo apoio dado a minha entrada ao doutorado. Sem esse apoio, todo este trabalho não seria possível. Muito obrigada!

A minha amiga Carol Volpe, pelo auxílio com os ELISAs, pelas excelentes contribuições e por todo carinho de sempre.

A minha amiga Kênia Cristina, pela excelente execução das PCRs quantitativas na minha ausência, pelo companheirismo e disposição de sempre.

Ao meu amigo Emerson Veloso, por estar sempre ao meu lado em todos os experimentos, e pela excelente execução das imuno-histoquímicas na minha ausência.

A minha ex-aluna e agora amiga, Ivy Nayra, por acompanhar os experimentos e estar sempre à disposição para ajudar.

A professora Miriam Lopes e a Ariadne do departamento de Farmacologia, por cederem gentilmente as células do tumor de Ehrlich.

A professora Mônica Cristina, Cláudia Salviano e Sália Lopes, por cederem gentilmente as células 4T1, cultivá-las e prepara-las para o envio a Madrid.

Ao professor Dawidson Gomes e ao Marcelo do laboratório de Imunologia e Biologia Celular do departamento de Bioquímica, por auxiliarem no recebimento, manutenção e expansão das células para a repetição dos experimentos.

A minha amiga Stéfane Valgas, por ser a veterinária oficial dos experimentos realizados no último ano, tornando-os mais seguros e menos dolorosos.

Aos alunos de iniciação científica que sempre se prontificaram em me auxiliar nos experimentos e cuidados com os animais, Bruna Cássia, Vanusa Paiva, Gabriel Dolabela e Larissa Vieira.

A minha amiga Lucía Montero-Montero, companheira de todas as horas. Obrigada por ter me ensinado a fazer Western Blot, gel de agarose, extração de RNA, clonagens, co-IP, transfecção e uma infinidade de outras técnicas. Obrigada ainda pela realização dos experimentos finais para a resposta aos referees do artigo.

A minha amiga Ester Martín-Villar, por receber minhas células antes da minha chegada e cuidar tão bem delas. Por me ensinar diversos detalhes de Biologia Molecular e cultivo celular, sendo o apoio a quem recorrer em todas as dificuldades.

Ao professor Jaime Renart, pelo auxílio nas clonagens e produção dos constructos de shRNA. Obrigada também pelos ótimos conselhos de Biologia Molecular.

Ao professor Jorge Martín Perez, pelos inibidores e anticorpos gentilmente cedidos e por todo conhecimento transmitido acerca da família Src.

Ao professor Bruno Sainz, por ceder-nos os primers e auxiliar-nos na execução das PCRs quantitativas dos fatores de transcrição. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos acerca das *stem cells*.

A minha amiga Maria Calvo, por estar sempre disponível quando precisava. Por gentilmente nos ceder o ensaio TUNEL, anticorpo para β -catenina e por todo auxílio na execução do ensaio de luciferase.

A Patrícia Carrasco, por me receber nas férias e dedicar o seu tempo escasso em ensinar-me as técnicas de cultivo celular.

A professora Irene, por ceder-nos gentilmente o kit de proliferação celular.

A professora Maria del Pílar Martín-Duque, por gentilmente ceder-nos as nanopartículas de ouro para a facilitação da infecção lentiviral.

A Graci do animalário madrileño, pela execução da inoculação tumoral em região mamária, bem como, por me ensinar a fazê-lo.

Aos serviços madrileños de animalário, almacén, cultivos, citometría, medios, microscopia, genômica, y seguridad. Vocês foram essenciais para o sucesso do nosso trabalho.

Aos professores Amparo Cano, Joan Brugge e Helen Yarwood pelos anticorpos gentilmente cedidos.

A CAPES, pela bolsa de doutorado sanduíche, a qual viabilizou amadurecimento e crescimento pessoal e profissional.

A CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo auxílio financeiro, o qual viabilizou a execução deste projeto.

Ao ministério de Economia e Competitividade Espanhol/Fundo Europeu para o Desenvolvimento Regional, pelo apoio cedido ao Dr. Miguel Quintanilla, viabilizando a execução do trabalho.

AGRADECIMENTOS

Pensei que este dia não fosse chegar. Minhas forças se esgotaram muitas vezes. Mas, foi a mão d'Ele que me levantou sempre. Agradeço a Deus por ser meu alento, meu sustento, minha força e luz neste caminho terreno. Obrigada por colocar pessoas especiais em meu caminho. Obrigada por sempre preparar algo melhor do que imagino para mim.

Aos meus pais, Clério e Maria Luzia, por suportarem minha ausência quando eu estava perto e muito ocupada, e quando estava distante vivendo meu sonho. Obrigada pelos bons momentos juntos. Pelos sorrisos sinceros. Pelo amor incondicional. Pela paciência com os meus erros e meu estresse. Amo vocês mais que chocolate! Que Deus os recompense!

A minha irmã, por ser forte o tempo todo. Suportando os seus problemas e os meus. Cuidando das nossas joias por mim. Obrigada por tudo que tem feito pelos nossos pais. Obrigada por ser a melhor irmã do mundo! Te amo!

Ao Klauder Dias, por estar comigo em todos os momentos, bons e ruins. Por compreender a minha incapacidade de relaxar enquanto escrevia. Pelas conversas tentando me acalmar. Pelo colo quando precisei chorar de raiva ou tristeza. Por me proporcionar alegria em meio as dificuldades. Por ser esse cara, com defeitos, mas em seu mundo imperfeito, sabe aceitar as minhas imperfeições e fazer meu dia mais feliz. Te amo!

Ao meu orientador Enio, que com seu jeito peculiar, soube respeitar e compreender minhas dificuldades, me dando o apoio e a paciência necessária nos momentos difíceis. Obrigada por duvidar de mim algumas vezes. Eu adoro desafios, e você sabe disso!

Aos mestres que me inspiraram a buscar a vida acadêmica, ainda que não o saibam, Marcela Possa, Enio Ferreira, Carol Policarpo, Bianca Pellucci e Marcos Soares. Ahh vocês vão se ver comigo... rsrs. Brincadeiras à parte, meu agradecimento por serem exemplos de profissionais.

A minha Xará querida, por estar sempre disposta a ajudar e por tornar a vida mais leve com seu sorriso e boas energias. Ao Mini-mini por ser meu filho algumas vezes, outras vezes meu irmão, mas sempre um grande amigo ao meu lado, me divertido com suas bobagens. A Ivy Nayra, amiga do peito, amiga para sempre, a quem tenho imenso carinho e orgulho. Obrigada amora por me fazer sorrir quando queria chorar, e por se preocupar tanto comigo. Ao Gabriel Dolabela que tentou nos abandonar, mas ainda resiste. Obrigada por todo carinho e pelas péssimas piadas (rsrs). A minha amiga Fernanda Camargo, por todo carinho e sincera amizade. Obrigada pelos bons momentos e pelos peitinhos apertados! (rs).

A todos os amigos do LPC, prof. Geovanni, Diego, Karine, Conrado, Marina, Taty, Ana, Josi, Carla, Miriã, Thiago (Ei, tá boa?), Aline, Michele, Fernanda Freitas, e muitos outros que deixaram o lab ou ingressaram durante esse meu percurso. Obrigada por me suportarem e por serem companheiros em todos os momentos!

A todos os amigos do IEP, que mesmo distantes nunca deixaram de me apoiar, motivar e compadecer das minhas dificuldades. Em especial a Kênia, que participou ativamente, ajudando na realização dos experimentos, e se preocupando comigo. Obrigada pelo carinho! Obrigada também à Carol, exemplo de serenidade e bom senso. Obrigada por todo auxílio e carinho. Agradeço também ao Fernando, as Maris, a Bibi, Claudinha, Cidiane, Paulinha, Cláudio, Rachel e Millena. Um beijo especial ao meu professor preferido: José Augusto!

Agradeço aos meu padrinhos e amigos a Rosely e Wilson, Karla e Bruno, Ronilda e Emerson, e Carol e Felipe, por compreenderam minha ausência de vida social. Obrigada por todo apoio.

Aos meus familiares, tios, tias, primos, que sempre torceram para que esse dia chegasse. Em especial ao meu tio Bê (*in memoriam*), que se alegrou com minhas alegrias e sofreu com minhas tristezas. Obrigada pelos bons momentos juntos!

A minha ex-chefe e eterna amiga, Yana Magalhães. Por ser exemplo de líder. Por ser humana e compreensiva. Por confiar em meu trabalho e me motivar a todo tempo. Com você aprendi lições para a vida toda. Muito obrigada!

A mi querido Miguel, director de tesis, amigo, padre, en fin, no hay palabras que o definan. Gracias por contestar mi mail. Has aceptado en su labo una desconocida. Además, has hecho una apuesta en ella, llevando su tiempo y dinero. Has creído en un proyecto que no es tuyo y que quizás no fuera generar frutos buenos. Me has confortado cuando me sentía mal por la salud de mi madre. Me has hecho sentirme en casa. Me has enseñado mucho con tu sabiduría y me has hecho ver la investigación de una manera mejor. Es mi guapísimo preferido... lo siento a Andrés, pero me gustan los guapísimos con gafas... jajaja. Muchas gracias por todo Miguel. Gente como Tú, transforma el mundo para mejor. Eres del tipo que aún puede ver la bondad en las cosas... que aún acredita en las personas y en la vida. Espero que no tenga decepcionado a ti.

Cuando mi fue hacia Madrid, he ganado muchas cosas, entre ellas, ¡una hermana menor! Lucía, hemos peleado algunas veces. Esto se pasa entre hermanos, lo sé... Perdóname si alguna vez te herí. Muchas gracias por tus enseñamientos técnicos y por tus consejos personales. Gracias por suportarme en mis peores días. Gracias por las clases de castellano. Gracias por hacerme creer en las cosas que hacía. Y de verdad, aún deseo pelear mucho contigo, porque no quiero dejar de tenerla como hermana. ¡Te quiero mucho!

Agradezco mucho a Esterilla, que ha sido fundamental para que pudiera hacer mis cosas. Ha sido una gran amiga, una gran maestra. ¡Quiero crecer y ser inteligente como tú! Muchas gracias por todo.

¡Gracias a María Calvo, la viejita coqueta de mi corazón! Gracias por todos los enseñamientos y por las risas a la hora de comer. Gracias por ser una gran amiga de todas las horas. Incluso a la hora de hacerse unas mechas en el pelo.

Al Andrés, el guapísimo de siempre. Gracias Andrés por vuestra amistad. Gracias por apoyarme cuando no tenía consuelo por lo de mi madre. Gracias por todos los buenos momentos.

A mi nuez preferida, Jaime Renart. Me has enseñado a pensar grande, a ser mejor. Gracias por todos los enseñamientos. Eres un estupendo maestro. Ojalá tuviera un parte de tu conocimiento. Gracias por compartirlo conmigo.

A Pilarín, Alex, Patri y Irene por todos los cortos, pero buenos momentos juntas. A Antonio y Fran por lo corto y provechoso tiempo juntos... y lo compañía a la hora de coger manzanas.

As mis colegas, Laura del 1.11, por siempre ofrecerme sonrisas y biscochos! A Marta y Graci del animalário que me acogerán de manera estupenda y me ayudaron en lo que necesité. A Diego y Carlos de la portería que siempre me sonreían por las mañanas aún que fuera un lunes. A Jorge y Victor, que en un corto tiempo me ayudarán mucho, haciendo el trabajo tener

otra cara. De la misma manera a Bruno Sainz, que me ayudó en los momentos finales, añadiendo valor al trabajo con sus contribuciones. A las chicas de la cafe, que siempre me ponían la comida con la sonrisa en la cara, y el “¿cómo quiere la leche?” que nos divertía un montón.

A mis amigos del PDE: Pilar, Paco, Pietra, Tereza, Loly y los demás. Por recibarnos tan bien y hacernos pasar unos buenos momentos juntos. Por traernos para más próximo de Dios y por enseñarnos un poco de vosotros. Gracias por vuestra amistad.

Gracias a los que nos acogerán, Carmen, Angela, Maravilla y Javier. Gracias por recibarnos, y por enseñarnos un poco de Madrid.

Los amigos de APPORTAIS, Fernando Serrano, Fernando Ayuso, José, Aitor, Itziar y Comba. Gracias por la confianza, y por los buenos momentos juntos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Hipótese.....	26
1.2 Objetivo geral	26
1.3 Objetivos específicos	26
2. REFERENCIAL TEÓRICO	28
2.1 Câncer de Mama	28
2.2 Progressão neoplásica	29
2.3 Modelos experimentais em câncer de mama	30
2.4 Resposta imune tumoral.....	34
2.5 EMT e CSC.....	36
2.6 HLA-G: características gerais	40
2.7 Qa-2: o homólogo murino do HLA-G	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 Estudos in vitro	46
3.1.1 Origem celular e condições cultivo	46
3.1.2 Derivação celular.....	47
3.1.3 Obtenção da linha 4T1luc.....	47
3.1.4 Construção de pcDNA3Q7 e transfecção	48
3.1.5 Ensaios de proliferação e invasão	49
3.1.6 Ensaio de inibição de Src	50
3.2 Estudos in vivo	51
3.2.1 Animais.....	51
3.2.2 Expressão de Qa-2 em animais portadores de tumor sólido de Ehrlich	51
3.2.3 Expressão de Qa-2 em animais portadores de tumor sólido de células 4T1.....	52
3.2.4 Ensaio para derivação de linhas celulares	52
3.2.5 Ensaio de tumorigenicidade	52
3.2.6 Efeitos da superexpressão de Qa-2 no desenvolvimento tumoral e surgimento de metástases do tumor de células 4T1	53
3.3 Procedimentos Técnicos	53
3.3.1 Ensaio Luciferase	53
3.3.2 Western blotting	54
3.3.3 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).....	55
3.3.4 Avaliação histopatológica	55

3.3.5 Imunohistoquímica	56
3.3.6 Imunofluorescência	57
3.3.7 Zimografia.....	57
3.3.8 Citometria de fluxo e Sorting	58
3.3.9 Quantificação relativa da expressão gênica	59
3.3.10 PCR convencional	60
3.3.11 Análise estatística	60
4. RESULTADOS.....	62
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
6. CONCLUSÃO.....	114
REFERÊNCIAS	115
APÊNDICES	128
ANEXOS	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers usados na técnica InFusion para a clonagem do gene H2-Q7.....	48
Tabela 2 - Anticorpos primários usados no Western Blot	54
Tabela 3 - Anticorpos secundários utilizados no Western blot	55
Tabela 4 - Anticorpos primários utilizados na Imunohistoquímica	56
Tabela 5 - Anticorpos primários utilizados na Imunofluorescência	57
Tabela 6 - Primers usados na quantificação relativa da expressão dos fatores de transcrição pelo ensaio SYBR® GREEN	59
Tabela 7 - Primers usados na PCR convencional	60

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Expressão dos miR-125a e miR-125b em tumores de Ehrlich e de células 4T1.....	129
APÊNDICE B – Avaliação histopatológica dos infiltrado inflamatório do tumor de células 4T1.....	133
APÊNDICE C – Caracterização complementar das células 4T1m e 4T1t.....	137
APÊNDICE D – Caracterização de 4T1-neo e 4T1-Q7.....	148
APÊNDICE E – Silenciamento da expressão de Qa-2.....	152

LISTA DE ABREVIATURAS

CD44s - *Cluster of differentiation 44 standard*
CD44v - *Cluster of differentiation 44 variable*
CK5 – Cytokeratin 5
c-MYC - *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*
COX2 – Cicloxigenase 2
CSC – *Cancer stem cells*
DAB – Diaminobenzidina
DAPI - 4',6-diamino-2-fenilindol
DASA - Dasatinib
DMBA – Dimetilbenzantraceno
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético
EGF - *Epidermal growth factor*
ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
EMT – *Epithelial-Mesenchymal Transition*
ENU - N-etil-N-nitrosourea
FBS - *Fetal bovine serum*
Fyn - *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn*
HE – Hematoxilina e Eosina
Hes1 - *Hes family bHLH transcription factor 1*
HIF1 α - Fatores induzidos por hipóxia alfa
HLA – G – Antígeno leucocitário humano G
Hpdt - *Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase 1*
IFN γ – Interferon gama
IL-10 – Interleucina 10
ILT - *Immunoglobulin-like transcript*
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
IRF-1 - *Interferon regulatory factor 1*
iRNA – Ácido ribonucleico de interferência

KIR - *Killer immunoglobulin-like receptor*

KLF4 - *Krüppel-like factor 4*

LB - Luria-Bertani

MCA3D – Linhagem de queratinócitos imortalizados

MET - *Mesenchymal-Epithelial Transition*

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

miRNA – Micro ácido ribonucleico

MMP – Metaloproteases

MMTV - *Mouse mammary tumor vírus*

MPO – Mieloperoxidase

NAG – *N-acetylglutamate synthase*

NANOG - *Nanog homeobox*

NF- κ B – Fator nuclear kappa beta

NK – *Natural Killers*

Oct3/4 - *Octamer-binding transcription factor 3/4*

PAF – Fator ativador de plaqueta

PBS - *Phosphate-buffered saline*

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PD-L1 - Proteína de morte celular programada

PDX - Xenoenxerto Derivado de Paciente

Ped - *Preimplantation embryo development gene*

PIR-B - *Paired immunoglobulin-like receptor B*

PP2 - 4-Amino-3-(4-chlorophenyl)-1-(t-butyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine

Qa-2 - *Qa lymphocyte antigen 2 region*

RE – Receptor de estrógeno

RNA – Ácido ribonucleico

ROI – *Regions of interest*

RP – Receptor de progesterona

SFK – *Src family kinases*

Src - *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*

shRNA – *Short hairpin ácido ribonucleico*

SNAI2 - *Snail family transcriptional repressor 2*

SNAIL - *Zinc Finger Factor Snail*

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo simples

Sox2 - *Sex determining region Y-box 2*

TGF- β – Fator de crescimento tumoral beta

TWIST 1/2- Twist family bHLH transcription factor 1/2

VEGF - Fator de crescimento endotelial e vascular

Zeb1 - *Zinc Finger E-box Binding Homeobox-1*

RESUMO

O Qa-2, descrito como homólogo murino do Antígeno Leucocitário Humano G, possui um papel controverso em neoplasias, em alguns momentos favorecendo e em outros prejudicando o desenvolvimento tumoral. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a expressão de Qa-2 em dois modelos experimentais de câncer de mama: tumor sólido de Ehrlich e tumor de células 4T1. Para tanto, experimentos com os dois modelos foram executados de maneira independente, onde para Ehrlich, realizou-se a avaliação da expressão sérica e tecidual de Qa-2 e a avaliação histopatológica do infiltrado inflamatório peritumoral, bem como a caracterização imuno-histoquímica do infiltrado linfocítico. No modelo 4T1, também foi realizada a avaliação da expressão de Qa-2 sérico e tecidual, seguidas da avaliação da expressão de Qa-2 em modelo de derivação de linhas celulares, de forma a avaliar os efeitos da transição epitélio-mesenquimal na expressão de Qa-2. Inibidores de quinases da família Src, as quais são implicadas no processo de transição epitélio mesenquimal, foram utilizados *in vitro* para a investigação dos seus efeitos na expressão de Qa-2. Ainda, por meio de clonagem gênica, foram obtidas células 4T1 que superexpressavam Qa-2, e seus efeitos no desenvolvimento tumoral e no surgimento de metástases foram avaliados *in vivo*. Nossos resultados mostraram perfis de expressão de Qa-2 diferentes para cada modelo tumoral estudado onde, em modelo de células 4T1 observa-se uma redução progressiva e em Ehrlich, observa-se um aumento no tempo intermediário de desenvolvimento tumoral. Ainda, no modelo 4T1 foi possível evidenciar que a redução da expressão de Qa-2 está relacionada a transição epitélio-mesenquimal e aquisição de características de células tronco neoplásicas. Os achados obtidos no experimento com células superexpressando Qa-2, mostraram redução do crescimento tumoral, associada a redução das metástases. Tais achados nos levam a concluir que o Qa-2 possui um papel inibitório no desenvolvimento tumoral em modelos de tumor sólido de Ehrlich e tumor de células 4T1, associado a menor agressividade tumoral.

Palavras-chave: Tumor sólido de Ehrlich, 4T1, histopatologia, câncer de mama, imunologia tumoral, EMT, CSC, Src quinases, Qa-2.

ABSTRACT

Qa-2, described as the murine homologue of Human Leukocyte Antigen G, plays a controversial role in neoplasms, favoring or harming tumor development. Thus, the aim of the present study was to characterize the expression of Qa-2 in two experimental models of breast cancer: Ehrlich solid tumor and 4T1 tumor cells. Experiments with the two models were performed independently, where for Ehrlich, was performed the evaluation of the serum and tissue expression of Qa-2 and the histopathological evaluation of the peritumoral inflammatory infiltrate and the immunohistochemical characterization of the lymphocytic infiltrate. In the 4T1 model, the evaluation of the serum and tissue Qa-2 expression was also performed, followed by the evaluation of the Qa-2 expression in the cell line derivation model, in order to evaluate the effects of the epithelial-mesenchymal transition in the expression of Qa-2. Inhibitors of Src kinases, which are implicated in the mesenchymal epithelial transition process, were used *in vitro* to investigate their effects on Qa-2 expression. Also, through gene cloning, 4T1 cells overexpressing Qa-2, were obtained, and its effects on tumor development and the onset of metastases were evaluated *in vivo*. Our results showed different Qa-2 expression profiles for each tumor model studied. The 4T1 tumor model underwent a progressive reduction and Ehrlich solid tumor, there was an increase in the intermediate time of tumor development. Furthermore, in the 4T1 model it was possible to show that the reduction of Qa-2 expression is related to epithelial-mesenchymal transition and characteristics of cancer stem cells. The findings obtained in the experiment with cells overexpressing Qa-2, showed reduction of the tumor growth, associated to reduction of the metastases. These findings lead us to conclude that Qa-2 plays an inhibitory role in tumor development in Ehrlich solid tumor models and 4T1 tumor cells, associated with lower tumor aggressiveness.

Keywords: Ehrlich solid tumor, 4T1, histopathology, breast cancer, tumor immunology, EMT, CSC, Src kinases, Qa-2.



O presente trabalho foi realizado em três laboratórios distintos, viabilizado pelo programa PDSE – CAPES (Processo Nr. 99999.009972/2014-05), definido pela inserção da bolsa de doutorado sanduíche.

Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral-ICB/UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte – MG, com apoio do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

Laboratório 1.12 do professor Dr. Miguel Quintanilla Ávila, no Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” – CSIC/UAM, Madrid, Espanha



CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. O desenvolvimento de novos métodos diagnóstico e novos tratamentos, tem ajudado a reduzir suas taxas de morbidade e mortalidade. Ainda assim, as metástases continuam sendo a principal causa de morte em pacientes com neoplasias.

Durante o processo de formação das metástases, uma cascata de eventos é desencadeada. Nesta cascata, o sistema imune desempenha um papel importante, podendo atuar como inibidor ou promotor das metástases. O que determina por qual via o sistema imune deve atuar, consiste nas modificações desencadeadas pelo microambiente tumoral. A teoria da imunoedição busca explicar estes eventos, onde, inicialmente o sistema imune atua eliminando a formação tumoral, podendo seguir a uma fase de equilíbrio entre sistema imune e tumor, evoluindo ainda para a fase de evasão a resposta imune.

Na fase de evasão a resposta imune, o tumor desenvolve estratégias como a capacidade de secretar fatores que modulem a resposta imune. Dentre estes fatores estão, *Tumor Growth Factor β* (TGF- β) e o *Human Leucocyte Antigen G* (HLA-G). O HLA-G tem sido identificado em diferentes tipos neoplásicos, e vem sendo associado ao pior prognóstico dos pacientes. Sua atuação consiste na ligação a receptores inibitórios presentes em diferentes células do sistema imune, levando a sua inibição, bem como, induzindo células regulatórias.

Embora existam várias publicações a respeito do HLA-G, a sua utilização como marcador diagnóstico, prognóstico e preditivo permanece inalcançada. O principal fator limitante é a inexistência de um modelo experimental adequado para o seu estudo. Os modelos atualmente disponíveis, são muitas vezes limitados ao *in vitro*, e em muitos casos, partem de xenoinxertos, exigindo a utilização de animais imunocomprometidos. Como alternativa, o estudo do seu homólogo murino, o Qa-2, seria o indicado.

O Qa-2 possui homologia ao HLA-G em estrutura gênica, proteica e em funcionalidade. Sua homologia funcional foi identificada em implantação de embriões e doenças autoimunes. Em

neoplasias, o seu papel permanece por esclarecer, onde, primeiramente foi descrito como molécula imunomoduladora e posteriormente como imunoestimuladora, o que torna necessária a realização de estudos que elucidem melhor o seu comportamento.

Seu papel imunoestimulador se dá principalmente pela sua capacidade de ativar linfócitos T CD8+, levando a sua expansão e eliminação das células tumorais. Também já foi evidenciada sua capacidade de apresentar antígenos, tornando sua atuação semelhante à de moléculas de classe Ia. Essa apresentação de antígenos tem sido relacionada a ativação de linfócitos T $\gamma\delta$. Ainda, já foi evidenciado que sua expressão em alguns tumores como em linfomas, mielomas, melanomas, mastocitomas, hepatomas, câncer retal e adenocarcinoma renal, é perdida durante a progressão neoplásica. Tais achados reforçam a concepção de que o Qa-2, embora descrito como homólogo murino de HLA-G, pode apresentar função distinta em determinadas situações, especialmente na resposta imune tumoral.

Sendo o Qa-2 o homólogo murino, os modelos experimentais murinos de câncer de mama tumor sólido de Ehrlich e tumor de células 4T1, adequam-se bem a proposta do presente estudo. Dessa maneira, o presente trabalho objetivou caracterizar a expressão de Qa-2 nos modelos de tumor sólido de Ehrlich e no tumor de células 4T1, descrevendo sua relação com o perfil de linfócitos infiltrantes no tumor, a transição epitélio-mesenquimal, as características de pluripotência bem como, os efeitos da sua superexpressão no desenvolvimento tumoral.

Para uma melhor compreensão dos dados, o presente trabalho foi dividido em 5 capítulos: (1) introdução, (2) referencial teórico, (3) material e métodos, (4) resultados e (5) considerações finais e (6) conclusões. O capítulo 4, referente aos resultados foi ainda dividido em 2 seções: (1) artigo 1 e (2) artigo 2.

1.1 Hipótese

A expressão de Qa-2 é perdida durante o desenvolvimento dos tumores de Ehrlich e de células 4T1, e a indução da sua expressão reduz o crescimento tumoral.

1.2 Objetivo geral

Caracterizar a expressão de Qa-2 nos modelos de adenocarcinoma mamário murino de tumor sólido de Ehrlich e tumor de células 4T1.

1.3 Objetivos específicos

Determinar os níveis de expressão sérica e tecidual de Qa-2 em camundongos Balb/c com tumor sólido de Ehrlich, correlacionando com características de intensidade, distribuição e padrão celular do infiltrado inflamatório peritumoral e tumoral.

Determinar os níveis de expressão sérica e tecidual de Qa-2 em animais Balb/c com tumor de células 4T1.

Relacionar a expressão de Qa-2 com as características de invasão e proliferação em células 4T1 derivadas de implantes tumorais na região mamária e flanco de animais Balb/c fêmeas.

Avaliar a variação da expressão de Qa-2, bem como, de marcadores de transição epitélio-mesenquimal e células tronco tumorais após a inibição das proteínas da família Src quinases nas células 4T1 derivadas.

Investigar os efeitos da superexpressão de Qa-2 no desenvolvimento tumoral e no surgimento de metástases.



CAPÍTULO 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Câncer é um grupo de doenças que se caracteriza por células anormais que podem proliferar de maneira descontrolada, invadindo ou migrando para outras partes do corpo, ou seja, formando metástases (Sato, Saji et al. 2016). As metástases são a principal causa de morte por câncer. Este cenário persiste mesmo diante dos grandes avanços no diagnóstico e tratamento das neoplasias (Weidle, Birzele et al. 2017). Nesse contexto inúmeras neoplasias são descritas, apresentando diferentes características, incidência, prognóstico e tratamento. Dentre estes, o câncer de mama possui notável importância principalmente por sua alta incidência.

2.1 Câncer de Mama

O câncer de mama é o principal câncer que acomete mulheres em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo o aumento da expectativa de vida um dos responsáveis pela elevação da incidência dessa neoplasia (Torre, Siegel et al. 2016). De acordo com as últimas estatísticas disponíveis, em 2012, 14,1 milhões de novos casos de câncer foram diagnosticados e 8,2 milhões de pessoas morreram em decorrência dessa patologia. A *Cancer Research United Kingdom* estima um aumento de 68% na incidência de câncer até 2030. Dentro dessas estatísticas, o câncer de mama em ambos os sexos representou 12% de todos os casos diagnosticados (1,7 milhões de pessoas) e 6% de todas as mortes (522.000 pessoas) (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015).

No Brasil, estima-se que anualmente sejam diagnosticados 171 casos de câncer por cada 100.000 habitantes, e 42 casos de câncer de mama para cada 100.000 mulheres. Estima-se ainda que 100 pessoas para cada 100.000 habitantes venham ao óbito por câncer no Brasil, e que 12 a cada 100.000 mulheres faleçam por câncer de mama (OMS, 2017).

Os métodos diagnósticos do câncer de mama são em geral, simples e pouco onerosos. São eles, autoexame das mamas, mamografia e ultrassonografia. A biópsia da lesão é utilizada como método confirmatório, e esta permite a realização da classificação histológica, molecular e estadiamento do tumor (Trufelli et al. 2008).

Unindo diagnóstico e tratamento, muitos marcadores moleculares têm sido usados como preditivos e até mesmo como prognóstico. Dentre estes, os mais comuns são: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor de fator de crescimento epidérmico 2 (HER-2) (Lang, Wechsler et al. 2015).

2.2 Progressão neoplásica

Muitos dos marcadores moleculares estão relacionados ao processo conhecido como progressão neoplásica. A progressão neoplásica em câncer de mama é composta por 5 estágios já bem descritos. O estágio 0 é geralmente composto por tipos não invasivos de câncer de mama, como carcinoma ductal *in situ* e carcinoma lobular *in situ* e em quase 100% dos casos tem bom prognóstico. Os estágios 1 a 3 representam os tipos invasivos de câncer de mama, onde, o estágio 1 ainda não tem acometimento dos linfonodos, o estágio 2 tem ao menos um linfonodo acometido e o estágio 3 tem 2 ou mais linfonodos acometidos. Já o estágio 4 é o de pior prognóstico e caracterizado por metástases à distância, como a pulmões, ossos, cérebro ou fígado (Ham and Moon 2013).

Para que ocorra a evolução desses estágios, as células precisam sofrer muitas modificações. Neste processo, o microambiente tumoral e a epigenética desempenham um papel crucial para o sucesso da progressão. Juntos, estes vão subsidiar as modificações necessárias na reprogramação celular, para a aquisição das características favoráveis a metástase e sobrevivência das células neoplásicas. Dentre as quais, podemos citar a perda de proteínas de adesão, interação com proteínas da matriz, produção de collagenases e metaloproteases representam algumas das importantes modificações necessárias para a aquisição da capacidade de metastatização (Cichon, Degnim et al. 2010; Castano, Tracy et al. 2011; Rossi, Pericleous et al. 2014; Qiao, Gu et al. 2016).

O microambiente tumoral engloba um complexo de células não neoplásicas, componentes estruturais, moléculas e produtos químicos que cercam as células neoplásicas. Entre os componentes celulares estão fibroblastos, células imunes e células vasculares, e entre os outros fatores estão citocinas, fatores de crescimento e produtos metabólicos. É descrito que o

microambiente influencia no desenvolvimento tumoral assim como o tumor influencia no microambiente tumoral de maneira a modificá-lo a seu favor, como, por exemplo, na produção de fatores pró-inflamatórios pelo microambiente tumoral, que favorecem o crescimento tumoral, e a produção de fatores pró-angiogênicos pelas células tumorais, levando a formação de novos vasos no microambiente tumoral (Gould and Courtneidge 2014; Yuan, Jiang et al. 2016).

2.3 Modelos experimentais em câncer de mama

Para a melhor compreensão dos processos envolvidos na progressão neoplásica, muitos modelos experimentais têm sido propostos. Os camundongos representam o principal modelo experimental utilizado para simular a grande variedade de eventos que sucedem no desenvolvimento do câncer de mama humano. Dentre as vantagens da sua utilização estão: seu pequeno tamanho, o que facilita o seu alojamento e manipulação; rápida reprodução e longa vida útil; sequenciamento completo do seu genoma já disponível; manipulação genética com grande facilidade e por fim, compartilham muitas semelhanças fisiológicas com seres humanos (Manning, Buck et al. 2016).

Aproximadamente 32.000 linhagens murinas são descritas. Dentre essas linhagens estão as isogênicas, não isogênicas, mutantes, recombinantes, entre outras, sendo cada linhagem aplicável a determinado tipo de estudo (Eppig, Motenko et al. 2015). Em câncer de mama, diferentes linhagens murinas e modelos experimentais têm sido utilizados. Os modelos comumente utilizados são: espontâneos; espontâneos por mutações induzidas; induzidos por carcinogênese química, física ou biológica; xenoenxertos transplantáveis; isogênico transplantável (Alvarado, et al. 2017).

Os modelos espontâneos são caracterizados pelo surgimento espontâneo dos tumores mamários sem necessidade de nenhuma intervenção humana. Dentre estes estão algumas linhagens de camundongos como C3H (Mao, Qu et al. 2014), fêmeas Kunming (Zheng, Zhou et al. 2014), entre outros. No entanto, os modelos espontâneos não se restringem a camundongos, também são utilizadas cadelas (Liu, Xiong et al. 2014) e felinos (Wiese, Thaiwong et al. 2013). Já os

modelos espontâneos por mutações induzidas, são originados graças ao grande avanço na engenharia genética. Mutações são realizadas em embriões para a geração de animais geneticamente modificados, os quais são posteriormente cruzados entre si para gerarem animais em homozigose ou heterozigose da alteração gênica induzida. Esta alteração gênica é suficiente para gerar tumores espontaneamente durante o desenvolvimento do animal uma vez que, as mutações são direcionadas a genes sabidamente relacionados a carcinogênese mamária. Estes modelos visam mimetizar o que ocorre em humanos, e dentre eles estão os modelos FVB/N-Tg (MMTVPyMT) 634Mul (Wilson, Bachawal et al. 2014) e C3(1)/SV40Tag (Steiner, Davis et al. 2014).

Outros modelos geneticamente modificados também têm sido utilizados. Muitos deles são *knockout* para os genes de interesse e assim permitem o estudo funcional deste produto gênico específico frente a um tumor transplantado por exemplo (Killion, Radinsky et al. 1998; Dranoff 2011).

Os modelos induzidos por carcinogênese química, física e viral já foram descritos na literatura para a geração de modelos de estudo de câncer de mama, embora, nem sempre tenha permanecido restritos a este sítio neoplásico. Nestes casos, os agentes comumente utilizados são 7,12-Dimethylbenz[a]anthraceno (DMBA), N-etil-N-nitrosourea (ENU), e acetato de medroxyprogesterona como agentes químicos, radiação gamma como agente físico e o retrovírus *mouse mammary tumor virus* (MMTV) como agente biológico (Kim, Cao et al. 2004; Lanari, Lamb et al. 2009; Bult, Krupke et al. 2015).

Os modelos transplantáveis têm especial atenção por sua facilidade de manuseio e o reduzido número de animais necessários para a realização do experimento, isto é, não são necessários muitos animais para escolher entre eles quais apresentam espontaneamente o tumor ou são portadores da alteração genética desejada (Killion, Radinsky et al. 1998). Os modelos transplantáveis originados de tumores humanos exigem a utilização de animais imunocomprometidos, já que, são considerados xenotransplantes. Em câncer de mama, os mais conhecidos e utilizados são as linhas celulares MDA-MB231 e MCF-7, ambas, linhagens celulares originalmente isoladas de tumores humanos que atualmente são mantidas em cultivo

celular e podem ser inoculadas de maneira ectópica ou ortotópica em camundongos imunocomprometidos (Aumsuwan, Khan et al. 2016). Esse modelo, no entanto, pode apresentar limitações consideráveis de acordo com o que se deseja avaliar, como por exemplo, no caso de avaliação da resposta imune tumoral. Como alternativa para a redução da limitação dos modelos xenotransplantáveis, os modelos murinos humanizados foram desenvolvidos. Estes, são animais imunodeficientes reconstituídos com células imunes humanas, favorecendo a reprodução parcial da resposta imune tumoral, possibilitando a avaliação dos seus efeitos no desenvolvimento tumoral (Cheon and Orsulic 2011; Dranoff 2011).

Ainda, em busca da reprodução da individualidade e heterogeneidade das neoplasias, o modelo de Xenoenxerto Derivado de Paciente (*Patient-Derived Xenografts – PDX*) foi desenvolvido e tem sido cada vez mais utilizado. Neste modelo, um fragmento de tumor do paciente é implantado diretamente em um murino. Desta forma, este xenoenxerto está livre dos efeitos do cultivo celular nas características celulares permitindo ainda uma melhor avaliação da resposta a terapia, tornando o tratamento individualizado (Manning, Buck et al. 2016).

Os modelos isogênicos transplantáveis são caracterizados pela inoculação de cultivos celulares previamente isolados de um tumor espontâneo oriundo da mesma linhagem murina a ser utilizada. A principal característica deste modelo experimental é a utilização de animais imunocompetentes permitindo uma melhor avaliação do comportamento do microambiente tumoral frente ao tumor. Igualmente aos xenoenxertos, este modelo pode ser inoculado de maneira ectópica ou ortotópica de acordo com os objetivos propostos e são especialmente utilizados nos estudos de metástases, embora nem todos sejam capazes de metastatizar (Ottewell, Coleman et al. 2006).

Diversas linhagens celulares compõem o grupo de tumores isogênicos transplantáveis, sendo cada uma com características proliferativas e metastáticas distintas. Dentre essas, a linhagem 4T1 é amplamente utilizada por ser altamente tumorigênica, invasiva e diferente de muitos tumores tem a capacidade de metastatizar espontaneamente a múltiplos órgãos distantes. Inúmeras características tornam este modelo apropriado para o estudo do câncer de mama: facilidade de manuseio e implantação ectópica ou ortotópica; capacidade de metastatizar

espontaneamente e por vias semelhantes as já descrita em humanos; comparável ao estadiamento IV em mulheres; e considerado triplo negativo, sendo equivalente a um dos subtipos neoplásicos com maior complexidade de tratamento, uma vez que, geralmente não são responsivos às terapias hormonais (Pulaski and Ostrand-Rosenberg 2001; Ottewell, Coleman et al. 2006; Ho, Lin et al. 2012; Singh, Ramos et al. 2013; Silva, Ferreira et al. 2016).

Outro modelo extensivamente estudado é o tumor de Ehrlich, originado de um adenocarcinoma mamário murino espontâneo em um camundongo Swiss (não isogênico). Este modelo tem a capacidade de crescer na forma ascítica e é mantido por passagens seriadas intraperitonealmente. Quando inoculado no subcutâneo, este pode proliferar em sua forma sólida, também conhecido como tumor sólido de Ehrlich. Uma vez que é descrito na literatura que as células de Ehrlich em sua forma ascítica perdem os antígenos do complexo de histocompatibilidade, acredita-se que seja este o motivo da sua capacidade de proliferação em quase todos os murinos (Jaganathan, Mondhe et al. 2010; Frajacom, de Souza Padilha et al. 2016). O tumor sólido de Ehrlich tem sido utilizado para o estudo da dor (Calixto-Campos, Zarpelon et al. 2013), responsividade a drogas (Osman, Ahmed et al. 1993) e recentemente, foi descrito como um modelo apreciável no estudo da caquexia por câncer (Frajacom, de Souza Padilha et al. 2016).

A resposta inflamatória nos tumores de Ehrlich e 4T1 tem sido um aspecto bastante explorado. No entanto, no tumor de Ehrlich, os estudos que abordam este tema o fazem especialmente na forma ascítica do tumor, ou avaliam a modulação da resposta imune em função de drogas testadas. Na forma ascítica do tumor de Ehrlich, o desenvolvimento do tumor leva ao aumento de leucócitos e redução de eritrócitos, associados com aumento de Óxido nítrico sintase induzível (iNOS), interferon gama (IFN γ) e cicloxigenase 2 (COX2). Variações significativas na infiltração de neutrófilos, mastócitos ou de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ não foram observadas (Fernandes, Guerra et al. 2015). Outro estudo avaliou o efeito do fator ativador de plaqueta (PAF) na inflamação gerada frente ao tumor de sólido de Ehrlich. A inoculação tumoral em animais *knockout* para o receptor de PAF mostrou redução de alguns mediadores da inflamação como, N-acetylglutamate synthase (NAG) e mieloperoxidase (MPO) (Ferreira, Barcelos et al. 2007).

Para o modelo 4T1, é descrito que animais portadores deste tumor apresentam uma reação leucemóide e significativa esplenomegalia, as quais resultam em uma infiltração granulocítica massiva. Acredita-se que esses granulócitos possam exercer um papel fundamental no auxílio à evasão a resposta imune tumoral, uma vez que, a redução destas células resulta em diminuição do desenvolvimento de metástases. Ainda, a utilização de meio condicionado de células 4T1 inibe a expressão de IFN- γ em esplenócitos em cultivo. Sendo o IFN- γ importante para a ativação da resposta imune tumoral, esses achados indicam que as células 4T1 são capazes de secretar fatores importantes para a modulação da resposta imune (Kano 2015).

Utilizando animais geneticamente modificados para desenvolverem artrite reumatoide, um grupo de pesquisadores os inocularam com tumor de células 4T1. O resultado evidenciou que estes animais com artrite reumatóide apresentavam mais metástases ósseas que seus controles, demonstrando assim a relação entre o ambiente inflamatório e a atração de células neoplásicas (Das Roy et al. 2009). Ainda, já foi demonstrada que a atuação do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) é essencial para a inflamação, ativação de linfócitos e sobrevivência das células. Em 4T1, foi demonstrado que a ativação deste fator de transcrição é condicionada ao microambiente ao qual se encontra, sendo mais ativada quando as células são inoculadas de maneira ortotópica (Takahashi, Nagai et al. 2015). Ainda assim, estudos que esclareçam o papel de moléculas imunomoduladoras específicas, como o Qa-2, são deficientes.

2.4 Resposta imune tumoral

As diversas alterações sofridas pelas células durante o processo de transformação neoplásica, como a expressão de antígenos mutados, as tornam imunogênicas, ou seja, atraem a resposta imune na tentativa de eliminar essa nova formação. Diversas observações confirmam a atuação do sistema imune contra o surgimento das neoplasias como, regressão espontânea dos tumores, aumento da incidência de neoplasias em indivíduos imunocomprometidos, e a associação entre os linfócitos infiltrantes no tumor e o melhor prognóstico (Giraldo, Becht et al. 2015).

As imunidades inata e adaptativa trabalham em conjunto para a eliminação das células transformadas. Os linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ Th1 são os principais mediadores celulares na

eliminação das células transformadas através da indução da apoptose ou liberação de grânulos citotóxicos (Giraldo, Becht et al. 2015). No entanto, a pressão seletiva exercida pelo microambiente tumoral pode alterar a resposta imune, permitindo a sobrevivência de células transformadas e favorecendo a progressão do tumor (Vesely and Schreiber 2013).

Esta alteração da resposta imune é conhecida como teoria da imunoeedição ou teoria dos “3 Es”, onde cada “E” corresponde a uma fase da imunoeedição: (1) Eliminação – nesta fase, imune inata e adaptativa atuam juntas na eliminação das células transformadas através da capacidade de reconhecimento e resposta a antígenos tumorais; (2) Equilíbrio – nesta fase, as células não eliminadas na fase anterior entram em um estado de dormência onde sofrem edições genéticas e permanecem ocultas ao sistema imune; (3) Evasão – nesta fase, as edições genéticas sofridas na fase anterior possibilitam a aquisição de mecanismos de evasão a resposta imune, tais como, perda do MHC de classe I, perda de moléculas co-estimulatórias, aumento de sinalização de vias de sobrevivência celular, ou mesmo o desenvolvimento de um microambiente imunossupressor por produção de TGF- β , e proteína de morte celular programada (PD-L1), etc. (Mittal, Gubin et al. 2014; Teng, Galon et al. 2015).

Dunn e colaboradores (2004), revisam que, igualmente a fase de escape, a fase de equilíbrio exerce um importante papel na imunoeedição. Os autores descrevem que após a redução do tumor ocorrida na fase de eliminação, as células transformadas remanescentes são seletivamente mais resistentes, e a instabilidade genética presente nestas células transformadas, favorecem o ganho de novas mutações oportunas para a evasão a resposta imune. Ainda, os autores propõem que as células em equilíbrio podem seguir 3 diferentes caminhos: (1) sofrer eventual eliminação pelo sistema imune; (2) permanecer por vários anos em equilíbrio pelo controle da imunidade celular e molecular e (3) progredir a seguinte fase da imunoeedição, o escape.

Diferentes alterações celulares e moleculares são descritas na fase de escape: alterações em moléculas transdutoras de sinais em células efectoras; liberação de fatores solúveis derivados do tumor; desenvolvimento de tolerância imunológica e a perda da expressão de Complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I) (Kim, Emi et al. 2007). A perda do MHC

de classe I pode ocorrer por mutações pontuais ou deleções gênicas, ou ainda, por redução ou perda da sua transcrição. Dentre os inúmeros fatores solúveis que são liberados, O TGF- β e a interleucina 10 (IL-10) são as mais descritas e correlacionadas ao pior prognóstico (Reeves and James 2017).

Outro fator solúvel bastante descrito e relacionado a fase de escape, é o HLA-G. É descrito que durante a fase de equilíbrio ocorre a ativação do promotor do gene HLA-G, o qual participa da fase seguinte modulando a resposta imune principalmente através da ligação a receptores inibitórios em diferentes células imunes (Urosevic and Dummer 2008).

Outros eventos ainda têm sido diretamente relacionados a evasão a resposta imune. Estes eventos são conhecidos como *Epithelial-Mesenchymal Transition* (EMT) e *Cancer Stem Cells* (CSC). Embora muitas vezes sejam tratados como eventos individuais, EMT e CSC estão intimamente relacionados pela perda de diferenciação celular, a qual se relaciona ainda com maior facilidade de evasão a resposta imune tumoral pela perda de imunogenecidade (Chockley and Keshamouni 2016; Otvos, Silver et al. 2016).

2.5 EMT e CSC

A EMT é caracterizada pela capacidade das células epiteliais sofrerem transição mesenquimal. Este processo é conhecido fisiologicamente na embriogênese e cicatrização de feridas, mas também é descrito em processos patológicos como em neoplasias. Em neoplasias, este processo está relacionado a aquisição de características que permitam a migração, invasão e metástases, como, perda da adesão célula-célula e de polaridade, aquisição de motilidade, invasividade e características “*stem*”, ou seja, características de células tronco (Li and Li 2015).

A EMT pode ser revertida, e essa reversão tem sido implicada no estabelecimento das metástases, ou seja, as células sofrem EMT, adquirem características favoráveis para a migração, invasão e evasão à resposta imune, migram, e após chegarem ao órgão alvo a EMT é revertida, e as células sofrem o processo conhecido como *Mesenchymal-Epithelial Transition* (MET). Portanto, EMT provavelmente seja sustentada por modificações moleculares

transitórias induzidas por fatores do microambiente tumoral, como hipóxia, por exemplo (Li and Li 2015). Cannito e colaboradores (2008) demonstraram em linhas celulares de hepatoblastoma humano, carcinoma pancreático, carcinoma de colón e carcinoma mamário, que, ao serem submetidas a condições de hipóxia, todas as linhas celulares estudadas sofreram modificações clássicas da EMT, tais como, fenótipo mesenquimal com translocação nuclear de *Zinc Finger Factor Snail* (SNAIL) e β -catenina, e aumento das características de motilidade e invasividade. Além disso, os autores observaram que os eventos iniciais da EMT foram dependentes do aumento transitório de espécies reativas de oxigênio intracelular, enquanto, migração e invasividade foram sustentadas por mecanismos dependentes de fatores induzidos por hipóxia alfa (HIF1 α) e fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF) (Rotzschke, Falk et al. 1993). Dessa maneira, a reversibilidade da EMT vem sendo cada vez mais relacionada a mecanismos reguladores epigenéticos, os quais permitem, a reprogramação celular de maneira eficiente e facilmente reversível (Li and Li 2015; Bottoni, Isgro et al. 2016).

Damiano e colaboradores (2017) demonstraram a relação entre a metilação de miR-200c/miR-141, a qual resulta em baixa expressão deste, com a presença de metástases em linfonodos e alta expressão de *Zinc Finger E-box Binding Homeobox-1* (Zeb1) em adenocarcinomas mamários triplo-negativos (RE-, RP- e HER-2-). O silenciamento de Zeb1 *in vitro* reduziu a metilação de miR-200c/miR-14, reforçando a relação entre os eventos epigenéticos e a EMT (Maria de Souza, Fonseca de Carvalho et al. 2012). Outros autores também tem apresentado resultados semelhantes com outros micro ácidos ribonucleicos (miRNAs) (Zhang, Cai et al. 2014) e outras neoplasias (Wu, Cao et al. 2015; Huang, Lu et al. 2016).

Já o conceito de CSC, também conhecidas como células iniciadoras de tumor, foi primeiramente introduzido em leucemias, no entanto, sua existência em tumores sólidos também tem sido relatada (Maccalli, Volonte et al. 2014). As CSC são caracterizadas pela capacidade indefinida de auto renovação e diferenciação, estão em pequeno número em uma população de células neoplásicas, são resistentes a quimioterapia e radioterapia, permanecem na fase estacionária do ciclo celular, possuem alta capacidade metastática, capacidade de formar esferas e expressam marcadores de células tronco (Ishiwata 2016).

Dois principais modelos tentam explicar a hierarquia tumoral: o modelo estocástico ou da evolução clonal, e o modelo de células tronco cancerosas. No modelo estocástico acredita-se que qualquer célula dentro de um tumor seja capaz de dar origem a outros tumores e possibilitar a progressão tumoral. Já o modelo de CSC propõe que estas células representam um conjunto biologicamente distinto da população total de células cancerosas. São as CSC que mantêm o tumor através da sua capacidade de auto renovação e são elas a explicação para a resistência a quimioterapia/radioterapia (Plaks, Kong et al. 2015).

Embora sejam extensivamente estudadas, um ponto importante na existência das CSC permanece por esclarecer: a sua origem. Há especulações de que as CSC são originadas de células tronco adultas teciduais que sofreram transformações por agentes carcinogênicos originando CSC e levando a formação do tumor, ou são células adultas que ao se transformarem adquiriram as características de células tronco (Islam, Qiao et al. 2015). No entanto, a relação entre EMT e CSC é inquestionável. É descrito que células tumorais circulantes coexpressam marcadores de EMT e CSC (Plaks, Koopman et al. 2013; Plaks, Kong et al. 2015).

O estado de pluripotência celular é mantido por fatores conhecidos como *stem cell factors*, os quais são fisiologicamente silenciados durante a diferenciação celular como consequência da metilação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) ou remodelamento da cromatina. Alguns dos fatores descritos são *sex determining region Y-box 2* (SOX2), *Octamer-binding transcription factor 4* (Oct3/4), *Krüppel-like factor 4* (KLF4), *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (c-Myc), *hes family bHLH transcription factor 1* (Hes1) e *Nanog homeobox* (NANOG), e ambos têm sido identificados em diferentes tipos de neoplasias e relacionados às características de pluripotência celular (Vlashi and Pajonk 2015). Já o estado pós EMT é caracterizado pela redução ou ausência de marcadores epiteliais como E-caderina e β -catenina, e aquisição de marcadores mesenquimais como N-caderina e vimentina. Além desses marcadores, diferentes fatores de transcrição estão relacionados a manutenção deste estado, como, *Zeb 1/2*, *SNAIL*, *snail family transcriptional repressor 2* (SNAIL2) e *twist family bHLH transcription factor 1/2* (TWIST 1/2). Interessantemente, a indução de superexpressão destes fatores de transcrição de EMT induzem o estado de pluripotência celular. Ainda, alguns autores sugerem que CSC representam um estado intermediário de EMT, onde expressam baixo a

moderado nível de marcadores epiteliais, mas ao mesmo tempo, expressam marcadores mesenquimais exibindo suas características (Abell and Johnson 2014; Lin, Liu et al. 2015).

Muitas outras vias de sinalização são ainda relacionadas a EMT e CSC. A sinalização mediada por tirosinas quinases não receptoras Src, por exemplo, tem sido associada a ambas (Ungefroren, Sebens et al. 2011; Thakur, Trivedi et al. 2015).

Diante de tantas reprogramações genéticas sofridas que resultam em alterações fenotípicas, a imunogenicidade destas células também sofre alterações. A EMT e CSC podem favorecer a evasão a resposta imune tumoral através de diferentes mecanismos, como a indução da expressão de PD-L1 levando a imunossupressão (Chen, Gibbons et al. 2014).

Interessantemente, o mais bem estudado e caracterizado regulador do processo de EMT é o TGF- β . O TGF- β é conhecido como um peptídeo multifuncional, pertencente a superfamília de citocinas e responsável por regular diferentes processos como, proliferação celular, morfogênese tecidual e diferenciação celular. Em tumores, o TGF- β exerce um complexo papel, sendo um supressor de tumor nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral e atuando como promotor tumoral, criando um microambiente favorável a EMT em estágios mais tardios da progressão metastática (Derynck, Muthusamy et al. 2014; Bottoni, Isgro et al. 2016).

É descrito que, o TGF- β e *epidermal growth factor* (EGF) induzem a redução de MHC de classe I, e está associada a EMT via aumento da expressão de Snail em células de câncer de próstata. Esse evento tem grande importância na evasão à resposta imune, uma vez que, o MHC de classe I é essencial para a apresentação de antígenos e consequentemente a ativação da resposta imune tumoral (Chen, Liu et al. 2015).

Igualmente ao TGF- β , o HLA-G é uma proteína imunomoduladora e importante na evasão a resposta imune tumoral. No entanto, sua possível relação com EMT e CSC permanece inexplorada.

2.6 HLA-G: características gerais

A proteína HLA-G foi primeiramente identificada na interface materno-fetal em 1987 como homóloga a proteína murina Qa, e tem como função conferir tolerância materna ao feto. O seu gene está localizado no braço curto do cromossomo 6 e ela pertence ao grupo de HLA de classe I, dentro do grupo de moléculas não clássicas. São conhecidas 7 isoformas distintas geradas por *splincing* alternativo dos oito exóns que constituem o seu Ácido Ribonucléico mensageiro (RNAm), sendo quatro delas ligadas a membrana (HLA-G1, G2, G3 e G4) e três isoformas solúveis (HLA-G5, G6 e G7) (Carosella, Rouas-Freiss et al. 2015). Ainda, uma isoforma solúvel pode ser gerada por *sheeding*, ou seja, clivagem proteolítica da isoforma transmembrana HLA-G1 por metaloproteases (MMPs) (Amodio, Sales de Albuquerque et al. 2014).

Além dos fatores convencionais de ativação da transcrição de HLA-G (ATF1/CREB1/c-jun) e repressores (*Ras responsive element-binding protein 1* e *GLI-3 factor*), três fatores alternativos são descritos e possuem especial importância em processos patológicos nos quais o HLA-G pode estar envolvido. São eles: (1) *interferon regulatory factor 1* (IRF-1), (2) *Heat-shock factor 1* (HSF-1) e (3) progesterona (Alegre, Rizzo et al. 2014; Carosella, Rouas-Freiss et al. 2015). Embora pouco polimórfico, o gene HLA-G possui diferentes polimorfismos relacionados a regulação da sua expressão como a inserção de 14pb e o polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) +3142 C/G, o qual é descrito como sítio de ligação de miRNAs, podendo alterar sua afinidade de ligação e assim, a regulação da sua expressão (Silva, Muniz et al. 2013; Amodio, Sales de Albuquerque et al. 2014).

A atuação da proteína HLA-G é mediada pela sua capacidade de ligação a receptores inibitórios presentes nas diferentes células imunológicas. Os principais receptores são: *immunoglobulin-like transcript* (ILT)2 e ILT4, *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR)2DL4 e receptor de LTCD8+. Através dessa interação, HLA-G é capaz de inibir células Natural Killers (NK) e Linfócitos citotóxicos. Além disso, HLA-G pode induzir diferentes tipos de células de tolerância imunológica, como linfócitos T regulatórios, célula dendrítica-10 e *T regulatory type 1* (Amodio, Sales de Albuquerque et al. 2014).

A expressão de HLA-G tem sido bastante estudada em diferentes processos fisiológicos e patológicos, como, tolerância imunológica em tecidos fetais e adultos, doenças autoimunes, infecções virais, doenças inflamatórias, transplantes e diferentes tipos de neoplasias (Curigliano, Criscitiello et al. 2013). Em neoplasias, o HLA-G foi primeiramente estudado em tumores hematológicos, como leucemia e linfomas. No entanto, sua expressão também tem sido estudada em diferentes tumores sólidos como, melanoma, câncer de pele não-melanoma, carcinoma renal, carcinoma de bexiga, adenocarcinoma da próstata, carcinoma esofágico de células escamosas, câncer gástrico, adenocarcinoma endometrial, carcinoma ovariano, gliomas, câncer de pulmão e câncer de mama (Amiot, Ferrone et al. 2011).

Em câncer de mama, Elliot e colaboradores (2011) afirmam que, a expressão de HLA-G é preferencialmente evidenciada em lesões malignas de mama, e raramente em mama normal. Os autores afirmam ainda, que o completo entendimento dos mecanismos desencadeados ou que desencadeiam a expressão de HLA-G para culminar na evasão a resposta imune tumoral, permanece distante. No entanto, é evidente que HLA-G desenvolve um papel fundamental no processo de escape imunológico tumoral.

Diferentes outros autores relacionam polimorfismos de regiões reguladoras da expressão de HLA-G com seus níveis de expressão e consequentemente, com o pior prognóstico de pacientes com câncer de mama (de Kruijf, Sajet et al. 2010; He, Dong et al. 2010; Jeong, Park et al. 2014; Haghi, Hosseinpour Feizi et al. 2015; Ostapchuk, Perfi L'eva Y et al. 2015; Konig, Kasimir-Bauer et al. 2016). No entanto, poucos trabalhos com animais experimentais foram realizados (Loumagne, Baudhuin et al. 2014; Wu, Kuiaste et al. 2015), o que distancia a utilização do HLA-G como alvo terapêutico.

2.7 Qa-2: o homólogo murino do HLA-G

O sistema de histocompatibilidade murino é dividido em clássico (classe Ia) e não clássicos (Ib). Os genes da classe Ib são distribuídos em regiões Qa e Tla do cromossomo 17. A região Qa está localizada adjacente a região de classe Ia, e é considerada uma região muito

conservada. Em animais C57BL/6 a região Qa contém 10 genes (*Q1* a *Q10*, sendo *Q3* pseudogene) e a região Tla contém 29 genes (*TL1* a *TL29*) (Weiss, Golden et al. 1984).

Dentre os genes contidos na região Qa, os genes *Q3*, *Q5*, *Q6*, *Q7*, *Q8* e *Q9* são conhecidos como *preimplantation embryo development gene* (Ped gene), e estão intimamente relacionados a implantação de embriões. No entanto, as funções, bem como, os produtos dos genes *Q3* e *Q5* são desconhecidos. Por outro lado, os genes *Q6*, *Q7*, *Q8* e *Q9* são altamente homólogos, e conhecidos por codificarem a proteína Qa-2 (Stroynowski and Tabaczewski 1996).

O produto gênico Qa-2 foi descrito antes mesmo que o seu homólogo humano, o HLA-G. Isso se deu em 1976 por Flaherty (Flaherty, 1976), e até os dias atuais, o completo entendimento de suas funções permanece desconhecido. Esta proteína apresenta pouco polimorfismo gênico, mas, grande diversidade em seus níveis de expressão de acordo com a linhagem murina a que nos referimos. Foram descritas linhagens que expressam altos níveis de Qa-2 (Qa-2^{high}), médio (Qa-2^{med}), baixo (Qa-2^{low}) ou mesmo, linhagens que não expressam Qa-2 (Qa-2^{null}). De acordo com a literatura, a linhagem murina Balb/c é considerada Qa-2^{med} pois, possui apenas os genes *Q6* e *Q7* funcionais. Já a linhagem C57BL/6 é considerada Qa-2^{high} uma vez que, possui os quatro genes funcionais (*Q6*, *Q7*, *Q8* e *Q9*) (Stroynowski and Tabaczewski 1996; Ungchusri, Chiang et al. 2001).

Por outro lado, a semelhança entre os genes codificadores de Qa-2 os fazem serem tratados como pares gênicos: *Q6/Q8* e *Q7/Q9*. O par gênico *Q6/Q8* codifica uma proteína com domínio transmembrana, enquanto *Q7/Q9* codifica uma proteína ligada a membrana através de *glycosylphosphatidylinositol* (GPI). É descrita mais de 99% de identidade entre os genes de cada par, e 93% entre os pares (Wu, Feng et al. 1999). O *splicing* alternativo pode gerar ainda um isoforma solúvel a partir do produto gênico *Q7/Q9*, que perde o exon 5, perdendo o sinal de processamento e ligação ao GPI (Ulker, Lewis et al. 1990; Tian, Xu et al. 1992). Outra forma de geração de isoforma solúvel é através da *shedding*, igualmente ao descrito para HLA-G (He, Tabaczewski et al. 2001).

A distribuição destas isoformas proteicas em tecido adulto é ubíqua, no entanto em baixas quantidades, com exceção do cérebro, onde estudos não evidenciaram sua expressão (Ungchusri, Chiang et al. 2001). Além disso, a expressão de Qa-2 tem sido descrita em diferentes células do sistema imune, como células apresentadoras de antígenos, células relacionadas com a imunidade de mucosas como células intestinais, células epiteliais túmicas e linfócitos T (Flaherty, Elliott et al. 1990).

Dentre as funções conhecidas para essa molécula, o aumento da clivagem propiciando a implantação de embriões é uma das mais descritas (Tian, Xu et al. 1992; Cao, Brenner et al. 1999; Wu, Feng et al. 1999). Quanto às suas atividades imunomodulatórias, Qa-2 pode inibir as células NK através de receptores ainda não descritos (Chiang, Henson et al. 2002). No entanto, ortólogos dos receptores de HLA-G são descritos e podem ser possíveis ligantes como o *paired immunoglobulin-like receptor B* (PIR-B), ortólogo do receptor humano ILT (Loumagne, Baudhuin et al. 2014). Outra função descrita é sua capacidade de ativar e desencadear a proliferação de linfócitos mediada por Fyn, um dos membros da família da tirosina quinase Src (Hahn and Soloski 1989; De Fazio and Warner 2007). Ainda, esta molécula tem sido descrita como apresentadora de antígeno, especialmente em células intestinais (He, Tabaczewski et al. 2001; Poussier, Ning et al. 2002), bem como, relacionada a rejeição a transplantes, onde, seu aumento indica melhor tolerância ao enxerto (Lu, Wan et al. 2009).

A homologia descrita para HLA-G e Qa-2 se dá em estrutura gênica, estrutura proteica e função. A estrutura proteica completa é constituída por três domínios α , sendo $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, sempre associados a uma $\beta 2$ -microglobulina (Ungchusri, Chiang et al. 2001). Já sua homologia em funcionalidade tem sido descrita na implantação de embriões, rejeição a transplantes e doenças auto-imunes (Comiskey, Goldstein et al. 2003; Lee, Choi et al. 2010; Lu, Wang et al. 2011). A inibição de Qa-2 através de ácidos ribonucleicos de interferência (iRNA) em um modelo experimental de doença de Behcet, uma doença auto-imune, resultou em aumento dos sintomas, demonstrando o efeito imunomodulador desta proteína e corroborando como função homóloga ao HLA-G (Lee, Choi et al. 2010).

Em neoplasias, o Qa-2 foi primeiramente avaliado em linfoma de células T e B, mastocitoma, melanoma, hepatoma, câncer retal e adenocarcinoma renal. Somente os linfomas de células T foram positivos para a expressão membranar de Qa-2, levando a conclusão de que a expressão de Qa-2 está ausente ou diminuída em células com características de malignidade (Ungchusri, Chiang et al. 2001).

Em melanoma, Qa-2 foi inicialmente descrito como homólogo funcional do HLA-G, modulando a resposta imune tumoral através da inibição das células NK (Chiang, Henson et al. 2002). Pouco depois, o mesmo grupo de pesquisadores o descreveram como oposto ao HLA-G, ativando linfócitos T CD8⁺ e levando a eliminação do tumor (Chiang and Stroynowski 2004; Chiang and Stroynowski 2006).

Nenhum trabalho descrevendo a expressão de Qa-2 em neoplasias mamárias foi encontrado na literatura consultada, sendo assim, o papel do Qa-2 no desenvolvimento/progressão tumoral, e consequentemente, sua homologia funcional ao HLA-G permanecem por esclarecer.



CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentadas todas as metodologias utilizadas na realização da presente tese. Serão descritos ainda, todo o material utilizado, bem como, a procedência deste material. É importante ressaltar, que a metodologia apresentada caracteriza o trabalho como um todo, sendo melhor evidenciado no capítulo de resultados a aplicação destas metodologias de acordo com cada objetivo proposto.

3.1 Estudos *in vitro*

3.1.1 Origem celular e condições cultivo

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino de Ehrlich foi gentilmente cedida pela professora Dra. Miriam Tereza Paz López (Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil). As células, mantidas em ultracongelamento pela referida professora, foram descongeladas e inoculadas intraperitonealmente em dois animais, 8 dias antes da realização do protocolo experimental. Após a produção de ascite, os animais foram eutanasiados e o líquido intraperitoneal foi aspirado, centrifugado e lavado com solução tampão fosfato salino (*Phosphate-buffered saline* – PBS). Em seguida, as células foram contadas e avaliadas quanto a viabilidade com azul de trypan, para posterior realização de estudos *in vivo* (Dagli, 1989).

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino 4T1 foi gentilmente cedida pela professora Dra. Mônica Cristina de Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil) e previamente adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC, USA). Já a linhagem MCA3D foi cedida pelo professor Dr. Miguel Quintanilla Ávila (IIBm, Madrid, Espanha) e mantida em seu laboratório. A linhagem MCA3D, caracterizada por queratinócitos imortalizados, foi utilizada como controle em alguns testes e foi obtida como descrito previamente (Vallejo, Cruz-Bermudez et al. 2013).

As linhagens celulares 4T1m e 4T1t foram obtidas a partir do experimento de derivação celular, descrito mais adiante, e são originadas de tumores da região mamária e do flanco

respectivamente. Para acompanhamento do desenvolvimento tumoral *in vivo*, através de imagens, as células 4T1 foram infectadas com lentivírus contendo o gene da luciferase, obtendo-se assim a linha 4T1luc. A linha 4T1luc foi então transfectada com plasmídeo vazio (4T1-neo) ou contendo o gene Q7 (4T1-Q7). Os procedimentos realizados para tanto, serão descritos mais adiante.

A linhagem celular 4T1 e todas provenientes desta, foram mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com 10% de *fetal bovine serum* (FBS), suplementado com penicilina/estreptomicina e L-glutamina. Para a linhagem 4T1luc, o meio foi ainda suplementado com 7,6 µg/mL de puomicina. Já as linhagens superexpressando Qa-2, por serem provenientes da 4T1luc, receberam além da puomicina outros antibióticos, sendo que as linhas 4T1-neo e 4T1-Q7, foram mantidas em meio suplementado com 0,6 mg/mL de G418 (Sigma-Aldrich). A linhagem MCA3D foi mantida em HAM's F12, também suplementado com 10% FBS, ampicilina/gentamicina e L-glutamina. Todas as células foram mantidas a 37°C em incubador de atmosfera úmida de 5% de CO₂.

3.1.2 Derivação celular

Após a realização do experimento *in vivo* de derivação descrito mais adiante, duas novas linhas celulares foram obtidas a partir da linhagem parental 4T1: 4T1m, derivada do animal inoculado na região mamária, e 4T1t derivada do animal inoculado no flanco. Para isso, a técnica de cultivo de explantes foi realizada. Pequenos fragmentos de tumor foram transferidos a uma placa p60 com meio DMEM 10% FBS, suplementado com penicilina/estreptomicina. Os explantes foram mantidos por aproximadamente 2 semanas, sendo realizada a troca do meio a cada 3-4 dias. Após esse período, os explantes foram retirados, e a camada de células aderidas na placa mantidas até confluência de 80%, sendo então passadas para posteriores análises quanto a sua morfologia e perfil comportamental.

3.1.3 Obtenção da linha 4T1luc

As células 4T1 foram infectadas com lentivírus *CMV-Luciferase firefly* (Amsbio Abingdon, UK) recobertos com nanopartículas de ouro (sintetizadas e gentilmente cedidas pela professora

doutora María del Pilar Martín Duque – Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, Espanha), selecionadas por resistência a puromicina 7,6 µg/mL durante 2 semanas, e testadas para atividade de luciferase *in vitro*, dando origem a linhagem chamada 4T1luc.

3.1.4 Construção de pcDNA3Q7 e transfecção

Para a obtenção da superexpressão de Qa-2, o vetor plasmidial pcDNA3 foi utilizado por permitir a geração de células transfectadas estáveis através da seleção feita por resistência a G418 (Geneticina). Os primers utilizados para este fim, foram desenhados através da utilização da ferramenta *InFusion Cloning Primer Design Tool* (Clontech), onde é gerado automaticamente o sítio de restrição para EcoRI, e sintetizados pela Sigma-Aldrich. As sequências podem ser evidenciadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Primers usados na técnica InFusion para a clonagem do gene *H2-Q7*

Iniciadores	Sequência (5'– 3')	Amplicon (pb)
<i>H2-Q7 – Forward</i>	CAGTGTGCTGGAATTCATGGCTCTAACAATGCTGCTC	1016
<i>H2-Q7 – Reverse</i>	GATATCTGCAGAATTCCCACCTGTGTTTCACCTCCTA	

O RNA total foi extraído de células 4T1 utilizando-se o kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen), submetido a transcrição reversa com M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), e amplificado por reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional utilizando-se os primers descritos e *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs®). O produto da PCR foi verificado em gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich), marcados com *Syber Safe* (ThermoFisher) e visualizados em PhotoDoc-It 55 + transiluminador LM26E (Cultek). Vetor e inserto foram submetidos a digestão enzimática por EcoRI (New England Biolabs®) de acordo com as recomendações do fabricante.

Vetor e inserto foram ligados pelo método *in fusion* utilizando-se o *In-Fusion® HD Cloning Kit* (Clontech®), de acordo com as recomendações do fabricante. O produto da ligação (10µL) foi transformado em bactérias competentes DH5α, as quais foram posteriormente semeadas em placas contendo meio LB e 100µg/mL de ampicilina e incubadas *overnight* a 37°C. As colônias obtidas foram testadas quanto a presença do inserto através de PCR convencional. Para isso as colônias foram rascadas, repassadas a uma nova placa, e remanescente adicionadas ao tubo de reação contendo o mix de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®) e os mesmos primers utilizados para a geração do inserto. As colônias positivas apresentaram bandas de ~1kb em gel de agarose 1% e foram selecionadas para o seguinte passo de verificação.

O seguinte passo de verificação consistiu em semear as colônias consideradas positivas em 5mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido contendo 100µg/mL de ampicilina, incubá-las a 37°C *overnight*, e realizar a extração plasmidial com o kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Os plasmídeos extraídos foram submetidos ao sequenciamento pelo método de Sanger em *ABI 3130xl Genetic Analyzer* (ThermoFisher). As sequências obtidas foram então alinhadas a sequência de H2-Q7 (RefSeq. NM_010394.4) através do programa *Geneious®* (Auckland, New Zealand). Feita a confirmação, os melhores constructos foram selecionados e novamente transformados em bactérias competentes como previamente descrito. As bactérias recém transformadas foram semeadas em 200mL de meio LB líquido contendo 100µg/mL para a realização da extração plasmidial com o kit *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (Qiagen).

Vetor vazio e vetor contendo Q7 foram transfectados nas células 4T1luc utilizando-se *Lipofectamine 2000* (Invitrogen®) segundo recomendações do fabricante. As novas linhagens celulares geradas foram nomeadas 4T1-neo e 4T1-Q7, respectivamente. As células foram então selecionadas por resistência plasmidial a G418 com 0,6 mg/mL, e posteriormente testadas por citometria de fluxo e qPCR para os níveis de expressão de Qa-2 (Q7).

3.1.5 Ensaios de proliferação e invasão

As células 4T1, 4T1m, 4T1t e MCAD3 foram testadas quanto as suas capacidades proliferativas e invasivas *in vitro*. Para a avaliação da proliferação celular, 5x10³ células por

well foram semeadas em placas de 96-wells em aproximadamente 200 μ L de meio e incubadas por 24 horas. Após este período, as células foram então incubadas com o reagente XTT, proveniente do *XTT Cell Proliferation Assay Kit* (ATCC), seguindo todas as recomendações do fabricante. A absorbância foi determinada utilizando leitor de placa (Bio-Rad), a cada hora, de 2 a 7 horas após o início da incubação.

A capacidade de invasão foi determinada utilizando-se o ensaio de *Transwell* onde, $2,5 \times 10^4$ células foram transferidas para a câmara superior do *Matrigel-coated invasion chambers* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) em meio sem soro. Meio contendo soro, foi adicionado nas câmaras inferiores como quimioatraente. Depois de 24 horas de incubação, as células que não invadiram foram retiradas, e as demais fixadas em metanol e coradas com cristal violeta 0,1%. O número de células invadindo foram contadas manualmente em 10 campos escolhidos aleatoriamente ao microscópio em aumento de 200x. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes.

3.1.6 Ensaio de inibição de Src

A avaliação dos efeitos da inibição das proteínas da família Src foi realizada *in vitro* através da utilização e dois inibidores já descritos: Dasatinibe 100 mM e PP2 5 μ M (Sanchez-Bailon, Calcabrini et al. 2012). Aproximadamente 6×10^5 células (4T1m e 4T1t) foram semeadas em triplicata em placas p60 e incubadas por 24 horas. Decorrido este tempo, o tratamento foi adicionado e mantido por 48 horas. A cada 24 horas foi realizada a visualização em microscópio e a captura de fotos para avaliação de alterações morfológicas. As células foram contadas ao final do experimento para a determinação do índice de proliferação e a coloração de azul de trypan 0,4% (ThermoFisher) foi utilizada para a determinação da viabilidade celular. Parte das células foi ainda destinada a extração proteica e Western Blotting.

3.2 Estudos *in vivo*

3.2.1 Animais

Balb/c fêmeas (6 semanas, 20 gramas) foram obtidas do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil ou da casa comercial Envigo e mantidos no Biotério do Instituto de Investigaciones Biomedicas “Alberto Sols” (IIBm), Madrid, Espanha. Os animais foram mantidos a temperatura de 24°C, com ciclos 12h claro e 12h escuro, e aclimatizados durante uma semana antes da realização do protocolo experimental. O presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais sob os protocolos nº 350/2012 e 03/2015 (Anexo A), e pelo Comitê de uso animal do Conselho Superior de Pesquisa Científica (CSIC – Espanha; PROEX 34/14). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as recomendações estabelecidas pela União Europeia (2010/63/UE) e o “*National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*”.

3.2.2 Expressão de Qa-2 em animais portadores de tumor sólido de Ehrlich

Os animais foram divididos em dois grupos: controle (n=26) e tumor (n=26). O grupo controle foi obtido pela inoculação de 0,05 mL de salina e o grupo tumor, pela inoculação de $2,5 \times 10^6$ células de Ehrlich em um volume de 0,05 mL (suspensão em PBS). Ambas inoculações foram realizadas entre os coxins plantares do membro posterior esquerdo. Os grupos controle e tumor, foram ainda subdivididos em 3 subgrupos de acordo com o dia de eutanásia: CTRL-2 (2 dias); CTRL-7 (7 dias); CTRL-14 (14 dias); EHR-2 (2 dias); EHR -7 (7 dias); EHR -14 (14 dias). Nos respectivos dias, os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésico (pentobarbital sódico 50 mg/kg, via I.P), e amostras de sangue foram coletadas de todos os grupos para realização da dosagem sérica de Qa-2. Amostras de tumor, linfonodos, pulmões, baço, coração, fígado e cérebro também foram coletadas para avaliação histopatológica e imunohistoquímica

3.2.3 Expressão de Qa-2 em animais portadores de tumor sólido de células 4T1

Os animais foram divididos em dois grupos: controle (n=15) e tumor (n=15). O grupo controle foi obtido pela inoculação de 0,1 mL de salina e o grupo tumor, pela inoculação de $2,5 \times 10^6$ células 4T1 em um volume de 0,1mL (suspensão em PBS). Ambas inoculações foram realizadas no flanco esquerdo destes animais. O grupo controle e tumor, foram ainda subdivididos em 3 subgrupos de acordo com o dia de eutanásia: CTRL-10 (10 dias); CTRL-17 (17 dias); CTRL-24 (24 dias); 4T1-10 (10 dias); 4T1-17 (17 dias) e 4T1-24 (24 dias). Nos respectivos dias, os animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésico (pentobarbital sódico 50 mg/kg, via I.P), e amostras de sangue foram coletadas de todos os grupos para realização da dosagem sérica de Qa-2. Amostras de tumor também foram coletadas para avaliação histopatológica e imunohistoquímica.

3.2.4 Ensaio para derivação de linhas celulares

Para a caracterização de um modelo representativo de CSC e EMT, foi realizada a derivação de linhas celulares. Para isso, um animal foi inoculado com 1×10^6 células 4T1 diluídas em PBS para um volume final de 0,1mL na região mamária, e outro animal no flanco posterior esquerdo. Após os tumores atingirem o volume de 1cm^3 , os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 e os tumores retirados para realização de cultivos primários através da técnica de explantes descrita no tópico 3.1.2.

3.2.5 Ensaio de tumorigenicidade

Para o ensaio de tumorigenicidade, os animais foram divididos em 3 grupos: 4T1 (n=3), 4T1m (n=3) e 4T1t (n=3). Os animais foram inoculados no flanco posterior esquerdo com as respectivas linhagens celulares, sendo inoculadas 1000 células diluídas em PBS para um volume final de 0,1 mL. Os animais foram observados duas vezes por semana para verificação do surgimento de crescimento tumoral, durante um período de 23 dias. Após esse período, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 . O volume tumoral foi obtido através da

mensuração de dois diâmetros ortogonais utilizando-se paquímetro, e determinado através da fórmula proposta por Fulzele e colaboradores (Fulzele, Chatterjee et al. 2006).

3.2.6 Efeitos da superexpressão de Qa-2 no desenvolvimento tumoral e surgimento de metástases do tumor de células 4T1

Para avaliação dos efeitos da superexpressão de Qa-2, os animais foram divididos em 2 grupos: Controle (n=7) e Experimental (n=7). Os animais do grupo controle foram obtidos através da inoculação de células 4T1-neo previamente transfectadas e estabelecidas, sendo 1×10^5 células diluídas em PBS para um volume final de 0,1mL. O grupo experimental foi obtido através da inoculação de 1×10^5 células 4T1-Q7, previamente transfectadas com vetor contendo o gene Q7 e devidamente estabelecidas, diluídas em PBS para um volume final de 0,1 mL. Os animais foram acompanhados através do ensaio de luciferase em intervalos irregulares, sendo a cada 3-5 dias, para avaliação do crescimento tumoral e metástases. Após 28 dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e amostras de pulmão foram coletadas para análise de imunofluorescência confirmatória da presença de metástases.

3.3 Procedimentos Técnicos

3.3.1 Ensaio Luciferase

Para confirmação da atividade da luciferase incorporada ao DNA das células 4T1 através da infecção lentiviral, foi realizado o teste *in vitro* *Dual-Glo® Luciferase Assay System* (Promega) observando todas as recomendações do fabricante.

Para acompanhamento do crescimento tumoral e avaliação do surgimento de metástases, foi realizado o ensaio *in vivo* para atividade de luciferase, utilizando-se a inoculação de 100 µl de solução de *D-Luciferin, Potassium Salt* (Gold Biotechnology®) intravenosa. Imagens foram obtidas através do sistema de imagem *IVIS Lumina III In Vivo Imaging System* (PerkinElmer®), e a curva de crescimento tumoral determinada a partir das medidas obtidas para as *Regions of Interest* (ROI), dadas pelo software *Living Image 4.0* (PerkinElmer®).

3.3.2 Western blotting

Para a análise da expressão proteica, as células foram lisadas com tampão RIPA (*RadioImmunoPrecipitation Assay buffer*), suplementado com coquetel inibidor de proteases (Merck Milipore) e inibidor de fosfatases NaF (Sigma-Aldrich). A quantidade de 30 µg de proteínas foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, e transferidas a membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). As membranas foram então bloqueadas por 1 hora em leite desnatado 5% (Sigma-Aldrich) e incubadas *overnight* com os respectivos anticorpos primários (Tabela 2). Em seguida, as membranas foram então incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados a HRP (Tabela 3). A reação foi então revelada por Pierce™ ECL *Western Blotting Substrate* (ThermoFisher) e sensibilização de membranas radiográficas. As membranas foram escaneadas e a quantificação relativa das bandas realizadas através do software *Image J* (NIH, USA).

Tabela 2 - Anticorpos primários usados no Western Blot

Alvo	Clone	Diluição	Marca
E-caderina	ECCD2	1:250	Hibrimoda*
β-catenina	610153	1:2000	BD Biosciences
Vimentina	RV202	1:250	BD Bioscience
Citoqueratina 5	EPR1600Y	1:1500	Abcam
Src	327	1:500	Abcam
p-Src	Y232	1:1000	Abcam
CD44	KM-201	1:200	Hibridoma**
Twist 1/2	poli GTX127310	1:1000	Genetex
Sox-2	AF2018	1:200	R&D Systemms
β-actina	AC-74	1:10000	Sigma-Aldrich
Tubulina	DM1A	1:10000	Sigma-Aldrich

*Hibridoma gentilmente cedido pela professora Dra. Amparo Cano – IIB-UAM, Espanha.

**Hibridoma proveniente do laboratório do professor Dr. Miguel Quintanilla IIB-UAM, Espanha.

Tabela 3 - Anticorpos secundários utilizados no Western blot

Alvo	Clone	Diluição	Marca
Mouse	NXA931	1:2000	GE Healthcare
Rat	C2814	1:5000	Santa Cruz Biotechnologies
Rabbit	NA934V	1:5000	GE Healthcare

3.3.3 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

A avaliação da expressão do Qa-2 plasmática em animais com tumor 4T1 ou tumor de Ehrlich e seus respectivos controles foi realizada através do teste de ELISA utilizando-se um kit específico (*Qa lymphocyte antigen 2 region*, Qa-2, Qa-2 ELISA Kit – MyBiosource.com). Todas as amostras de plasma obtidas dos grupos controle e experimental foram submetidas a centrifugação a 3000rpm por 5 minutos e o teste realizado levando em consideração todas as recomendações do fabricante.

3.3.4 Avaliação histopatológica

Os tecidos obtidos nos estudos *in vivo* do experimento em animais apresentando o tumor Ehrlich e de células 4T1 foram fixados em formol tamponado 10%, desidratado em série crescente de álcoois e incluídos em parafina. Secções histológicas do tumor, linfonodos, pulmões, baço, coração, fígado e cérebro foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) e utilizadas para a avaliação da presença de metástases e classificação do infiltrado inflamatório.

A avaliação do infiltrado inflamatório peritumoral foi realizada considerando 3 fatores: distribuição (focal ou difusa), intensidade (fraca, moderada ou intensa) e o padrão celular (mononuclear, polimorfonuclear ou misto – mononuclear e polimorfonuclear). Ainda, o infiltrado inflamatório intratumoral foi avaliado quanto a intensidade (fraca, moderada ou intensa).

3.3.5 Imunohistoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para a avaliação da expressão de Qa-2 nos experimentos de 4T1 e Ehrlich, e para a avaliação do infiltrado inflamatório realizado no experimento de Ehrlich. O sistema de detecção estreptavidina peroxidase (*Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP – ready to use- Lab Vision; DAKO K0690*) foi utilizado. Secções histológicas de 3 µm foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em álcool em concentrações decrescentes e por fim em água, posteriormente sendo empregada recuperação antigênica usando solução de citrato (DAKO), pH 6 em calor úmido (banho-maria) durante 20 minutos para todos os anticorpos utilizados, exceto para o anti-Foxp3+, o qual foi utilizado EDTA 1mM em steamer. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário (Tabela 4) e por 15 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Ultra Vision Block, Lab Vision), anticorpo secundário (Biotin Goat, Lab Vision), estreptavidina peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision). Para a revelação foi utilizado como cromógeno o DAB (Diaminobenzidina, Lab Vision), em incubação durante 1-5 minutos.

Tabela 4 - Anticorpos primários utilizados na Imunohistoquímica

Alvo	Clone	Diluição	Marca
Qa-2	69H1-9-9	1:100	eBioscience
CD3+	CD3-12	1:500	UC-Davis
CD4+	GK1.5	1:100	eBioscience
CD8+	4SM15	1:100	eBioscience
Foxp3+	sc-53876	1:600	Santa Cruz Biotechnologies

A avaliação da marcação de Qa-2 em células neoplásicas foi realizada de maneira semiquantitativa e atribuição de score, onde foi atribuído o score +1 quando até 10% das células eram positivas para Qa-2, score +2 quando de 11-25% das células eram positivas, e score +3 quando mais de 25% das células eram positivas para Qa-2. Já a avaliação da expressão de Qa-2 em células inflamatórias peritumorais foi realizada a partir da obtenção da média de células positivas em 15 campos em aumento de 600x. A avaliação da marcação para CD3+, CD4+,

CD8+ e Foxp3+ foi realizada a partir da média de células positivas em 10 campos em aumento de 400x.

3.3.6 Imunofluorescência

Para imunofluorescência tecidual, confirmatória da presença de metástases, foram obtidas secções histológicas de 5 µm de amostras de pulmões provenientes do experimento de superexpressão de Qa-2, fixadas em formol 10% e incluídas em parafina. As amostras foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em álcool em concentrações decrescentes e por fim em água. A recuperação antigênica foi realizada em Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1mM em panela de pressão. Os cortes foram incubados com anticorpo primário descrito na Tabela 7, e posteriormente amplificados com *TSA Cyanine 3 System Kit* (PerkinElmer). As amostras foram então montadas em *ProLong® Diamond Antifade Mountant with DAPI* (ThermoFisher Scientific), visualizadas e fotografadas em microscópio de fluorescência Eclipse 90i (Nikon).

A imunofluorescência em células foi realizada como forma de análise qualitativa da expressão de Qa-2. Para tanto, as células foram cultivadas por 48 horas em placas P60, contendo 5 lamínulas esféricas recobertas por polisina. As lamínulas foram lavadas, permeabilizadas com solução Triton 0,05%, e incubadas com anticorpo primário (Tabela 5). As amostras foram então montadas em *ProLong® Diamond Antifade Mountant with DAPI* (ThermoFisher Scientific), visualizadas e fotografadas em microscópio de fluorescência Eclipse 90i (Nikon).

Tabela 5 - Anticorpos primários utilizados na Imunofluorescência

Alvo	Clone	Diluição	Conjugado	Marca
Qa-2	69H1-9-9	1:100	FITC	eBioscience
Luciferase	Poli NB100-1677SS	1:100	Não	Novus

3.3.7 Zimografia

Para avaliação da atividade das MMPs nas linhas derivadas, a zimografia foi realizada de acordo com o descrito previamente (Toth, Sohail et al. 2012). Para isso, meio condicionado

(sem FBS) proveniente da incubação de 48 horas de 4T1, 4T1m e 4T1t, foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com gelatina 0,2% (*gelatin from porcine skin* G1890, Sigma-Aldrich). A digestão enzimática foi realizada por incubação com buffer zimográfico (25mM Tris, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, 0,2% Brij-35, pH 7,5) por 48 horas a 37°C. Os géis foram então corados com 0,2% *Coomassie brilliant blue*R-250 (Serva electrophoresis GmbH) seguindo as recomendações do fabricante. As bandas de digestão foram evidenciadas em transiluminador e fotografadas para comparação com o padrão de peso molecular e identificação das prováveis MMPs ativas.

3.3.8 Citometria de fluxo e *Sorting*

A quantificação da expressão de Qa-2 e da população celular CD44^{high}/CD24^{med/low}, foi realizada por citometria de fluxo em FACS Canto II com FACSDiva *Software* (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) ou em Cytomics FC 500 MPL com MXP *Software* (Beckman Coulter). As células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e incubadas em 200µL de anticorpo primário correspondente: anti-Qa-2 FITC (1:50, clone: 69H1-9-9, eBioscience), anti-CD44 FITC (1:100, clone: KM-201, Molecular Probes) e anti-CD24 (1:100, clone: M1/69, Miltenyi Biotec) por 30 minutos a 4°C. Após as lavagens, as células foram então submetidas a citometria.

Para a avaliação da positividade para Qa-2, o isotipo IgG2 kappa foi utilizado como controle. Como controle positivo, esplenócitos foram extraídos do baço de um animal C57BL/6 para obtenção de uma suspensão (Wang et al., 2014). Os parâmetros utilizados para a seleção da população CD44^{high}CD24^{med/low}, foram, para CD44 possuir intensidade de fluorescência maior que 50, e para CD24 possuir intensidade de fluorescência menor que 50.

O mesmo procedimento foi realizado para o isolamento (*sorting*) destas populações celulares quando necessário. No entanto, o equipamento utilizado para este fim foi FACSVantage SE sorter (BD Biosciences).

3.3.9 Quantificação relativa da expressão gênica

A quantificação relativa da expressão de Qa-2 e de fatores de pluripotência celular foi feita através da reação em cadeia de polimerase. O RNA total proveniente das linhagens celulares analisadas foi extraído com *RNeasy Kit* (Qiagen), e convertidos em cDNA por transcrição reversa usando *high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). A expressão relativa de Qa-2 foi determinada utilizando-se ensaio TaqMan® (Mm00843895_s1) e como controle interno a beta-actina (ACTB - Mm00843895_s1). A expressão relativa dos fatores de pluripotência celular foi realizada utilizando-se o kit Power SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher) com os primers específicos descritos na Tabela 6, os quais foram gentilmente cedidos e desenhados pelo professor Bruno Sainz Anding Jr. (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Espanha). As reações foram realizadas no 7900HT *Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems), e a quantificação realizada pelo método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), depois de serem normalizadas pelo respectivo controle interno da reação.

Tabela 6 - Primers usados na quantificação relativa da expressão dos fatores de transcrição pelo ensaio SYBR® GREEN

Iniciadores	Sequência (5'– 3')	Amplicon (pb)
mu_Zeb1 <i>foward</i>	GAGCCGCCAGTGAAGGTGATC	234
mu_Zeb1 <i>reverse</i>	GTGAGGCCTCTTACCTGTGTGCT	
mu_Sox2 <i>foward</i>	TAGAGATAGACTCCGGGCGATGA	297
mu_Sox2 <i>reverse</i>	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA	
mu_Hes1 <i>forward</i>	TGCCAGCTGATATAATGGAGAA	126
mu_Hes1 <i>reverse</i>	CCATGATAGGCTTTGATGACTTT	
mu_Oct3/4 <i>forward</i>	TCTTTCCACCAGGCCCGGCTC	224
mu_Oct3/4 <i>reverse</i>	TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC	
mu_HPRT <i>forward</i>	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	90
mu_HPRT <i>reverse</i>	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	

3.3.10 PCR convencional

A PCR convencional foi realizada utilizando-se iniciadores específicos descritos na Tabela 7. Os reagentes para a PCR foram constituídos de 0,4 mM de cada dNTP, 0,5µM de cada primer, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 1µL de cDNA alvo. As condições do ciclo utilizadas foram, 94°C por 5 minutos para a desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto de desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 1 minuto de extensão, seguidos da extensão final de 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com Syber Safe (ThermoFisher) e visualizados em PhotoDoc-It 55 + transiluminador LM26E (Cultek).

Tabela 7 - Primers usados na PCR convencional

Iniciadores	Sequência (5'– 3')	Amplicon (pb)
H2-Q9 – <i>Foward</i>	GCGGAAAATCCGAGGATGGA	763
H2-Q9 – <i>Reverse</i>	CCACAACAGCAATGGTCGC	
ACTB – <i>Foward</i>	ACCTGACAGACTACCTCATGAA	570
ACTB – <i>Reverse</i>	ACTTGCGGTGCACGATGGAGG	

3.3.11 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ d. p. m (desvio padrão da média). Todos os dados analisados foram submetidos ao teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* e ao teste de *Grubbs* para verificação de *outliers*. A comparação entre dois grupos foi realizada através do teste *t* de *Student* para dados não paramétricos ou pelo teste de *Mann-Whitney*. As correlações entre variáveis foram avaliadas através do teste de *Spearman* ou *Pearson* de acordo com a natureza dos dados. Os resultados serão considerados significativos para $p < 0,05$. O programa utilizado para as análises foi o GraphPad InStat 5.0. Em todos os gráficos a presença de *, **, *** indica diferença entre os grupos em $p < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectivamente.



CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados sob a forma de dois artigos científicos elaborados (publicado e aceito para publicação – Anexo B) durante o período de doutoramento. Resultados complementares podem ser encontrados nos Apêndices A-E.



ARTIGO 1

QA-2 EXPRESSION LEVELS IS RELATED WITH TUMOR- INFILTRATING LYMPHOCYTE PROFILE DURING SOLID EHRlich TUMOR DEVELOPMENT

**REVISTA: BIOMEDICINE AND PHARMACOTHERAPY
ARTIGO PUBLICADO**



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Original article

Qa-2 expression levels is related with tumor-infiltrating lymphocytes profile during solid Ehrlich tumor development



Istéfani Luciene da Silva^a, Emerson Soares Veloso^a, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves^a,
 Ariadne Duarte Braga^b, Miriam Teresa Paz Lopes^b, Geovanni Dantas Cassali^a,
 Miguel Quintanilla^c, Renata Toscano Simões^d, Enio Ferreira^{a,*}

^a Department of General Pathology, Laboratory of Comparative Pathology, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, 486, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Pharmacology, Laboratory of Antitumor Substances, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, 486, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Departament of Cancer Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, 4, 28029, Madrid, Spain

^d Institute of Education and Research of Santa Casa of Belo Horizonte, 590, 30150-240, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2017

Received in revised form 15 May 2017

Accepted 28 May 2017

Keywords:

Solid Ehrlich tumor
 Histopathology
 Immunohistochemistry
 Breast cancer
 Tumor immunology
 Mice

ABSTRACT

The Qa-2 has been described as Human Leucocyte Antigen G (HLA-G) murine homolog. This homology is well accepted to gene and protein structure, in different pathology process and embryos implantation. However, in some neoplasm, this homology is questioned, where Qa-2 has been proposed as an immunogenic molecule, associated to tumor rejection. In this way, the aim of this study was to describe the pattern of Qa-2 expression and its relationship with the profile of tumor-infiltrating lymphocytes in solid Ehrlich tumor. The Ehrlich tumor growth was evaluated in Balb/c female mice in different tumor stages. The inflammatory infiltration features were determined by histopathology and, both lymphocyte type and tissue Qa-2 expression by immunohistochemistry. ELISA kit was used to determine soluble Qa-2 in the serum from the animals. We observed that Qa-2 in neoplastic cells increases in intermediate tumor development stages, while, serum Qa-2 increases in the late stage. Qa-2 increasing is correlated with CD3⁺ increase. Our results suggest that Qa-2 has a role opposite to HLA-G in Ehrlich solid carcinoma, and may be modulating the immune response by attracting the inflammatory infiltrate, especially T CD8⁺ lymphocytes.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer is the most common cancer among women in developing countries [1,2]. This is responsible for many deaths worldwide [3]. Treatment consists of surgery, radiotherapy, and chemotherapy. However, patient particularities can make treatment difficult. Many studies have showed that host's cellular immune response plays a pivotal role in controlling tumor development [4–6].

The neoplastic transformation leads to changes in tissue architecture and promotes the activation of the immune response to eliminate the tumor. However, transformed cells escapes from

this response. This process is known as cancer immunoediting and it has been related to prevention and promotion of several cancer types [7,8].

Breast cancer is an immunogenic tumor and the presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in this has been proposed as prognostic and predictive biomarkers [9]. Different studies have described that high number of TILs is associated with better survival and therapy response [10–12]. On the other hand, the expression of immune modulating molecules like Human Leucocyte Antigen G (HLA-G) is associated with immune evasion and poor prognosis [13]. This HLA-G-mediated immune evasion has been associated with immune cell inhibition directly through inhibitory receptors engagement, and indirectly through suppressor/regulatory cells induction or by trogocytosis [14]. However, a few number of models are available to *in vivo* studies. Many models limit the full understanding of the mechanisms involved, like

* Corresponding author.

E-mail address: enioferreira@icb.ufmg.br (E. Ferreira).

xenografts models, and hind the realization of functionally studies [15].

Qa-2 has been proposed as a murine HLA-G homolog in gene structure, protein conformation and functionality [16–18], though its function during tumor development remains unclear, where sometimes is described as homolog in function [19], and sometimes with different functions [20]. Moreover, loss of Qa-2 expression is described during tumor development in melanoma, lymphoma, rectal cancer, and others [21].

A direct relationship between Qa-2 and immune cells has been described, since, Qa-2 is a maturation marker in T lymphocytes [22] and B lymphocytes [23]. Moreover, Qa-2 can activate T lymphocytes [24–26], NK cells [19] and CD8+ lymphocytes [20]. Nevertheless, Qa-2 has another role in the immune system and it is able to present antigen [27], which may influence the tumor to present more immunogenic.

Solid Ehrlich tumor is one of the commonest transplantable breast cancer models. Some advantages of this cancer model are fast growth in an immune-competent host, low cost, and easy monitoring [28]. These characteristics make solid Ehrlich carcinoma a good model to study the involvement of Qa-2 in breast cancer immunosurveillance. Thus, the aim of this study was to describe the pattern of Qa-2 expression and its relationship with the profile of tumor-infiltrating T lymphocytes during Ehrlich tumor development. This work is the first to describe the expression of Qa-2 in a syngeneic breast cancer model and provides information to clear up the Qa-2 role in cancer immunosurveillance.

2. Material and methods

2.1. Animals and groups

Female Balb/c mice (6 weeks, 20 ± 4 g weight) were provided by the Institute of Biological Science of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The animals were housed under standard conditions (24 °C temperature and 12 h light/12 h dark cycles) and allowed to acclimatize for 1 week before starting the experiments. The ethical committees of local Institutional Animal Welfare Committee approved the study, under protocol number 350/2012, and, all experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

The animals were divided into two groups: Ehrlich (EHR; $n = 26$) and Control (CTRL; $n = 26$). Animals were euthanized on three different days after tumor injection: 2 (EHR-2 days and CTRL-2 days), 7 (EHR-7 days and CTRL-7 days) and 14 (EHR-14 days and CTRL-14 days).

2.2. Cells

The Ehrlich tumor was grown as ascites in mice. For the experimental procedures, 3 mL of ascitic fluid from mice, inoculated 12 days before, was collected and centrifuged (3 min, $200 \times g$). The supernatant was removed and Ehrlich tumor cells were washed three times with saline. Viability was determined by the Trypan blue dye exclusion test and counted in a modified Neubauer chamber ($>90\%$) to post injection.

2.3. Experimental protocol

Animals of the Ehrlich group were inoculated with 2.5×10^6 Ehrlich tumor cells (in a final volume of 50 μ L) in the left footpad and Control group was inoculated with saline (50 μ L) in the same field and underwent through the same procedures.

Weights of animals and tumor sizes were determined periodically. To assess the Ehrlich tumor growth curve, measurements were performed using a micrometer (Mitutoyo, measurement 0.01 mm, series n. 7301) immediately before and every two days after tumor injection, with a total of eight measurements [29].

After the animals had been euthanized, necropsy was performed by removing the tumor, lymph nodes, heart, liver, brain, spleen and lungs from all animals for histopathological and immunohistochemistry analysis of Qa-2. Blood samples from all animals were also collected for quantification of seric Qa-2 expression.

2.4. Histopathology

Histologic tumor sections and lymph-nodes stained with hematoxylin and eosin (H&E) were used to evaluate metastases and classify peritumoral inflammatory infiltrate. Tissues were fixed in formalin (10% w/v in phosphate-buffered saline – PBS pH 7.4). The peritumoral inflammatory evaluation was performed considering three factors: distribution (focal or diffuse), intensity (light, moderate or heavy), and profile (mononuclear, polymorphonuclear or mixed – mononuclear and polymorphonuclear). Even, intratumorally inflammatory infiltrate was evaluated to intensity (light, moderate or heavy).

2.5. Immunohistochemistry

A peroxidase system used in the immunohistochemistry procedure was used to identify the secondary antibody by the polymer (ADVANCE HRP). Antigen retrieval was performed by water bath at 98 °C, with a citrate buffer solution (pH 6.0) (Target Retrieval Solution) for 20 min. To block the endogenous peroxidase activity, slides were incubated with a solution of H_2O_2 3% in methyl alcohol. Reagents were applied manually, consisting of 1-h incubation for the primary antibody and 30 min for the reagents, except for the chromogen diaminobenzidine, incubated for 1 min. Positive and negative controls were included in each bath. The antibodies used consisted of: Anti-Qa-2 (clone 69H1-9-9; eBioscience, dilution 1:100); Anti-CD4 (clone GK1.5; eBioscience, dilution 1:100), Anti-CD8 (clone 4SM15, eBioscience, dilution 1:100), Anti-CD3 (clone CD3-12; UC-Davis, dilution: 1:500) and Anti-Foxp3+ (clone sc-53876, Santa Cruz Biotechnologies, dilution 1:600).

The expression of Qa-2 was analyzed separately in inflammatory cells and neoplastic cells. The index for Qa-2 staining in inflammatory peritumoral cells was obtained by the mean of positive cells in 15 fields ($60\times$). Tumor cells Qa-2 staining was classified in: +1 when it was up to 10% of cells staining; +2 when 11–25% of cells stained, and +3 when more than 25% of cells stained, according to the adaptation from Dong et al., 2010 [30].

2.6. ELISA

To evaluate the seric Qa-2 expression after collection, the samples were centrifuged for 5 min at 3000 rpm and the serum aliquoted and stored in a plastic Eppendorf tube.

A specific ELISA kit was used for the Qa-2 determination (*Qa lymphocyte antigen 2 region, Qa-2, Qa-2 Elisa Kit – MyBiosource.com*). All the manufacturer's recommendations were followed. The reactions were read as optical densities (ODs) on an automated ELISA plate reader. Soluble Qa-2 concentrations (U/mL) in the samples were calculated using the calibration curve constructed by plotting the ODs against concentrations of calibrators provided by the manufacturer.

2.7. Statistical analysis

Results are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. The outliers were identified using the Grubbs' test by outlier calculator on GraphPad QuickCalcs online. Comparisons were carried out using Student's *t*-test and ANOVA with Bartlett's test and Bonferroni's Multiple Comparison Test for comparing groups, test Kruskal–Wallis with Dunn's test to unpaired data, Cochran Q test to compare groups with dichotomous variables, and Spearman's correlation. A *P*-value less than 0.05 was considered significant. The statistical programs used to analyze the data were GraphPad InStat version 5.0 and BioStat Professional version 5.8.4.

3. Results

3.1. Tumor behavior and histopathology evaluation

Upon transplantation of Ehrlich carcinoma cells into the footpad of Balb/c mice, a significant progressive increase of tumor size and weight gain was observed (Fig. 1A–C). Statistical differences in the size of tumors were observed between different post-injection times, indicating a rapid growth of tumors (Fig. 1B). This resulted in a significant difference in the weight of the animals between 2 and 14 days post-injection (Fig. 1C). Complete data is available in Supporting information Table 1s.

Histologically, tumors were located deep in the dermis invading the musculature, and sheets of small, higher chromatophilic tumor cells of variable shapes representing cell proliferation were observed surrounding areas of necrosis and differentiated cells (Fig. 2A). Metastasis was observed only in regional lymph nodes at 14 days post-injection ($n=4/9$; 44% – Fig. 2B).

The peritumor inflammatory infiltrate was diffuse at all post-injection times, mainly composed of polymorphonuclear and mononuclear leukocytes. The intensity of peritumor inflammatory infiltrate was predominantly moderate, with a significant difference between 2 and 7 days post-injection ($P=0.01$). Intense inflammation was not observed (Fig. 3A and B). A positive correlation was observed between the animal weight and the

intensity of peritumor inflammatory infiltrate ($r=0.4032$; $P=0.04$).

The intratumorally infiltrate was rather weak with a significant difference between 2 and 7 days post-injection ($P=0.02$) (Fig. 3C; complete data is available on supporting Table 2s). A positive correlation was observed between tumor size and intensity of intratumorally inflammatory infiltrate ($r=0.4340$, $P=0.03$).

3.2. Lymphocyte infiltrate profile

Immunohistochemistry to discriminate the types of lymphocytes infiltrating the tumors showed cytoplasmic staining for CD3+, CD4+, CD8+ and Foxp3+ surface markers (Fig. 4A–D). Quantification showed a progressive increase of pan T lymphocytes marker, CD3+ with tumor development. In contrast, CD4+ lymphocytes decreased in a similar rate. Differences were statically significant for CD3+ lymphocytes between 2 and 14 days post-injection ($P=0.02$), and for CD4+ lymphocytes between 2 and 14 days post-injection ($P=0.04$) (Fig. 5A and B). The presence of CD3+ lymphocyte was positively correlated with tumor size ($r=0.4601$; $P=0.03$), while the profile of CD4+ lymphocytes showed a negative correlation ($r=-0.5967$; $P=0.003$). An inverse profile was observed between CD8+ and Foxp3+ lymphocytes, with CD8+ lymphocytes decreasing and Foxp3+ lymphocytes increasing at day 7 (Fig. 5C, D and Table 3s).

3.3. Qa-2 levels in neoplastic cells, peritumor inflammatory cells, and serum

Qa-2 expression in neoplastic cells was always focal, often seen at the invasive front, and accounting for no more than 25% of tumor cells (Fig. 6A). Qa-2 expression increased on day 7 with respect to day 2 post-injection and was reduced at day 14 (Fig. 6B), with a significant difference when comparing 2 and 7 days post-injection ($P=0.006$) (See supporting Table 4s). Positive correlation was observed between Qa-2 expression in neoplastic cells and the presence of CD3+ lymphocytes ($r=0.5282$; $P=0.02$).

Qa-2 expression in inflammatory cells from peritumor inflammatory infiltrate increased on day 7 with respect to days 2 and 14

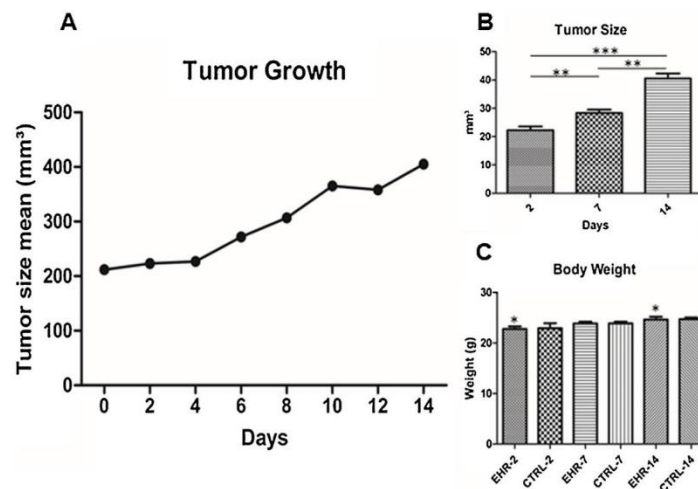


Fig. 1. Tumor behavior. (A) Growth curve obtained from tumor measures every 48 h at the day of tumor injection until euthanasia day. (B) Tumor size obtained from final measures of tumor, showing statistical difference between 2 and 7 (** $P<0.01$), 2 and 14 (** $P<0.001$) and, 7 and 14 (** $P<0.01$) days post-injection. (C) Mean final body weight from Ehrlich (EHR) and control (CTRL – tumor free) group divided by post-injection days, showing difference in the animals from EHR, between 2 and 14 days post-injection (* $P<0.05$).

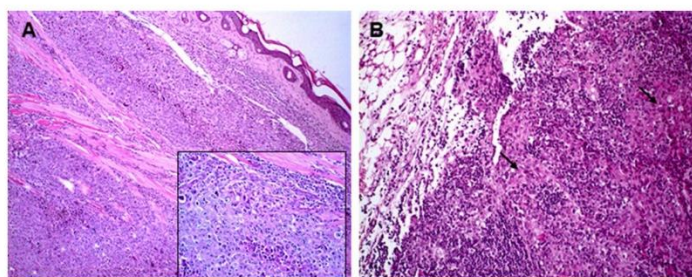


Fig. 2. Tumor histopathologic evaluation. (A) Ehrlich tumor section from female Balb/c on day 14 post-injection, in Hematoxylin and Eosin staining, magnification 100 $\times$, showing tumors located deep in the dermis invading the musculature and sheets of small (inset), higher chromophilic tumor cells of variable shapes representing cell proliferation, surrounding areas of necrosis and differentiated cells. (B) Lymph-node section from female Balb/c on day 14 post-injection, in Hematoxylin and Eosin staining, magnification 200 $\times$, presenting adipose tissue surrounding lymph-node capsule and metastasis areas (arrows) on the lymph-node parenchyma.

post-injection; however, these differences were not statistically significant (Fig. 6C). The serum levels of soluble Qa-2 increased progressively during tumor growth. The enhancement observed in the sera of animals bearing tumors at day 14 post-injection with respect to control (tumor-free) animals was statistically significant ($P=0.003$) (Fig. 6D and supporting Table 5s). Other correlations were not observed.

4. Discussion

Innate and adaptive immune responses protect the host against the development of cancer. Furthermore, tumor cells can evade immunosurveillance through many mechanisms, such as HLA-G expression [31]. Qa-2 has been proposed as HLA-G homolog in embryos implantation [16,18] and autoimmune disease [17]. However, its role in cancer models remains unclear. Sometimes

it is described as a functional homolog [19], and other times as opposite of it [20].

We described for the first time the profile of Qa-2 expression in a breast cancer model. In addition, we characterized the Qa-2 relationship with tumor lymphocytes infiltrate profile. Our results demonstrate a moderate inflammatory intensity in initial tumor development stage, both intratumorally and peritumor. Interestingly, this correlate positively with an increase of Qa-2 expression in neoplastic cells, suggesting that Qa-2 may be acting as antigen-presenting molecule [27], indirectly recruiting inflammatory cells to the tumor site.

On the other hand, the small increase of seric Qa-2 levels in late tumor development stage is associated with size tumor increase and inflammatory intensity reduction, suggesting that, in this stage, started the loss of Qa-2 expression because the tumor reached its last stage of development. In these stages, the tumor has loss of several surface proteins, becoming less immunogenic

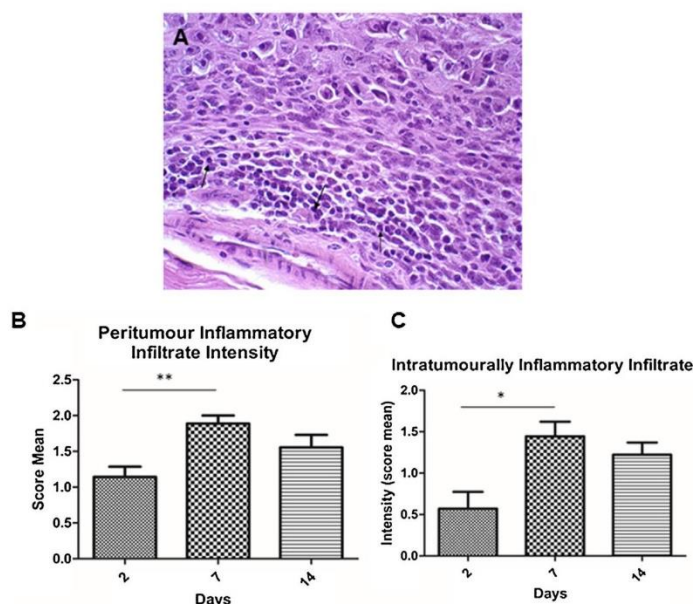


Fig. 3. Peritumor infiltrate inflammatory histopathologic evaluation. (A) Ehrlich tumor section from female Balb/c on day 7 post-injection, in Hematoxylin and Eosin staining, magnification 600 $\times$, showing peritumor inflammation area (arrows). (B) Score mean of peritumor inflammatory infiltrate intensity showed difference between 2 and 7 days post-injection (** $P<0.01$). The score was considered 1 when to weak, 2 to moderate and 3 to heavy intensity. (C) Score mean of intratumorally inflammatory infiltrate intensity, showed difference between 2 and 7 days post-injection (* $P<0.05$). The score was considered 1 when to weak, 2 to moderate and 3 to heavy intensity.

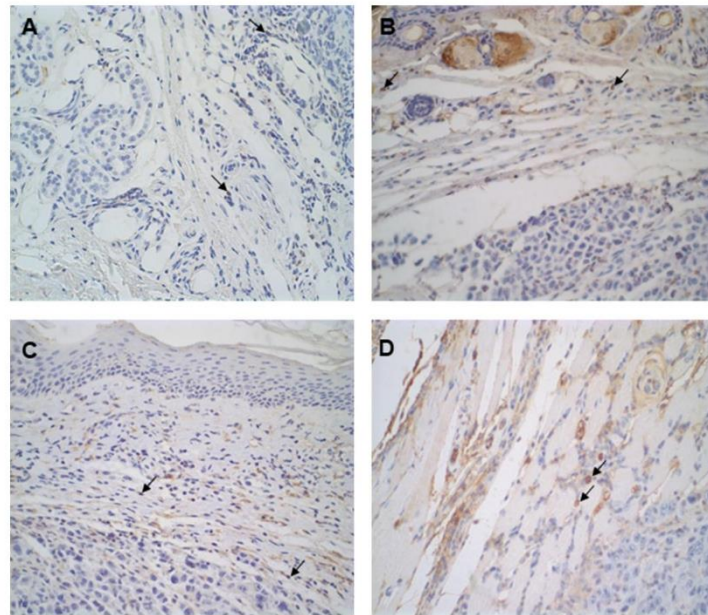


Fig. 4. Peritumor lymphocyte infiltrate profile. Ehrlich tumor sections from female Balb/c in Immunohistochemical reaction to CD3+ (A), CD4+ (B), CD8+ (C) and Foxp3+ (D), revealed at DAB, magnification 400 $\times$, membrane and cytoplasmic immunolabeling in inflammatory peritumor cells (arrows).

[32]. These findings corroborate with the described to Qa-2 in several tumors, when, the tumor progression leads to the Qa-2 loss [21]. Furthermore, soluble Qa-2 may have a late expression or detectable increase levels in the late tumor development stage. It is

possible by transmembrane Qa-2 loss or by proteolytic shedding [33], where the transmembrane isoform can be cut by metalloproteinases (MMPs) and generate soluble isoform detectable in the serum [34]. Therefore, we hypothesize that tumor maybe has

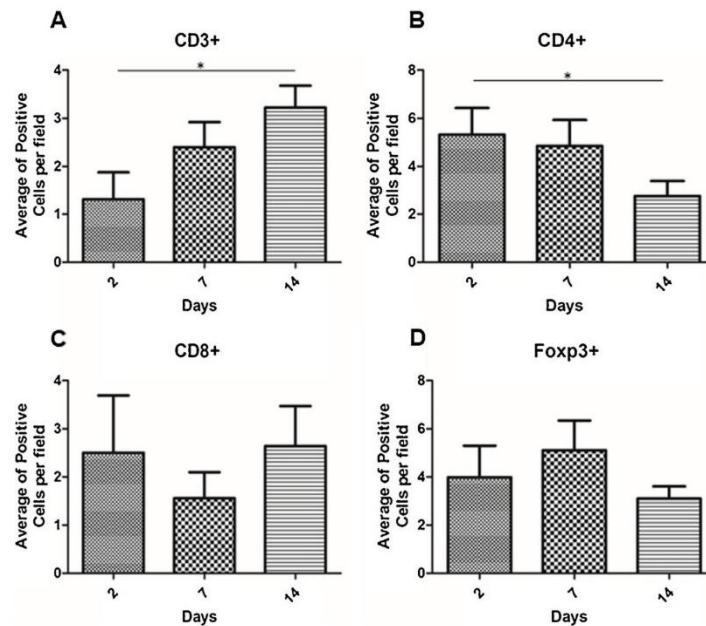


Fig. 5. Peritumor lymphocyte infiltrate profile relative quantification. (A) Average of CD3+ positive cells per field, showing difference between 2 and 7 days post-injection (* $P < 0.05$). (B) Average of CD4+ positive cells per field, showing difference between 2 and 7 days post-injection ($P < 0.05$). (C) Average of CD8+ positive cells per field. (D) Average of Foxp3+ positive cells per field. For all markers, a total of 15 fields (60 $\times$) were analyzed.

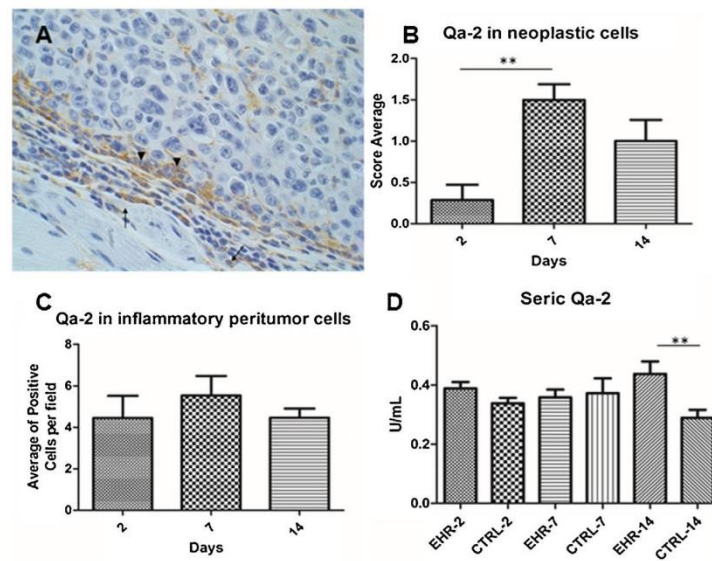


Fig. 6. Qa-2 expression levels. (A) Ehrlich tumor section from female Balb/c on day 7 post-injection in immunohistochemical reaction for Qa-2 protein, revealed at DAB, magnification 600 $\times$, membrane and cytoplasmic immunolabeling in tumors cells (arrows heads) and inflammatory peritumor cells (arrows). (B) Score average of Qa-2 expression in neoplastic cells, showing difference between 2 and 7 days post-injection (** $P < 0.01$). Tumor cell Qa-2 staining was classified in: +1 when up to 10% of cells staining; +2 when 11–25% of cells staining, and +3 when more than 25% of cells stained. (C) Average of positive cells per field in inflammatory peritumor cells. A total of 15 fields (60 $\times$) were analyzed. (D) Serum levels of Qa-2 in Ehrlich (EHR) and control (CTRL – tumor free) group, showing difference between EHR and CTRL on day 14 post-injection (** $P < 0.01$).

changed the Qa-2 expression profile to soluble or had loss of Qa-2 expression being the transmembrane Qa-2 remaining cut by MMPs.

Inflammation plays a double role in tumor development and may be considered as a good or bad prognosis [7,8,35]. Our results represent this double role when the pan T lymphocyte marker CD3+ was correlated with tumor size increase and CD4+ with tumor size decrease. However, this correlation represents the change of the inflammatory response from auxiliary to other ways, like as cytotoxic or regulatory, and not exactly an inverse proportional magnitude. Furthermore, Qa-2 expression in neoplastic cells was positively correlated with CD3+ increasing. Has been described that Qa-2 is maturation marker of T lymphocytes [23], explaining this positive correlation. Besides that, these findings may reinforce the fact that Qa-2 positively correlate with lymphocyte infiltration, maybe by antigen presentation, recruiting inflammatory cells to the tumor site.

In the intermediate stage of tumor development (7th-day post-injection) several immune changes occurred. The initial indeterminate immune response, that, before had all the types of immune cells studied, at this stage, had a reduction of CD8+ with an increase of Foxp3+ markers, indicating that, an attempt to modulate the immune response occurred. Curiously, these findings occur in parallel to transmembrane Qa-2 increase (neoplastic and peritumor expression), indicating that in this stage, Qa-2 is more required to induce effective tumor immune response. In the last tumor development stage, we observed the inflammation reduction, associated with Foxp3+ decrease and CD8+ increase, suggesting that immune response against the tumor is completely created. Since Qa-2 is no longer needed, and the tumor changes the surface protein profile, loss of Qa-2 occur.

The evaluation of Qa-2 receptor presence on inflammatory cells could be useful to elucidate the Qa-2 role in immune modulation, however, Qa-2 does not have a known receptor [19,20], limiting the complete comprehension about its immune modulatory activity.

5. Conclusion

Our results suggest that, in Ehrlich solid carcinoma, Qa-2 has a different behavior from that described to HLA-G, maybe by its immune modulation capacity, attracting the inflammatory infiltrate, especially T CD8+ Lymphocytes. Moreover, solid Ehrlich tumor model can assist in the understanding the role of Qa-2 function in breast cancer rejection and support information to futures studies of experimental tumor immune response.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This paper was supported by a grant from CAPES Foundation (Higher Level Personnel Improvement Commission), with an International Scholarship Procs. Nr. 99999.009972/2014-05. Other grants were also provided by CNPq (Brazilian National Research and Development Council) and FAPEMIG (Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi: [10.1016/j.biopha.2017.05.135](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.135).

References

- [1] L. Delort, A. Rossary, M.C. Farges, M.P. Vasson, F. Caldefie-Chezet, Leptin, adipocytes and breast cancer: focus on inflammation and anti-tumor immunity, *Life Sci.* 140 (2015) 37–48.
- [2] C.C. Engels, A. Charehbili, C.J. van de Velde, E. Bastiaannet, A. Sajet, H. Putter, E. A. van Vliet, R.L. van Vlierberghe, V.T. Smit, J.M. Bartlett, C. Seynaeve, G.J.

- Liefers, P.J., Kuppen, The prognostic and predictive value of Tregs and tumor immune subtypes in postmenopausal, hormone receptor-positive breast cancer patients treated with adjuvant endocrine therapy: a Dutch TEAM study analysis, *Breast Cancer Res. Treat.* 149 (3) (2015) 587–596.
- [3] T. Romo-Gonzalez, M. Esquivel-Velazquez, P. Ostoa-Saloma, C. Lara, A. Zentella, R. Leon-Diaz, E. Lamoyi, C. Larralde, The network of antigen-antibody reactions in adult women with breast cancer or benign breast pathology or without breast pathology, *PLoS One* 10 (3) (2015) e0119014.
- [4] S. Agaoglu, E.D. Carosella, N. Rouas-Freiss, Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokine balance in favor of Th2 versus Th1/Th17, *Blood* 117 (26) (2011) 7021–7031.
- [5] R. Matkowski, I. Gisterek, A. Halon, A. Lacko, K. Szewczyk, U. Staszek, M. Pudelko, B. Szynglarewicz, J. Szelachowska, A. Zolnierak, J. Kornafel, The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer, *Anticancer Res.* 29 (7) (2009) 2445–2451.
- [6] E. Sato, S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnajatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old, K. Odunsi, Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (51) (2005) 18538–18543.
- [7] M.M. Mittal, R.D. Schreiber, M.J. Smyth, New insights into cancer immunoevasion and its three component phases—elimination, equilibrium and escape, *Curr. Opin. Immunol.* 27 (2014) 16–25.
- [8] S. Dushyanthen, P.A. Beavis, P. Savas, Z.L. Teo, C. Zhou, M. Mansour, P.K. Darcy, S. Loi, Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer, *BMC Med.* 13 (2015) 202.
- [9] R. Wesolowski, W.E. Carson 3rd, Tumor infiltrating lymphocytes – the next step in assessing outcome and response to treatment in patients with breast cancer, *J. Carcinog. Mutagen.* 5 (6) (2014).
- [10] A. Gimino-Mathews, J.B. Foote, L.A. Emens, Immune targeting in breast cancer, *Oncology (Williston Park)* 29 (5) (2015) 375–385.
- [11] N.M. Tung, E.P. Winer, Tumor-infiltrating lymphocytes and response to platinum in triple-negative breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 33 (9) (2015) 969–971.
- [12] Y. Mao, Q. Qu, Y. Zhang, J. Liu, X. Chen, K. Shen, The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis, *PLoS One* 9 (12) (2014) e115103.
- [13] G. Curigliano, C. Criscitiello, L. Gelao, A. Goldhirsch, Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G), *Clin. Cancer Res.* 19 (20) (2013) 5564–5571.
- [14] E.D. Carosella, N. Rouas-Freiss, D. Tronik-Le Roux, P. Moreau, J. LeMaout, HLA-G: an immune checkpoint molecule, *Adv. Immunol.* 127 (2015) 33–144.
- [15] A. Richmond, Y. Su, Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics, *Dis. Models Mech.* 1 (2–3) (2008) 78–82.
- [16] W. Cao, C.A. Brenner, M. Alikani, J. Cohen, C.M. Warner, Search for a human homologue of the mouse Ped gene, *Mol. Hum. Reprod.* 5 (6) (1999) 541–547.
- [17] M. Lee, B. Choi, H.J. Kwon, J.A. Shim, K.S. Park, E.S. Lee, S. Sohn, The role of Qa-2, the functional homolog of HLA-G, in a Behcet's disease-like mouse model induced by the herpes virus simplex, *J. Inflamm. (Lond.)* 7 (2010) 31.
- [18] M. Comiskey, C.Y. Goldstein, S.R. De Fazio, M. Mammolenti, J.A. Newmark, C.M. Warner, Evidence that HLA-G is the functional homolog of mouse Qa-2, the Ped gene product, *Hum. Immunol.* 64 (11) (2003) 999–1004.
- [19] E.Y. Chiang, M. Henson, I. Stroynowski, The nonclassical major histocompatibility complex molecule Qa-2 protects tumor cells from NK cell- and lymphokine-activated killer cell-mediated cytotoxicity, *J. Immunol.* 168 (5) (2002) 2200–2211.
- [20] E.Y. Chiang, I. Stroynowski, A nonclassical MHC class I molecule restricts CTL-mediated rejection of a syngeneic melanoma tumor, *J. Immunol.* 173 (7) (2004) 4394–4401.
- [21] T. Ungchusri, E.Y. Chiang, G. Brown, M. Chen, P. Tabaczewski, L. Timares, I. Stroynowski, Widespread expression of the nonclassical class I Qa-2 antigens in hemopoietic and nonhemopoietic cells, *Immunogenetics* 53 (6) (2001) 455–467.
- [22] J. Li, H.D. Li, Y. Zhang, J. Zhang, Qa-2 associated lipid rafts are indispensable in the final maturation of CD4(+)CD8(–) thymocytes, *Immunol. Lett.* 148 (2) (2012) 163–171.
- [23] P.M. Hogarth, A. Basten, H. Prichard-Briscoe, M.H. Henning, V.R. Sutton, I.F. McKenzie, The distribution of the Qa-2 alloantigen on functional T lymphocytes, *J. Immunol.* 135 (3) (1985) 1632–1636.
- [24] S.R. De Fazio, C.M. Warner, Activation of T cells by cross-linking Qa-2, the ped gene product, requires Fyn, *Am. J. Reprod. Immunol.* 58 (4) (2007) 315–324.
- [25] A.B. Hahn, M.J. Soloski, Anti-Qa-2-induced T cell activation. The parameters of activation, the definition of mitogenic and nonmitogenic antibodies, and the differential effects on CD4+ vs CD8+ T cells, *J. Immunol.* 143 (2) (1989) 407–413.
- [26] R.G. Cook, B. Leone, J.W. Leone, S.M. Widacki, P.J. Zavell, Characterization of T cell proliferative responses induced by anti-Qa-2 monoclonal antibodies, *Cell. Immunol.* 144 (2) (1992) 367–381.
- [27] X. He, P. Tabaczewski, J. Ho, I. Stroynowski, K.C. Garcia, Promiscuous antigen presentation by the nonclassical MHC Ib Qa-2 is enabled by a shallow, hydrophobic groove and self-stabilized peptide conformation, *Structure* 9 (12) (2001) 1213–1224.
- [28] A.M. Kabel, M.S. Omar, M.F. Balaha, H.M. Borg, Effect of metformin and adriamycin on transplantable tumor model, *Tissue Cell* 47 (5) (2015) 498–505.
- [29] E. Ferreira, A.E. da Silva, R. Serakides, M.G. Gomes, G.D. Cassali, Ehrlich tumor as model to study artificial hyperthyroidism influence on breast cancer, *Pathol. Res. Pract.* 203 (1) (2007) 39–44.
- [30] D.D. Dong, H. Yang, K. Li, G. Xu, L.H. Song, X.L. Fan, X.L. Jiang, S.M. Yie, Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in cervical lesions: association with cancer progression, HPV 16/18 infection, and host immune response, *Reprod. Sci.* 17 (8) (2010) 718–723.
- [31] L. Loumagne, J. Baudhuin, B. Favier, F. Montespan, E.D. Carosella, N. Rouas-Freiss, In vivo evidence that secretion of HLA-G by immunogenic tumor cells allows their evasion from immunosurveillance, *Int. J. Cancer* 135 (9) (2014) 2107–2117.
- [32] Y. Liu, D.C. Dean, Tumor initiation via loss of cell contact inhibition versus Ras mutation: do all roads lead to EMT? *ABV Cell Cycle* 9 (5) (2010) 897–900.
- [33] G.M. Park, S. Lee, B. Park, E. Kim, J. Shin, K. Cho, K. Ahn, Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (3) (2004) 606–611.
- [34] R. Rizzo, A. Trentini, D. Bortolotti, M.C. Manfrinato, A. Rotola, M. Castellazzi, L. Melchiorri, D. Di Luca, F. Dallochio, E. Fainardi, T. Bellini, Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) generates soluble HLA-G1 by cell surface proteolytic shedding, *Mol. Cell. Biochem.* 381 (1–2) (2013) 243–255.
- [35] E.A. Marshall, K.W. Ng, S.H. Kung, E.M. Conway, V.D. Martinez, E.C. Halvorsen, D.A. Rowbotham, E.A. Vucic, A.W. Plumb, D.D. Becker-Santos, K.S. Enfield, J.Y. Kennett, K.L. Bennenwith, W.W. Lockwood, S. Lam, J.C. English, N. Abraham, W.L. Lam, Emerging roles of T helper 17 and regulatory T cells in lung cancer progression and metastasis, *Mol. Cancer* 15 (1) (2016) 67.

Supporting Information

Table 1s – Mean with standard error of mean of weight animals and tumor size in animals with solid Ehrlich tumor

	Ehrlich group			Control group		
	2 [#] days (Mean ± SEM)	7 [#] days (Mean ± SEM)	14 [#] days (Mean ± SEM)	2 [#] days (Mean ± SEM)	7 [#] days (Mean ± SEM)	14 [#] days (Mean ± SEM)
Animals Weight (g)	22.75 ± 0.5395 ^a	23.86 ± 0.3333	24.64 ± 0.5321 ^a	22.92 ± 0.8610	23.87 ± 0.3483	24.71 ± 0.3302
Tumor size (mm)	22.2 ± 1.373 ^{b,c}	28.3 ± 1.190 ^{b,d}	40.5 ± 1.757 ^{c,d}	NA	NA	NA

Ehrlich group was obtained by injection of Ehrlich cells in the Balb/c footpad. Control group was obtained by saline injection in the same site. Statistical analyze showed differences for Animals Weight in animals with Ehrlich tumor, between 2 and 14 days post-injection ($P=0.02$). Tumor size difference was significant between 2 and 7 ($P=0.0068$), 2 and 14 ($P=0.0005$) and 7 and 14 ($P=0.0004$) days post-injection. Equals letters indicates statistical difference. SEM – Standard Error of Mean; NA – Not applicable; # - Days post-injection.

Table 2s – Characterization of peritumor inflammatory infiltrate and intratumorally inflammatory infiltrate in animals with solid Ehrlich tumor

Ehrlich groups				
<i>Peritumor Inflammatory Infiltrate</i>	2[#] days n (%)	7[#] days n (%)	14[#] days n (%)	Total
Intensity				
Weak	6 (85.7) ^a	1 (11.1) ^a	4 (44.4)	11
Moderate	1 (14.3) ^a	8 (88.9) ^a	5 (55.6)	14
Intense	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0)	0
Total	7	9	9	25
Standard				
Mononuclear	0 (0)	0 (0)	2 (22.2)	2
Polymorphonuclear	0 (0)	1 (11.1)	0 (0)	1
Mixed	7 (100)	8 (88.9)	7 (77.8)	22
Total	7	9	9	25
<i>Intratumorally Inflammatory Infiltrate</i>				
Absent	3 (42.9) ^b	0 (0) ^b	0 (0)	3
Weak	4 (57.1) ^b	5 (55.6) ^b	7 (77.8)	16
Moderate	0 (0) ^b	4 (44.4) ^b	2 (22.2)	6
Intense	0 (0) ^b	0 (0) ^b	0 (0)	0
Total	7	9	9	25

Ehrlich group was obtained by injection of Ehrlich cells in the Balb/c footpad. Statistical analyze showed differences for peritumor inflammatory intensity between 2 and 7 days post-injection ($P=0.01$). Intratumorally intensity was different between 2 and 7 days post-injection ($P=0.02$). Equals letters indicates statistical difference.
[#] - Days post-injection.

Table 3s – Lymphocyte infiltrate profile

<i>Inflammatory cells markers</i>	Ehrlich groups		
	2[#] days (mean per field ± SEM)	7[#] days (mean per field ± SEM)	14[#] days (mean per field ± SEM)
<i>CD3+</i>	1.32 (± 0.89) ^a	2.40 (± 0.97)	3.22 (± 0.94) ^a
<i>CD4+</i>	5.32 (± 1.82) ^b	4.85 (± 2.53)	1.50 (± 1.44) ^b
<i>CD8+</i>	2.50 (± 1.7)	1.56 (± 1.03)	2.64 (± 1.79)
<i>Foxp3+</i>	3.98 (± 2.67)	5.11 (± 2.62)	3.10 (± 1.15)

Ehrlich group was obtained by injection of Ehrlich cells in the Balb/c footpad. Statistical analyze showed differences for CD3+ cells, between 2 and 14 days post-injection ($P=0.02$). CD4+ cells difference was significant between 2 and 14 days post-injection ($P=0.04$). Equals letters indicates statistical difference. SEM – Standard Error of Mean; # - Days post-injection.

Table 4s - Characterization of Qa-2 expression in neoplastic cells in animals with solid Ehrlich tumor

<i>Qa-2 expression in neoplastic cells</i>	Ehrlich groups			
	2[#] days n (%)	7[#] days n (%)	14[#] days n (%)	Total
Until 10% staining cells	2 (33,3) ^a	3 (42,9) ^a	4 (44,4)	9
10 - 25% staining cells	4 (66,7) ^a	0 (0) ^a	1 (11,2)	5
>25% staining cells	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0)	0
Total	6	7	9	22

Ehrlich group was obtained by injection of Ehrlich cells in the Balb/c footpad. Statistical analyze showed differences between 2 and 7 days post-injection ($P=0.006$). Equals letters indicates statistical difference; # - Days post-injection.

Table 5s - Characterization of Qa-2 expression in serum and peritumor inflammatory infiltrate cells in animals with solid Ehrlich tumor

<i>Qa-2 expression</i>	Ehrlich group			Control group		
	2[#] days (Mean ± SEM)	7[#] days (Mean ± SEM)	14[#] days (Mean ± SEM)	2[#] days (Mean ± SEM)	7[#] days (Mean ± SEM)	14[#] days (Mean ± SEM)
Seric (U/mL)	0,3884 ± 0,0214	0,3577 ± 0,0264	0,4369 ± 0,0422 ^a	0,3376 ± 0,0188	0,3719 ± 0,0504	0,2889 ± 0,0266 ^a
Peritumor inflammatory cells	4,44 ± 1,06	5,53 ± 0,94	4,46 ± 0,44	NA	NA	NA

Ehrlich group was obtained by injection of Ehrlich cells in the Balb/c footpad. Control group was obtained by saline injection in the same site. Statistical analyze showed differences seric Qa-2 expression between Ehrlich and Control on day 14 days post-injection ($P=0.003$). Equals letters indicates statistical difference. SEM – Standard Error of Mean; NA – Not applicable; # - Days post-injection.



ARTIGO 2

REDUCED EXPRESSION OF THE MURINE HLA-G HOMOLOG QA-2 IS ASSOCIATED WITH MALIGNANCY, EPITHELIAL- MESENCHYMAL TRANSITION AND STEMNESS IN BREAST CANCER CELLS

REVISTA: SCIENTIFIC REPORTS
ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Reduced expression of the murine HLA-G homolog Qa-2 is associated with malignancy, epithelial-mesenchymal transition and stemness in breast cancer cells

Istéfani L. da Silva^{1,2,3}, Lucía Montero-Montero³, Ester Martín-Villar^{3,4}, Jorge Martín-Pérez³, Bruno Sainz Jr^{3,5}, Jaime Renart³, Renata Toscano Simões⁶, Émerson Soares Veloso¹, Cláudia Salviano Teixeira⁷, Mônica C. de Oliveira⁷, Enio Ferreira¹ & Miguel Quintanilla^{3,*}

¹Department of General Pathology, Laboratory of Compared Pathology, Biological Science Institute. Federal University of Minas Gerais, 486, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasilia, DF 70.040-020, Brazil.

³Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) - Universidad Autónoma de Madrid (UAM), 28029-Madrid, Spain.

⁴Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biosanitarias, Universidad Francisco de Vitoria, 28223-Madrid, Spain.

⁵Enfermedades Crónicas y Cáncer Area. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain.

⁶Institute of Education and Research of Santa Casa of Belo Horizonte, 590, 30150-240, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁷Laboratory of Pharmacotechniques and Pharmaceutical Technologies, Pharmacy Faculty, Federal University of Minas Gerais, 486, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

* Corresponding author: M.Q. (email: mquintanilla@iib.uam.es)

Qa-2 is believed to mediate a protective immune response against cancer; however, little is known about the role of Qa-2 in tumorigenesis. Here, we used 4T1 breast cancer cells to study the involvement of Qa-2 in tumor progression in a syngeneic host. Qa-2 expression was reduced during *in vivo* tumor growth and in cell lines derived from 4T1-induced tumors. Tumor-derived cells elicited an epithelial-mesenchymal transition associated with upregulation of Zeb1 and Twist1/2 and enhanced tumor initiating and invasive capacities. Furthermore, these cells showed increased stem characteristics, as demonstrated by upregulation of Hes1, Sox2 and Oct3/4, and enrichment of CD44^{high}/CD24^{median/low} cells. Remarkably, Qa-2 cell-surface expression was excluded from the CD44^{high}/CD24^{median/low} subpopulation. Tumor-derived cells showed increased Src activity, and treatment of these cells with the Src kinase inhibitor PP2 enhanced Qa-2 but reduced Sox2 and CD44^{high}/CD24^{median/low} expression levels, suggesting that Src signaling, while positively associated with stemness, negatively regulates Qa-2 expression in breast cancer. Finally, overexpression of the Qa-2 family member Q7 on the cell surface slowed down *in vivo* tumor growth and reduced the metastatic potential of 4T1 cells. These results suggest an anti-malignant role for Qa-2 in breast cancer development, which appears to be absent from cancer stem cells.

Introduction

HLA-G belongs to the human non-classical major histocompatibility complex (MHC), or MHC class 1b, that has been shown to be involved in the immune recognition of tumors^{1,2}. The genes encoding MHC class 1b antigens are oligomorphic, which grants an advantage with respect to the highly polymorphic MHC class 1a antigens in order to develop cancer immunotherapies directed to a wider patient population³. In this respect, it is important to understand the role MHC class 1b proteins play in cancer development and progression. Qa-2 is believed to be the murine homolog of HLA-G, as both families of proteins share a number of characteristics, including: *i*, the presence of membrane-bound and soluble forms that arise from alternative splicing; *ii*, their involvement in preimplantation embryo development; and *iii*, their immunoregulatory roles². There are four main Qa-2 loci: Q6, Q7, Q8 and Q9, which are present in different combinations in each mouse haplotype. The Q7 gene is almost identical to Q9, and Q6 is very similar to Q8. Therefore, these genes are referred as Q7/Q9 and Q6/Q8 pairs⁴.

It has been found that HLA-G expression is enhanced in a number of tumors, including different types of lymphomas and leukemias, melanoma, and breast, kidney, ovarian, lung and colorectal carcinomas⁵. Moreover, HLA-G expression is considered a bad prognostic factor in different types of solid tumors, including colorectal and breast cancers⁵⁻⁷. Whereas most studies have linked HLA-G expression with tumor immune evasion due to its interaction with inhibitory receptors on immune cells^{5,8-10}, other reports suggest that HLA-G can activate NK cells and promote cytotoxicity because of its interaction with the KIR2DL4 receptor^{11,12}. However, these results are controversial as both inhibitory and stimulatory functions have been reported for KIR2DL4, and it is unclear that HLA-G binds KIR2DL4 on NK cells in the tumor microenvironment^{2,5}. To date, however, only a handful studies have addressed the role of Qa-2 in cancer, and most of these studies have focused on Q9. Q9 expression is downregulated in cell lines derived from tumors, such as melanoma, hepatoma, mastocytoma and lymphoma^{13,14}, and has been involved in tumor rejection of melanoma, Lewis lung carcinoma and T-cell lymphoma¹⁴⁻¹⁶.

In this report, we used a 4T1 murine mammary carcinoma syngeneic model to analyze the expression of Qa-2 during *in vivo* breast cancer cell growth and in tumor cells lines derived from these tumors. 4T1 cells are a useful model for advanced human breast cancer or highly metastatic triple-negative carcinomas¹⁷⁻¹⁹. The role of Q7 in 4T1 tumor formation and

metastasis was also assessed. Our results suggest an anti-tumor function for Qa-2 in breast cancer.

Results

Qa-2 expression levels decrease during tumor formation

In order to evaluate whether Qa-2 expression changes during breast cancer development, 4T1 cells were intradermally (i.d.)/subcutaneously (s.c.) injected into the left flank of syngeneic Balb/c mice and tumors harvested at 10, 17 and 24 days post-injection. At these post-injection times, the mean volumes of tumors were 1.47 ± 0.75 , 1.93 ± 0.68 and 4.61 ± 1.66 cm³, respectively. Qa-2 expression in neoplastic and peritumor inflammatory cells was determined by immunohistochemistry, whereas soluble Qa-2 concentrations in the sera of the animals were scored by ELISA. The presence of Qa-2 in tumors was focal (Fig. 1A-C). The number of neoplastic cells that stained positive for Qa-2 was, in general, low, and never exceeded 25% of the total number of tumor cells. Moreover, a clear observable and significant decrease in Qa-2 expression in neoplastic cells was associated with tumor expansion (Fig. 1D). The number of peritumor inflammatory Qa-2-positive cells and the amount of soluble Qa-2 were also reduced during tumor growth; however, these differences were not statistically significant (Fig. 1E-F).

Transplantation *in vivo* selects for 4T1 cells with enhanced fibroblastic, malignant and stem characteristics

Primary tumors were induced by injection of 4T1 cells either i.d./s.c. into the back or, orthotopically, into the mammary fat pad of Balb/c mice. Compared to 4T1 parental cells, tumor-derived cells, particularly 4T1t cells, showed a more elongated morphology and a higher number of detached (stringent) cells, as determined by microscopic examination (Fig. 2A, insets). While 4T1t cells were less proliferative than 4T1m and 4T1 cells *in vitro* (Supplementary Fig. S1), they showed increased invasive characteristics (Fig. 2B) and secreted higher amounts of MMP-9 metalloproteinase (Supplementary Fig. S2). 4T1m cells, on the other hand, exhibited a similar proliferative capacity (Supplementary Fig. S1), but were more invasive than parental 4T1 cells (Fig. 2B). A non-invasive MCA3D mouse keratinocyte cell line was included in these assays as a control. 4T1t and 4T1m cells were also more tumorigenic than 4T1 upon re-injection into mice. Since 4T1 cells are already strongly tumorigenic, only 10^3 cells were inoculated per site into recipient animals in order to compare the tumor initiating

capacity of each cell line. All mice inoculated with 4T1t and 4T1m cells developed tumors of 0.021-0.063 cm³ at 13 days post-injection, whereas only 2 out of 3 mice inoculated with 4T1 cells harbored tumors of smaller volumes (Fig. 2C, D). Interestingly, tumors induced by 4T1t cells grew more rapidly than those induced by 4T1 and 4T1m cells (Fig. 2C), in light of its lower proliferative capacity *in vitro*.

Since 4T1m and 4T1t cells showed a more fibroblastic appearance compared to 4T1 cells, we assessed the expression of differentiation protein markers by Western blotting. Both 4T1m and 4T1t cells showed reduction of epithelial markers, such as E-cadherin, β -catenin and cytokeratin 5 (CK5). Conversely, these cells showed increased expression of vimentin, a mesenchymal marker (Fig. 3A). A loss of variant isoforms of the hyaluronan receptor CD44 (CD44v) and increased expression of the standard isoform, CD44s, was also observed in these cells (Fig. 3A). This shift in CD44 expression has also been related to EMT^{20,21}. A quantification of these changes by densitometric analysis is shown in Supplementary Fig. S3. Interestingly, the observed changes in differentiation markers correlated with enhanced expression of the transcription factors Twist 1/2 (Fig. 3A) and Zeb1 (Fig. 3B), two master regulators of EMT²², and with enhanced activity/autophosphorylation of Src while the total levels of Src were unchanged (Fig. 3A).

Since EMT has been associated with the generation of stem-like characteristics^{23,24}, we also analyzed the expression of stemness-related factors by real-time qRT-PCR. As shown in Fig. 3B, the expression of Hes1, Sox2 and Oct3/4, three transcription factors involved in the maintenance and self-renewal of stem cells²⁵⁻²⁷, was increased in both 4T1m and 4T1t cell lines (particularly in the latter) with respect to 4T1 parental cells. In addition, we analyzed the expression of CD44 and CD24 by flow cytometry. These two cell-surface markers have been associated with breast cancer stem cells (CSCs), specifically the CD44^{high}/CD24^{median/low} subpopulation²³. CD44^{high}/CD24^{med/low} were enhanced 2-3 fold in 4T1m and 4T1t cells with respect to the parental cell line (Fig. 3C), indicating enrichment in CSC-like cells.

Overall, these results suggested that 4T1-induced tumors select cells that undergo an EMT associated with increased tumorigenic and stem characteristics and activation of the cytoplasmic tyrosine kinase Src.

Transplantation *in vivo* of 4T1 cells reduces Qa-2 expression

The expression of Qa-2 was also analyzed in 4T1 and 4T1-derived cell lines by flow cytometry. We found that cell-surface Qa-2 expression was reduced approximately 2-3 fold in 4T1m and 4T1t cells with respect to 4T1 cells (Fig. 4A). In order to analyze the relationship of Qa-2 with stemness, we isolated the CD44^{high}/CD24^{med/low} cell population from 4T1m cells by fluorescence-activated cell sorting (FACS) and assessed the presence of Qa-2 in these cells. As shown in Fig. 4B, Qa-2 expression in CD44^{high}/CD24^{med/low} cells was negligible. This finding was confirmed by immunofluorescence analysis (Fig. 4C), suggesting an inverse relationship between Qa-2 expression and stem-like cells in breast cancer. In addition, the results obtained in this cell model indicate an inverse correlation between Qa-2 levels and tumor progression.

Inhibition of Src stimulates Qa-2 expression

Since the Src family kinases (SFKs) has been involved in EMT^{28,29} and pluripotency³⁰, and Qa-2 appears to mediate activation of the SFK member Fyn³¹, we treated 4T1m and 4T1t cell lines with two well-established inhibitors of SFK activity: Dasatinib and PP2³². Dasatinib at a concentration of 100 nM had an apparent cytotoxic effect on the cultures, causing a high proportion of cell death in both cell lines. In contrast, PP2 at 5 μ M was more benign inducing much lower cell death (Fig. 5A and Supplementary Fig. S4), and promoted a reduction in the number of stringent cells, particularly in 4T1t cells (Supplementary Fig. S4). Both inhibitors reduced 4T1t and 4T1m cell growth, although the effect on 4T1t cells was stronger (Fig. 5B). PP2 efficiently reduced Src activity in 4T1t cells, as shown by decreased levels of phospho-Src. This effect occurred concomitantly with a slight increase in the synthesis of E-cadherin and β -catenin and a reduction of vimentin and Twist1/2 protein levels (Fig. 5C and Supplementary Fig. S5). Similar results were obtained in 4T1m cells treated with the kinase inhibitor (Supplementary Fig. S6). PP2 also induced a clear increase of about 2 fold in the levels of Qa-2, as assessed by real-time qRT-PCR determination of Q7/Q9 transcripts, two members of the Qa-2 family (Fig. 5D). In addition, we analyzed the effect of PP2 on stemness-related factors by Western blotting. While antibodies used for Hes1 and Oct3/4 did not recognize any specific protein in the cell lysates, we found that PP2 induced a decrease on the levels of Sox2, more evident in 4T1m cells (Fig. 6A). Moreover, a reduction in the CD44^{high}/CD24^{med/low} cell subpopulation was also observed in 4T1t and 4T1m cell lines after treatment with PP2 (Fig. 6B).

Qa-2 overexpression induces a less aggressive tumor phenotype

In order to evaluate the effect of Qa-2 modulation on tumor growth and metastasis *in vivo*, 4T1 cells-expressing luciferase were stably transfected with Q7 cDNA cloned in the pcDNA3 expression vector. Enhanced expression of Q7 in 4T1-Q7 transfectants with respect to control 4T1-neo cells (transfected with the vector alone) was confirmed by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 7A), real-time qRT-PCR (Fig. 7B), flow cytometry (Fig. 7C) and immunofluorescence (Fig. 7D) analysis. Overexpression of Q7 in 4T1 cells did not induce a significant morphological change or variations in the expression of differentiation protein markers, as determined by Western blotting (data not shown).

4T1-Q7 and 4T1-neo cells were orthotopically injected into the mammary fat pad of Balb/c mice and tumor growth monitored at different times by *in vivo* imaging. 4T1-Q7 cells induced tumors that grew slower than those induced by 4T1-neo cells (Fig. 8A, B). At the end of the experiment (28 days post-injection), tumor volumes (determined by caliper measurements) induced by 4T1-Q7 were appreciably less than those induced by control 4T1-neo cells, although differences were not statistically significant (Fig. 8C). Strikingly, 4T1-Q7 cells were less metastatic than control 4T1-neo (Fig. 8A, arrows) or 4T1 parental (data not shown) cells. In fact, only about 30% of mice inoculated with 4T1-Q7 cells developed lung metastases *versus* 100% of 4T1-neo mice (Fig. 8D). The presence of metastatic cells in the lungs was confirmed by luciferase immunostaining of histological sections. Shown in Fig. 8E is a representative image of a lung section from a mouse injected with 4T1-neo cells, where a large number of metastatic tumor cells can be observed, whereas no metastatic tumor cells can be seen in a lung section from a mouse injected with 4T1-Q7 cells.

Discussion

In this study, we show that Qa-2 protein levels diminish during the growth of tumors produced *in vivo* by highly tumorigenic 4T1 breast cancer cells in syngeneic mice. Furthermore, cell lines established from 4T1-induced tumors (either in the back or in the mammary fat pad) showed a marked reduction in Qa-2 cell-surface expression. These cell lines, 4T1t and 4T1m, had stronger tumor initiating and invasive capacities compared to 4T1 cells, and elicited an EMT associated with upregulation of EMT-promoting transcription factors; i.e., Twist1/2 and Zeb1²², as well as factors related to stemness, such as Hes1, Sox2 and Oct3/4²⁵⁻²⁷. These results

are in agreement with previous reports suggesting that EMT generates cells that acquire malignant and stem-like traits^{23,24}. Likewise, we isolated a CD44^{high}/CD24^{med/low} cell population from 4T1m cells, which are enriched in breast CSCs^{23,33,34}, in order to study the potential link between Qa-2 and CSCs. We found that CD44^{high}/CD24^{med/low} cells do not express Qa-2. To our knowledge, this is the first time that exclusion of the MHC class 1b proteins from CSCs is reported. The above results suggested an anti-tumor role for Qa-2. This assumption was confirmed by forcing the expression of Q7, a key member of the Qa-2 family in Balb/c mice^{13,35}, on the surface of 4T1 cells by cDNA transfection. 4T1-Q7 cells induced tumors that grew slower and produced less lung metastases than control or parental cells.

The anti-oncogenic role of Qa-2 is in deep contrast with the reported pro-tumorigenic function for HLA-G^{2,5} (see also the Introduction), which raises the question whether Qa-2 is the functional murine homolog of HLA-G, at least in the context of cancer. Our results are in line with studies reported by Chiang and Strojnowski on the protective role exerted by Q9 for melanoma, lung carcinoma and T-cell lymphoma *in vivo* outgrowth. In these studies, restoration of Q9 expression in tumors that have downregulated Q9 results in a CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL)-mediated response that eliminates them in syngeneic hosts¹⁴⁻¹⁶. In other report, the same authors have shown that Q9 expressed in class I-deficient melanoma cells protects cells from NK cell-mediated cytotoxicity³⁶. In this respect, Qa-2 exclusion from CD44^{high}/CD24^{med/low} cells might be related to immune evasion of this breast CSC-like cell subpopulation, a hypothesis that remains to be investigated. Indeed, when mice were challenged with 4T1 cells overexpressing Q7 on their surface tumors that developed grew at a slower rate and were less aggressive than those induced by control cells, which might suggest that Q7 renders tumors susceptible to immune surveillance; hence, downregulation of Qa-2 during *in vivo* 4T1 tumor growth. Alternatively, an immune-independent mechanism might be behind the anti-tumorigenic effect of Q7, as 100% of mice challenged with 4T1-Q7 cells developed tumors as did mice challenged with control 4T1-neo cells. Further work is needed to clarify this issue.

We also provide evidence in this study that Src signaling negatively regulates Qa-2 expression in breast cancer cells, as inhibition of Src activity by the well-established PP2 inhibitor enhanced Qa-2 transcript levels. Interestingly, patients with triple negative breast cancer appear to be sensitive to treatment with pharmacological inhibitors of Src³⁷. The PP2-mediated increase in Qa-2 expression levels occurred concomitantly with a reduction in Sox2 expression and the number of CD44^{high}/CD24^{med/low} cells, emphasizing again the inverse relationship between Qa-2 and stemness in breast cancer cells. Also, PP2 induced a slight

reversion of EMT, as shown by decreased expression of Twist1/2 and vimentin and an observable increase in E-cadherin and β -catenin levels. These results suggest at least a partial role for Src activity in the enrichment of CSC cells and EMT induced by transplantation of 4T1 cells *in vivo*. Augmented Src activity has been found in several types of malignancies, including breast cancer, associated not only with increased tumor cell proliferation, but also with EMT, invasion and metastasis^{28,29}.

In summary, we show in this report an inverse relationship between Qa-2 expression and malignancy, epithelial-mesenchymal transition and stemness in breast cancer that appears to be partially mediated by Src signaling. However, more studies are necessary to unveil the mechanism(s) behind these connections, and to decipher the exact role of Qa-2 in malignancy.

Materials and Methods

Cell culture and treatments

The 4T1 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, USA). 4T1m and 4T1t cell lines were derived by explanting tumors induced by 4T1 cells in the mammary fat pad (see below) and the back (i.d./s.c.) of Balb/cj mice, respectively. Tumors had a size 0.5-1 cm-diameter when explanted. MCA3D are non-tumorigenic keratinocytes derived from mouse skin treated with a chemical carcinogen³⁸. Cell lines were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), except MCA3D cells that were grown in Ham's F-12 medium, supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), at 37°C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere. All cell lines were tested for mycoplasma contamination by immunofluorescence staining with 1 μ g/ml solution of 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; Sigma–Aldrich).

Cells were treated with Src family kinase inhibitors Dasatinib (100 nM) and PP2 (5 μ M), as previously described³². Briefly, $\sim 6 \times 10^5$ cells were seeded in duplicate plates, and incubated in the presence of inhibitors for 48 h. At the end of the experiment, cells were counted and the percentage of growth inhibition calculated with respect to vehicle-treated controls. Cell viability was determined by 0.4% Trypan blue exclusion.

cDNA transfection

The H2-Q7 antigen full-length coding sequence was amplified by PCR using the following primers: forward: 5'-CAGTGTGCTGGAATTCATGGCTCTAACAATGCTGCTC-3', and reverse: 5'-GATATCTGCAGAATTCCCACCTGTGTTTCACCTCCTA-3', and the Phusion® High Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). The PCR product was subcloned into the pcDNA3 expression vector (Invitrogen) with In-Fusion HD Cloning kit (Clontech). The presence and integrity of the insert was verified by DNA sequencing. 4T1 cells were transfected with this plasmid, or the pcDNA3 vector alone (control), using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), and transfected cells selected in 0.5 mg/ml G418 (Invitrogen) for 3 weeks.

Matrigel invasion assay

Invasion assays were performed using Transwell chambers with 8-µm-pore polycarbonate filters coated with Matrigel (BD Biosciences). Approximately 2×10^4 cells were seeded in the upper compartment in medium without serum, and allowed to transmigrate for 24 h using 5% FBS as a chemoattractant in the bottom compartment. Non-migrated cells on the upper side of the Transwell were subsequently removed, and those on the underside were fixed with methanol and stained with 0.1% crystal violet. Cell migration was quantified by counting the number of cells that migrated through the filters. Ten different fields (x200) were counted in triplicate experiments.

Quantitative and semiquantitative RT-PCR

RNA from cell lines was purified using the RNeasy kit (Qiagen). Quantitative reverse transcription-PCR analysis was performed using the high-capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) in a 7900HT Fast (Life Technologies) instrument. Taqman probes for Qa-2 (Mm00843895_s1) and β -actin (Mm00843895_s1), used as an internal control, were purchased from Life Technologies. Amplification of Zeb1, Sox2, Hes1 and Oct3/4 transcription factors was performed using Power SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher), with hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (hprt) as an internal control. Oligonucleotide sequences for these primers are detailed in Supplementary Information.

For semiquantitative RT-PCR, RNAs (1 µg) were incubated with the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega), and the generated cDNA were used for PCR

amplification. Specific primers for Q7/Q9 and β -actin amplification have been described elsewhere¹³.

Western blot and ELISA analysis

For Western blot analysis, cells were lysed in RIPA buffer containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors, as described³⁹. For immunodetection of proteins, the following primary antibodies (Abs) were used: mAb ECCD for E-cadherin (dilution 1:250), kindly provided by Dr A. Cano (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Spain), mAbs 610153 (1:2000) and RV202 (1:250) for β -catenin and vimentin, respectively, from BD Biosciences; mAb EPR1600Y (1:1500) for CK5 from Abcam; mAb 327 (1:500) for Src was a kind gift of Dr. J.S. Brugge (Harvard Medical School, USA) and polyclonal Ab recognizing Src phosphorylated Y418 (1:1000) was from Biosource Int. (Invitrogen); polyclonal Ab for Twist1/2 (1:1000) was from Genentech; mAb AC-74 (1:10000) for β -actin from Sigma-Aldrich; mAb KM-201 (1:200) for CD44 was a kind gift from Dr. H. Yarwood (Imperial College London, UK); and polyclonal goat IgG for Sox2 (AF2018, R&D Systems), a generous gift from Dr. I. Palmero (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Spain). Appropriate horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated IgGs were used as secondary antibodies. Peroxidase activity was visualized using an enhanced chemiluminescence kit as indicated by the manufacturer (Pierce).

The concentration of Qa-2 in the sera of mice was determined using a Qa-2 ELISA kit (MyBiosource.com) following the manufacturer's recommendations.

Flow cytometry and sorting

The following antibodies were used for FACS analysis: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD44 (clone KM201) and anti-Qa-2 (clone 69H1-9-9, eBioscience), and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD24 (clone M1/69, Miltenyi Biotech), in a FACS Canto II with FACSDiva software (BD Bioscience) or in a Cytomics FC 500 MPL with MXP software (Beckman Coulter). Positivity for Qa-2 expression was identified using mouse IgG2a kappa isotype control (FITC) (Supplementary Fig. S7). As positive control, C57Bl/6 mouse splenocytes were used (Supplementary Fig. S7). CD44^{high} expression level was selected arbitrarily to include cells having fluorescence intensity units (FI) higher than 50. Similarly, CD24^{low} expression level was selected to include cells having FI lower than 50, and CD24^{median} expression level cells with FI between 50 and 400. Sorting of the CD44^{high}/CD24^{med/low} cell

subpopulation from 4T1m cells was performed using a FACSVantage SE sorter (BD Biosciences).

Tumorigenicity and bioluminescence assays

All animal experiments were approved by the Animal Care and Use Committees of the Spanish National Research Council (CSIC), Community of Madrid (Ref. PROEX 37/14) and Federal University of Minas Gerais of Brazil. Mice were cared for following institutional guidelines and in accordance with the standards established by the European Union (2010/63/UE) and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

For tumorigenicity assays, 10^6 or 10^3 cells (as indicated) were i.d./s.c. injected into the left flank of 6 to 8-weeks old female Balb/cj mice (Harlan). The size of tumors was calculated via caliper measurements of two orthogonal diameters at different times. The tumor volume was calculated using the equation $V = a \times b^2/2$, where a is the largest diameter and b is the smallest diameter. Tumors were fixed in formalin and embedded in paraffin.

For experiments to evaluate the tumorigenic and metastatic potential of 4T1-neo and 4T1-Q7 cell lines, mice were anesthetized with isoflurane inhalation before orthotopic transplantation of cells. An incision of ~ 0.5 cm was made along the medial side of the nipple of the second right mammary gland. Approximately, 10^5 cells, stably infected with lentiviral expression particles for luciferase (CMV-Luciferase firefly, from AMBIO, Abingdon, UK), were injected into the exposed fat pad, and the skin layer was subsequently closed with surgical staples. Each mouse was imaged periodically, using an IVIS Lumina 2 imaging system (Xenogen, USA), after retro-orbital injection of 3 mg luciferin (Goldbio, USA) in 100 μ l of PBS under anesthesia. The areas of tumors (ROI, regions of interest) were determined at different post-inoculation times according to Living Image 4.0 software (Perkin Elmer). After 28 days, mice were euthanasized and lungs excised for immunofluorescence analysis. Pieces of lungs were fixed in formalin and embedded in paraffin.

Immunohistochemical and immunofluorescence analysis

Immunohistochemical detection of Qa-2 was performed in deparaffinized tumor sections, after heat-induced antigen retrieval, by the Envision plus peroxidase method (Dako). Clone 69H1-9-9 (1:50) was used as the primary Ab for Qa-2 detection. The reaction product was developed with diaminobenzidine tetrahydrochloride and H_2O_2 . The sections were

dehydrated in graded ethanols, cleared in xylene, and mounted in Permount after counterstain with Hematoxylin. A total number of 15 sections (x60) were evaluated. Workshop score for Qa-2 expression in tumor cells was as follows: +1 when up to 10% of cells were stained; +2 when 11-25% of cells were stained; and +3 when > 25% of cells were stained.

Immunofluorescence detection of Qa-2 in cultured cells was performed in confluent cultures grown on glass coverslips, washed in PBS and permeabilized with 0.05% Triton X-100, using FITC-conjugated anti-Qa-2 mAb (clone 69H1-9-9, 1:50; eBioscience). Coverslips were mounted on ProLong[®] Diamond Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific) and examined with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 90i).

For immunolocalization of luciferase in deparaffinized lung histological sections, a goat polyclonal Ab against luciferase (1:100; Novus Biologicals) was used after permeabilization in 0,1% Triton X-100 and heat-induced antigen retrieval in 1mM EDTA. The primary Ab signal was amplified using donkey anti-goat IgG secondary Ab coupled to HRP and TSA Plus Cyanine (Perkin Elmer), following the manufacturer's instructions. Cell nuclei were counterstained with DAPI.

Statistics

The data are shown as the mean $\pm$ SEM. All data were normalized by Kolmogorov-Smirnov test and Grubbs' test for outliers. Comparison between two groups was performed using the Student's *t* test and for unpaired data by the Mann-Whitney U test. Significance was determined using the one-way analysis of variance (ANOVA) or the Student's *t* test. Differences were considered significant if $P < 0.05$. All statistical analyses was performed using GraphPad Instat 5.0 software.

References

- 1 Shawar, S. M., Vyas, J. M., Rodgers, J. R. & Rich, R. R. Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu Rev Immunol* **12**, 839-880 (1994).
- 2 Gomes, A. Q., Correia, D. V. & Silva-Santos, B. Non-classical major histocompatibility complex proteins as determinants of tumour immunosurveillance. *EMBO Rep* **8**, 1024-1030 (2007).
- 3 Singh-Jasuja, H., Emmerich, N. P. & Rammensee, H. G. The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* **53**, 187-195 (2004).
- 4 Wu, L., Exley, G. E. & Warner, C. M. Differential expression of Ped gene candidates in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* **59**, 941-952 (1998).

- 5 Carosella, E.D., Rouas-Freiss, N., Tronik-Le Roux, D., Moreau, P. & LeMaoult, J. HLA-G: an immune checkpoint molecule. *Adv Immunol* **127**, 33-144 (2015).
- 6 Ye, S. R. *et al.* Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Mod Pathol* **20**, 375-383 (2007).
- 7 de Kruijf, E. M. *et al.* HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients. *J Immunol* **185**, 7452-7459 (2010).
- 8 LeMaoult, J., Krawice-Radanne, I., Dausset, J. & Carosella, E. D. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7064-7069 (2004).
- 9 Bahri, R. *et al.* Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes. *J Immunol* **176**, 1331-1339 (2006).
- 10 Caumartin, J. *et al.* Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J* **26**, 1423-1433 (2007).
- 11 Rajagopalan, S., Fu, J. & Long, E. O. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* **167**, 1877-1881 (2001).
- 12 Kikuchi-Maki, A., Yusa, S., Catina, T. L. & Campbell, K. S. KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. *J Immunol* **171**, 3415-3425 (2003).
- 13 Ungchusri, T. *et al.* Widespread expression of the nonclassical class I Qa-2 antigens in hemopoietic and nonhemopoietic cells. *Immunogenetics* **53**, 455-467 (2001).
- 14 Chiang, E. Y., Henson, M. & Stroynowski, I. Correction of defects responsible for impaired Qa-2 class Ib MHC expression on melanoma cells protects mice from tumor growth. *J Immunol* **170**, 4515-4523 (2003).
- 15 Chiang, E. Y. & Stroynowski, I. A nonclassical MHC class I molecule restricts CTL-mediated rejection of a syngeneic melanoma tumor. *J Immunol* **173**, 4394-4401 (2004).
- 16 Chiang, E. Y. & Stroynowski, I. Protective immunity against disparate tumors is mediated by a nonpolymorphic MHC class I molecule. *J Immunol* **174**, 5367-5374 (2005).
- 17 Pulaski, B. A. & Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 20**, Unit 20 22 (2001).
- 18 Kaur, P. *et al.* A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer* **12**, 120 (2012).
- 19 Ferrari-Amorotti, G. *et al.* Suppression of invasion and metastasis of triple-negative breast cancer lines by pharmacological or genetic inhibition of slug activity. *Neoplasia* **16**, 1047-1058 (2014).
- 20 Martin-Villar, E. *et al.* Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol Biol Cell* **21**, 4387-4399 (2010).
- 21 Xu, H. *et al.* The role of CD44 in epithelial-mesenchymal transition and cancer development. *Onco Targets Ther* **8**, 3783-3792 (2015).
- 22 Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871-890 (2009).
- 23 Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704-715 (2008).
- 24 Polyak, K. & Weinberg, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* **9**, 265-273 (2009).
- 25 Okita, K. & Yamanaka, S. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* **1**, 103-111 (2006).

- 26 Mansouri, S. *et al.* Sox2: regulation of expression and contribution to brain tumors. *CNS Oncol* **5**, 159-173 (2016).
- 27 Liu, Z. H., Dai, X. M. & Du, B. Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance. *Cancer Biol Ther* **16**, 353-359 (2015).
- 28 Guarino, M. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* **223**, 14-26 (2010).
- 29 Patel, A., Sabbineni, H., Clarke, A. & Somanath, P. R. Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis. *Life Sci* **157**, 52-61 (2016).
- 30 Tan, B. S. *et al.* Src Family Kinases and p38 Mitogen-Activated Protein Kinases Regulate Pluripotent Cell Differentiation in Culture. *PLoS One* **11**, e0163244 (2016).
- 31 De Fazio, S. R. & Warner, C. M. Activation of T cells by cross-linking Qa-2, the ped gene product, requires Fyn. *Am J Reprod Immunol* **58**, 315-324 (2007).
- 32 Sanchez-Bailon, M. P. *et al.* Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Signal* **24**, 1276-1286 (2012).
- 33 Jaggupilli, A. & Elkord, E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol* **2012**, 708036 (2012).
- 34 Erin, N. *et al.* Differential characteristics of heart, liver, and brain metastatic subsets of murine breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **139**, 677-689 (2013).
- 35 Stroynowski, I. & Tabaczewski, P. Multiple products of class Ib Qa-2 genes which ones are functional? *Res Immunol* **147**, 290-301 (1996).
- 36 Chiang, E. Y., Henson, M. & Stroynowski, I. The nonclassical major histocompatibility complex molecule Qa-2 protects tumor cells from NK cell- and lymphokine-activated killer cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* **168**, 2200-2211 (2002).
- 37 Finn, R. S. *et al.* Dasatinib as a single agent in triple-negative breast cancer: results of an open-label phase 2 study. *Clin Cancer Res* **17**, 6905-6913 (2011).
- 38 Quintanilla, M. *et al.* Comparison of ras activation during epidermal carcinogenesis in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* **12**, 1875-1881 (1991).
- 39 del Castillo, G. *et al.* Soluble endoglin antagonizes Met signaling in spindle carcinoma cells. *Carcinogenesis* **36**, 212-222 (2015).

Acknowledgements

We thank Maria Gracia González for skillful assistance in orthotopic transplantation of cells into the mammary fat pad of mice. We also thank Amparo Cano, Ignacio Palmero, Joan S. Brugge and Helen Yarwood for kind gifts of anti-E-cadherin, anti-Sox2, anti-Src and anti-CD44 mAbs. This work was supported by grants: APQ-04269-10 and RED-00011-14 from the Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), to EF; SAF2012-38048 and SAF2013-46183-R from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness/European Funding for Regional Development (MINECO/FEDER), to JM-P and MQ, respectively. ILDS was the recipient of an international fellowship from the CAPES Foundation (Higher Level Personnel Improvement Commission), Ministry of Education of Brazil, procs. Nr. 999999.009972/2014-05. LM-M was funded by the Spanish FPI program (BES-2014-069327).

Author contributions

ILDS performed most of the experiments included in the paper with the assistance of LM-M. LM-M performed experiments described in Fig. 6 and Supplementary Fig. S7. EM-V and JR helped with cDNA cloning and lentiviral infection. JM-P supervised experiments involving Src activity and inhibitors. BSjr supervised qRT-PCR experiments of EMT and stem cell-related transcription factors. ES helped with immunohistochemical analysis. CS and MCO provided 4T1 cells and supervised tumorigenicity experiments. RT and EF designed initial experiments about Qa-2 expression during tumor growth *in vivo*, and coordinated the study together with MQ, who designed the rest of experiments and wrote the paper.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

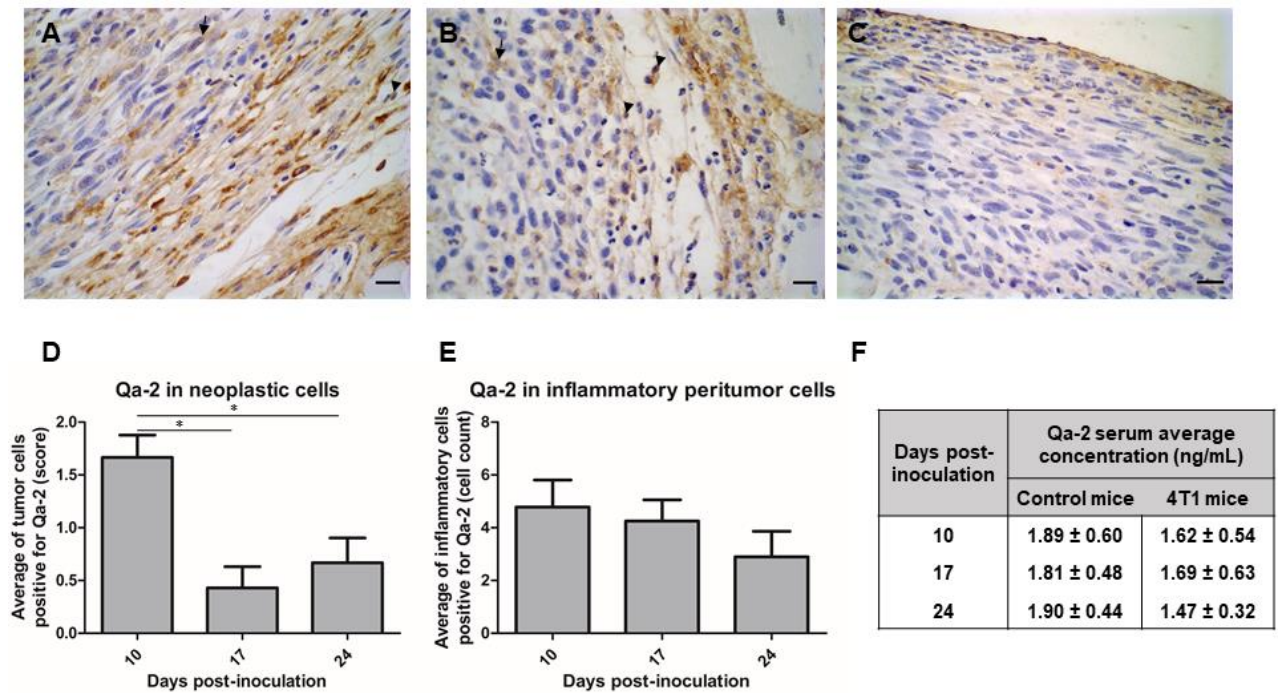


Figure 1. Qa-2 expression decreases during tumor growth. (A-C) Immunohistochemical detection of Qa-2 in 4T1-induced tumors at 10 (A), 17 (B) and 24 (C) days post-inoculation. Examples of stained tumor cells and peritumor inflammatory cells are indicated by arrows and arrowheads, respectively. Groups of mice ($n = 15$) were inoculated i.d./s.c. with 10^6 cells into the left flank. Bars, 20 μm . (D, E) Estimation of neoplastic (D) and peritumor inflammatory (E) cells stained for Qa-2. Values represent the average number of tumor cells stained for Qa-2 determined in 15 fields. A number of 5 tumors per each post-injection time were evaluated. Asterisk indicates statistically significant difference ($*p < 0.05$). (F) The concentration of soluble Qa-2 in the sera of mice bearing 4T1 tumors and control mice without tumors at different days post-injection, as determined by ELISA. Values represent the average of 5 mice per group at each post-inoculation time.

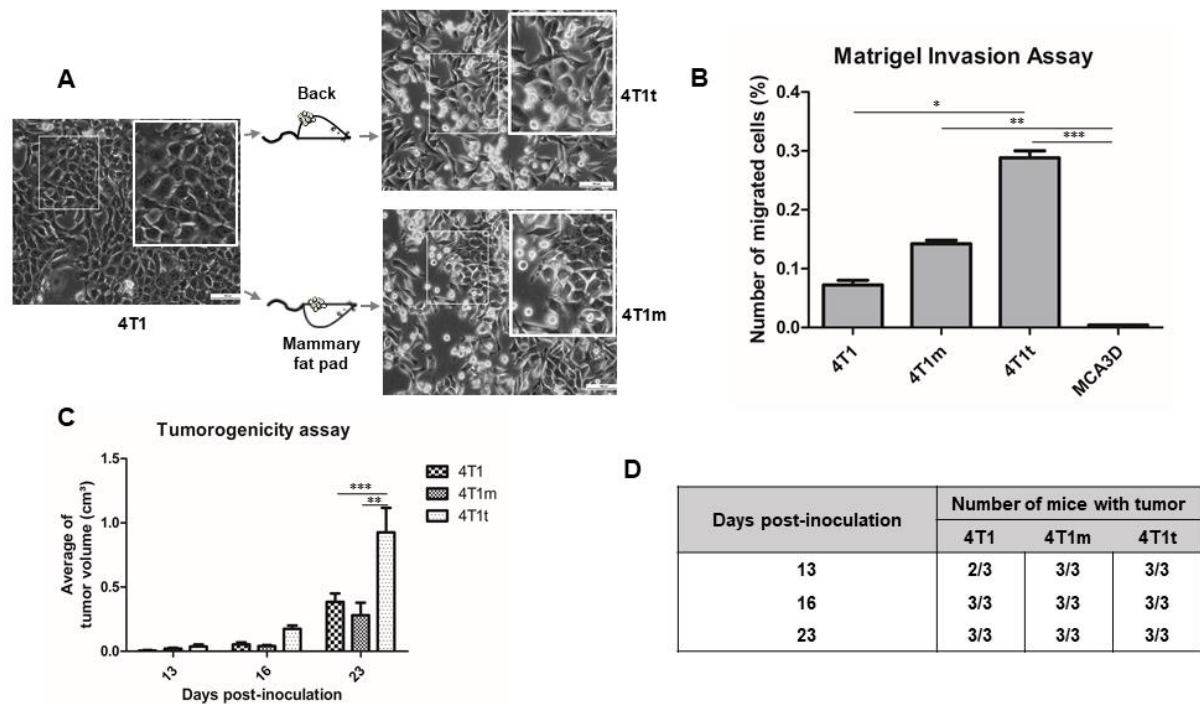


Figure 2. Cell lines derived from 4T1-induced tumors are more malignant. (A) Origin and phase contrast micrographs of 4T1t and 4T1m cell lines. Bars, 100 μ m. Insets show increased magnifications of the indicated areas. (B) Matrigel invasion assay. Cells were seeded on a 24-well Matrigel-coated invasion chamber. FBS (5%) was used as a chemoattractant. Migrated cells on the underside of the filter were fixed, stained and counted. Values are the percentage of migrated cells with respect to the total cells seeded on the well, and represent the means of triplicate assays from three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant difference (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) (C) Tumorigenic behavior of 4T1-derived cell lines. Groups of mice ($n = 3$) were inoculated i.d./s.c. with 10^3 cells into the left flank. The size of tumors was measured at the indicated times with a caliper and the volume calculated as indicated in Materials and Methods. Asterisks indicate statistically significant difference (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (D) The incidence of tumors at different indicated post-injection times.

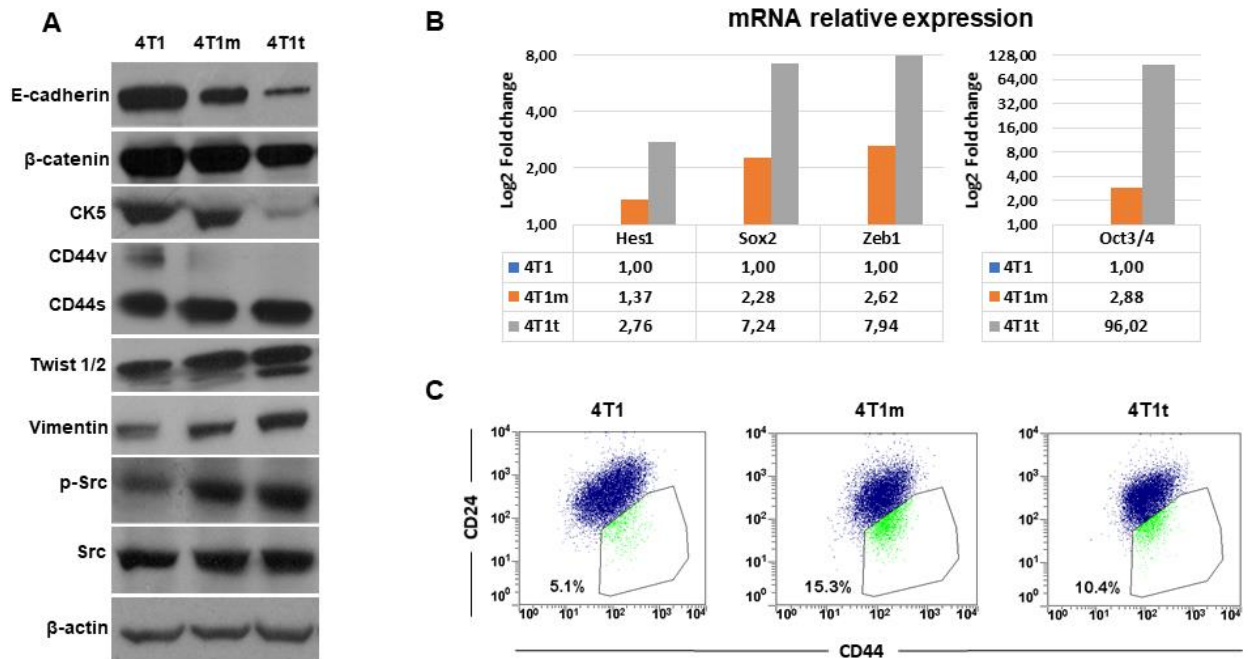


Figure 3. 4T1 cells transplanted *in vivo* undergo a partial EMT and acquire stem-like cell characteristics. (A) Western blot analysis of EMT protein markers and Src. Active Src (p-Src) was detected with a mAb specifically recognizing Src phosphorylated on Y418. β -actin was used as a control for protein loading. The blot shown is representative of two independent experiments. (B) Analysis of mRNA expression of the indicated transcription factors. Normalized transcript levels were measured by real-time qRT-PCR relative to hprt mRNA levels. Values (mean of duplicate determinations) represent increases with respect to 4T1 parental cells, which were given an arbitrary value of 1. (C) Flow cytometry analysis of the cell-surface markers CD44 and CD24 in the indicated cell lines. The percentage of CD44^{high}/CD24^{med/low} cell subpopulation is indicated. A representative experiment out of two is shown.

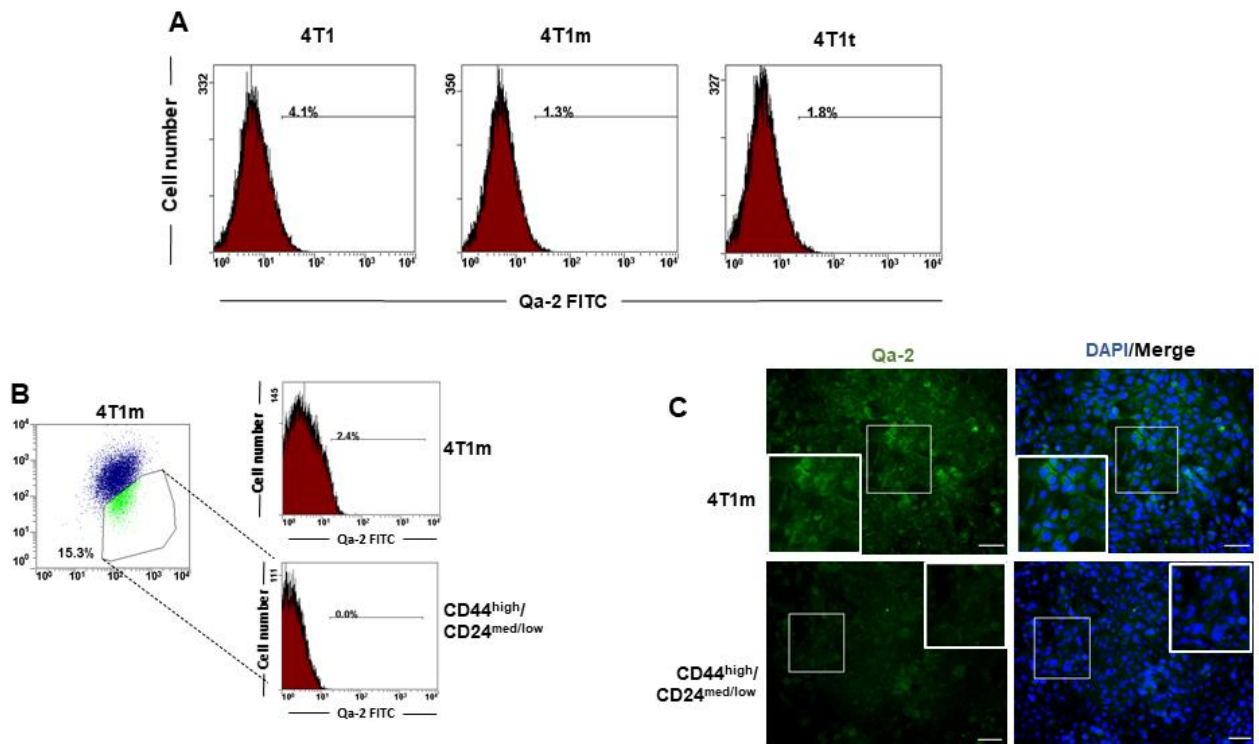


Figure 4. Cell lines derived from 4T1 tumors have reduced Qa-2 expression. (A) Analysis of Qa-2 cell-surface expression by flow cytometry. (B) The CD44^{high}/CD24^{med/low} cell subpopulation was isolated from 4T1m cells by FACS and the expression of Qa-2 determined in these cells (bottom panel) and in the total 4T1m cell population (upper panel). Note that Qa-2 expression in CD44^{high}/CD24^{med/low} cells is undetectable. (C) Immunofluorescence detection of Qa-2 in 4T1m and CD44^{high}/CD24^{med/low} cells. Nuclei were stained with DAPI. Bars, 100 μ m. Insets show increased magnifications of the indicated areas.

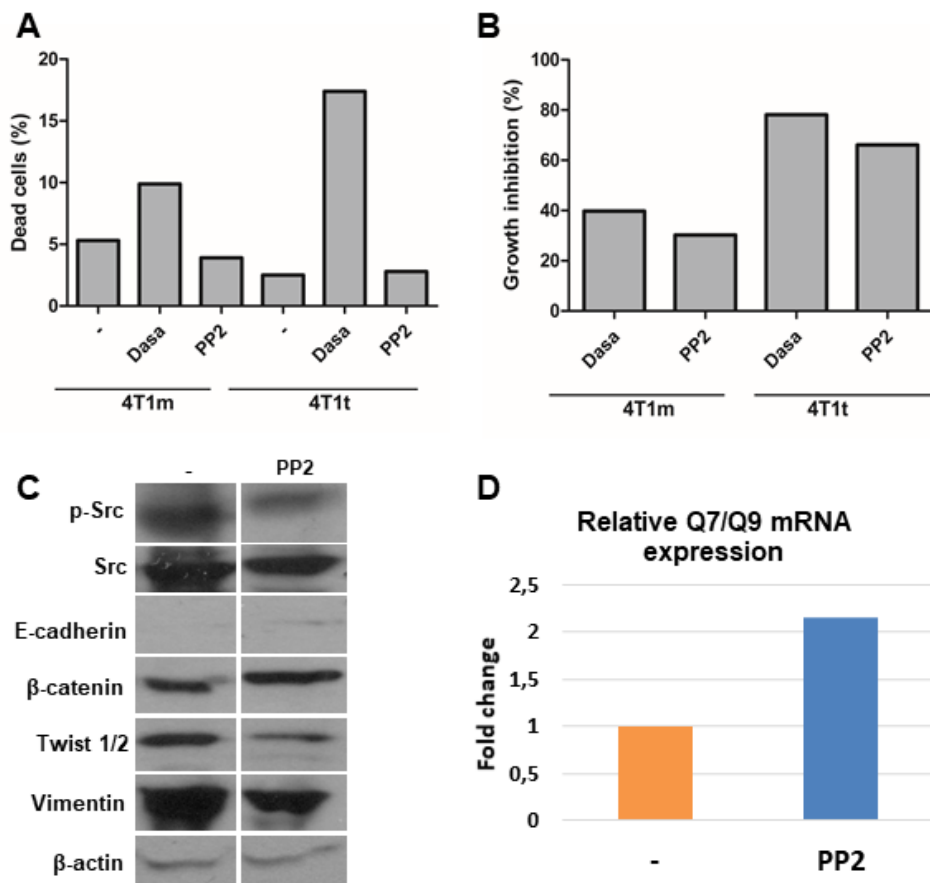


Figure 5. Pharmacological inhibition of Src enhances Qa-2 expression. (A) Effect of Src inhibitors on cell viability. 4T1t and 4T1m cell cultures were treated with Dasatinib (Dasa; 100 nM) and PP2 (5 μ M) for 48 h, and cell viability was determined by Trypan blue exclusion. Values represent the means of duplicate incubations. (B) Effect of Src inhibitors on cell growth. Cultures were treated as specified in panel B, and cells were counted at the end of the experiment. (C) Effect of PP2 (5 μ M) on the expression of Src and EMT protein markers of 4T1t cells. Protein levels were determined by Western blot analysis. β -actin was used as a control for protein loading. (D) Analysis of Q7/Q9 mRNA expression. Transcript levels were measured by real-time qRT-PCR, normalized to β -actin mRNA levels, and values for PP2-treated cells were compared to untreated cells, which were given an arbitrary value of 1.

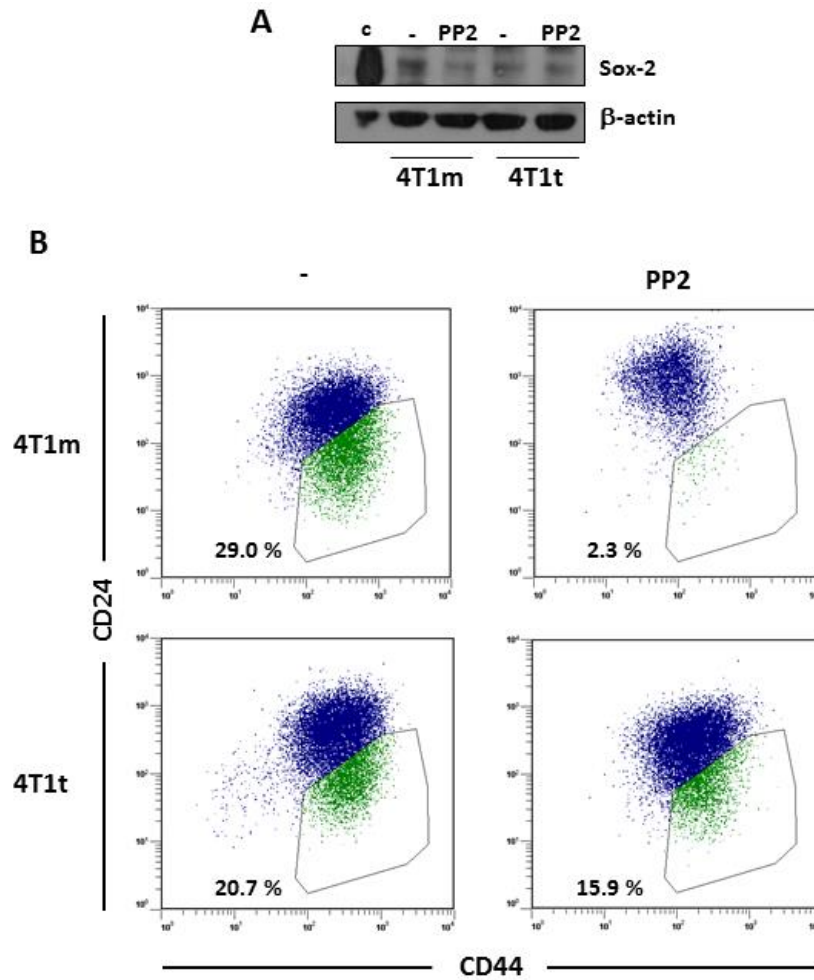


Figure 6. Pharmacological inhibition of Src reduces stemness. (A) Western blot analysis of Sox2 expression in 4T1m and 4T1t cells untreated or treated with PP2. Due to the high background observed in the blot, a positive control with a lysate of 293T cells overexpressing Sox2 (c) was included. β-actin was used as a control for protein loading. (B) Flow cytometry analysis of the cell-surface markers CD44 and CD24 in 4T1m and 4T1t cells untreated or treated with PP2. The percentage of CD44^{high}/CD24^{med/low} cell subpopulation is indicated. A representative experiment out of two is shown.

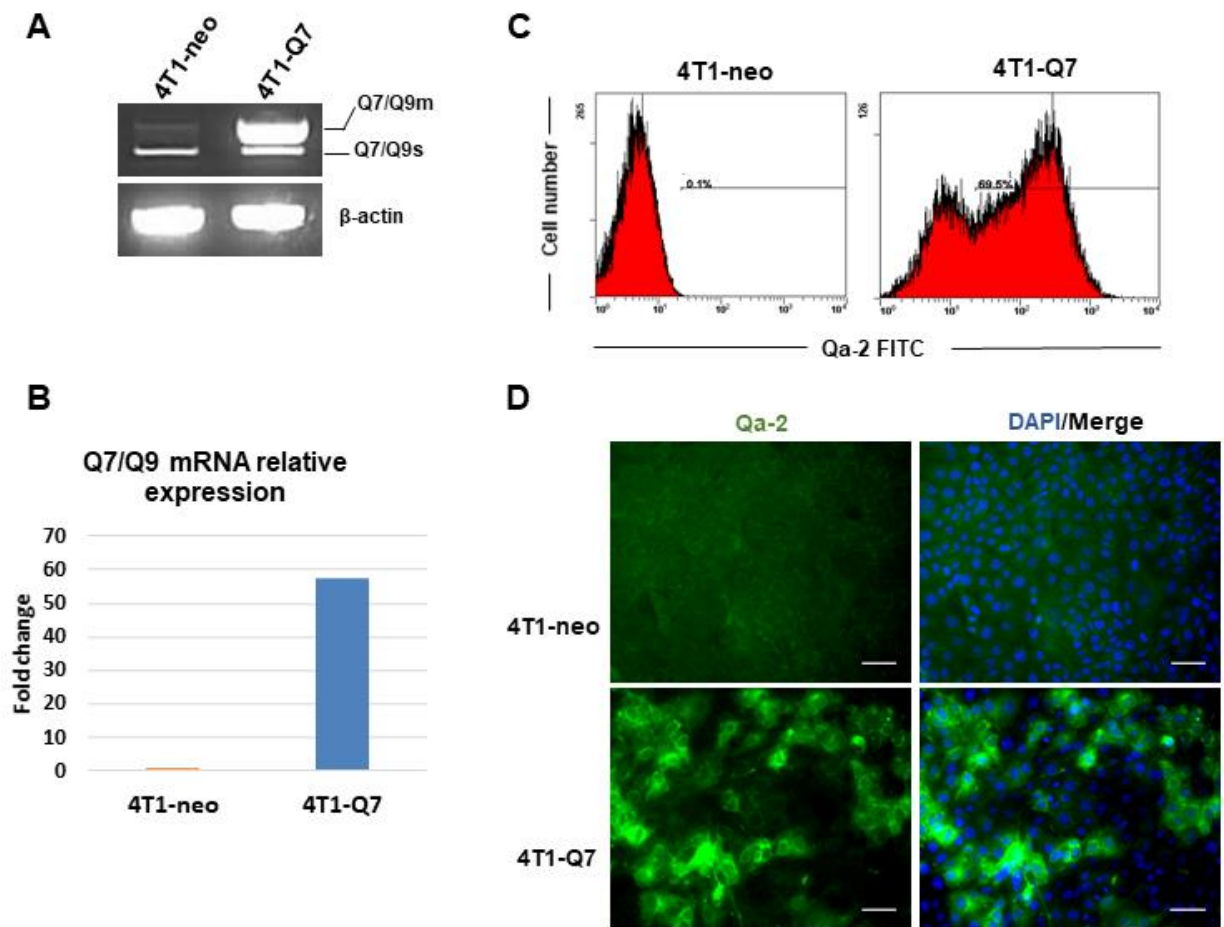


Figure 7. Stable transfection of Q7 cDNA into 4T1 cells. (A) Semiquantitative RT-PCR analysis of Q7 expression. Q7/Q9m, membrane-associated form; Q7/Q9s, soluble form. (B) Analysis of Q7 mRNA expression. Transcript levels were measured by real-time qRT-PCR, normalized to β-actin mRNA levels, and values for 4T1-Q7 were compared to 4T1-neo, which were given an arbitrary value of 1. (C) Analysis of Q7 cell-surface expression by flow cytometry. (D) Immunofluorescence detection of Q7. Nuclei were stained with DAPI. Bars, 100 μm.

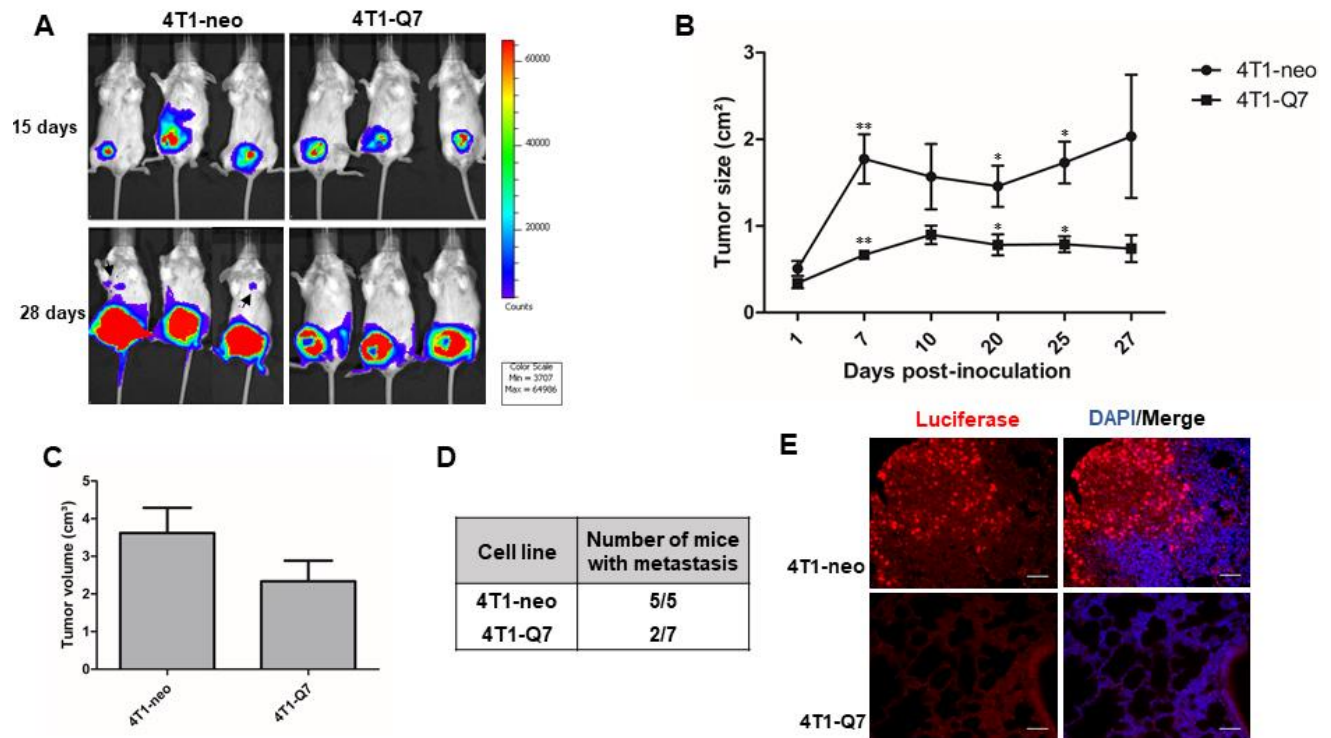


Figure 8. Overexpression of Q7 reduces tumor growth and metastatic potential of 4T1 cells. (A) Representative whole-body bioluminescence images of mice with tumors induced by the indicated cell lines at 15 and 28 days post-injection. Note that 4T1-neo, but not 4T1-Q7 mice show metastatic colonies at 28 days (arrows). (B) Tumor growth was monitored at different post-injection days by measuring the bioluminescence area as indicated in Materials and methods. Asterisks indicates statistically significant differences ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$). (C) Measurement of the volumes of primary tumors at 28 days post-inoculation. n.s., statistically non-significant. (D) Incidence of pulmonary metastases at 28 days post-inoculation. (E) Immunofluorescence detection of luciferase in lungs of mice with mammary tumors induced by 4T1-neo and 4T1-Q7 cells at 28 days post-injection. Nuclei were stained with DAPI. Bars, 100 μ m.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Methods

qRT-PCR

Specific primers for amplification of murine transcription factors and hprt using Power SYBRTM Green Master Mix (ThermoFisher) were as follow:

Zeb1:

5'-GAGCCGCCAGTGAAGGTGATC-3'

5'-GTGAGGCCTCTTACCTGTGTGCT-3'

Sox2:

5'-TAGAGATAGACTCCGGGCGATGA-3'

5'-TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA-3'

Hes1:

5'-TGCCAGCTGATATAATGGAGAA-3'

5'-CCATGATAGGCTTTGATGACTTT-3'

Oct3/4:

5'-TCTTTCCACCAGGCCCCCGGCTC-3'

5'-TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC-3'

Hprt:

5'-TCCTCCTCAGACCGCTTTT-3'

5'-CCTGGTTCATCATCGCTAATC-3'

Proliferation assay

~ 5x10³ cells/well were seeded in a 96-well plate in complete medium in triplicate and grown for 24 h. Proliferation was evaluated using the XTT colorimetric cell proliferation assay kit (ATCC, USA) following the manufacturer's recommendations. Absorbance at 475 nm and 660 nm was measured using a microplate reader, and the relative proliferation rate calculated by Specific Absorbance as follow: A_{475nm}(Test) – A_{475nm}(Blank) – A_{660nm}(Test).

Zymography

Metalloproteinase (MMP) activity was determined in sera-free media conditioned by 48 h, and evaluated by SDS-PAGE zymograms containing 2% gelatin, as described elsewhere (1).

Isolation of murine splenocytes for Qa-2 flow cytometry analysis

The spleen of a C57Bl/6 mouse was cut into pieces and squeezed with forceps in PBS. Red blood cells were lysed with a buffer containing 8.3 g/L ammonium chloride in 0.01M Tris-HCL pH 7.4, and splenocytes rinsed twice in FACS buffer containing 0.5% BSA in PBS. Cells were filtered through a 100 µm mesh strainer, resuspended in FACS buffer, counted and diluted at the desired concentration.

References

1. Toth, M., Sohail, A. & Fridman, R. Assesment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *Methods Mol Biol* 878, 121-135 (2008).

Supplementary figures

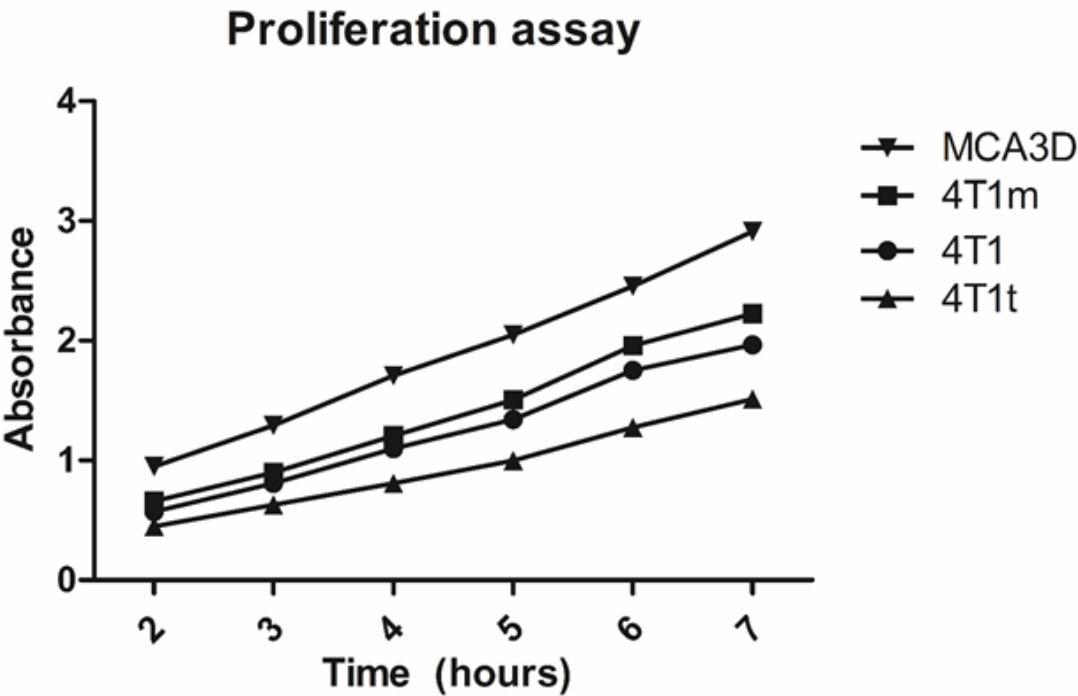


Figure S1. Cell proliferation assays. ~ 5×10^3 cells/well were seeded in a 96-well plate in medium plus serum. After 24 h, cultures were pulsed with XTT for 7 h, and absorbance determined as indicated.

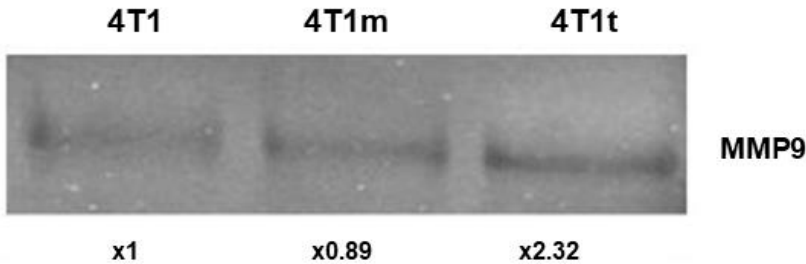


Figure S2. MMP9 activity secreted by the cell lines. Subconfluent cell cultures were conditioned for 48 h by serum-free medium, and gelatinase activity determined as indicated in Supplementary Methods. Values indicated at the bottom are expressed relative to 4T1 cells, in which an arbitrary value of 1 was given.

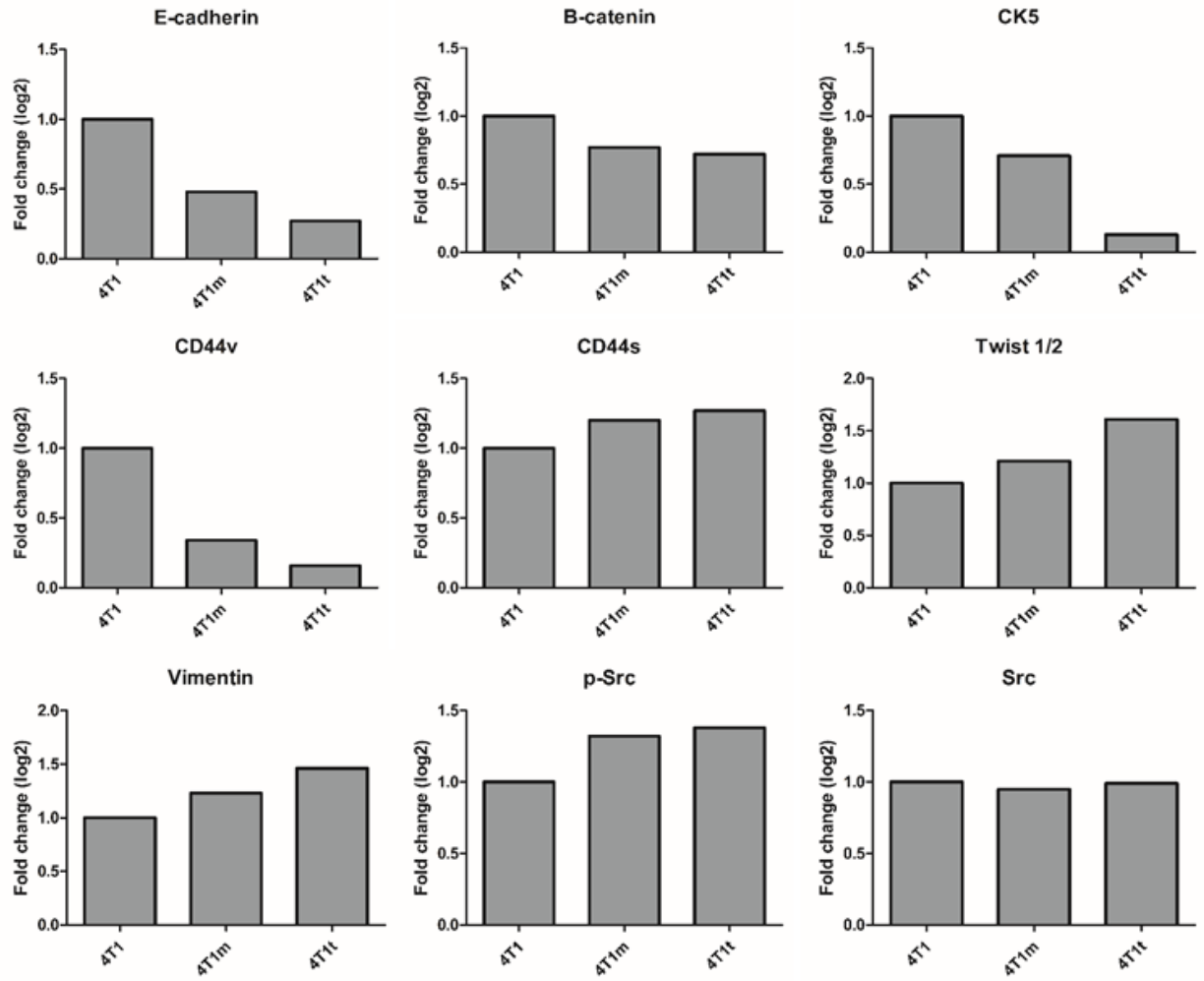


Figure S3. Quantification of EMT protein markers expression changes. The intensity of the bands of the Western blot showed in Fig. 3A were quantified by densitometric analysis, and values expressed relative to 4T1 cells, in which an arbitrary value of 1 was given.

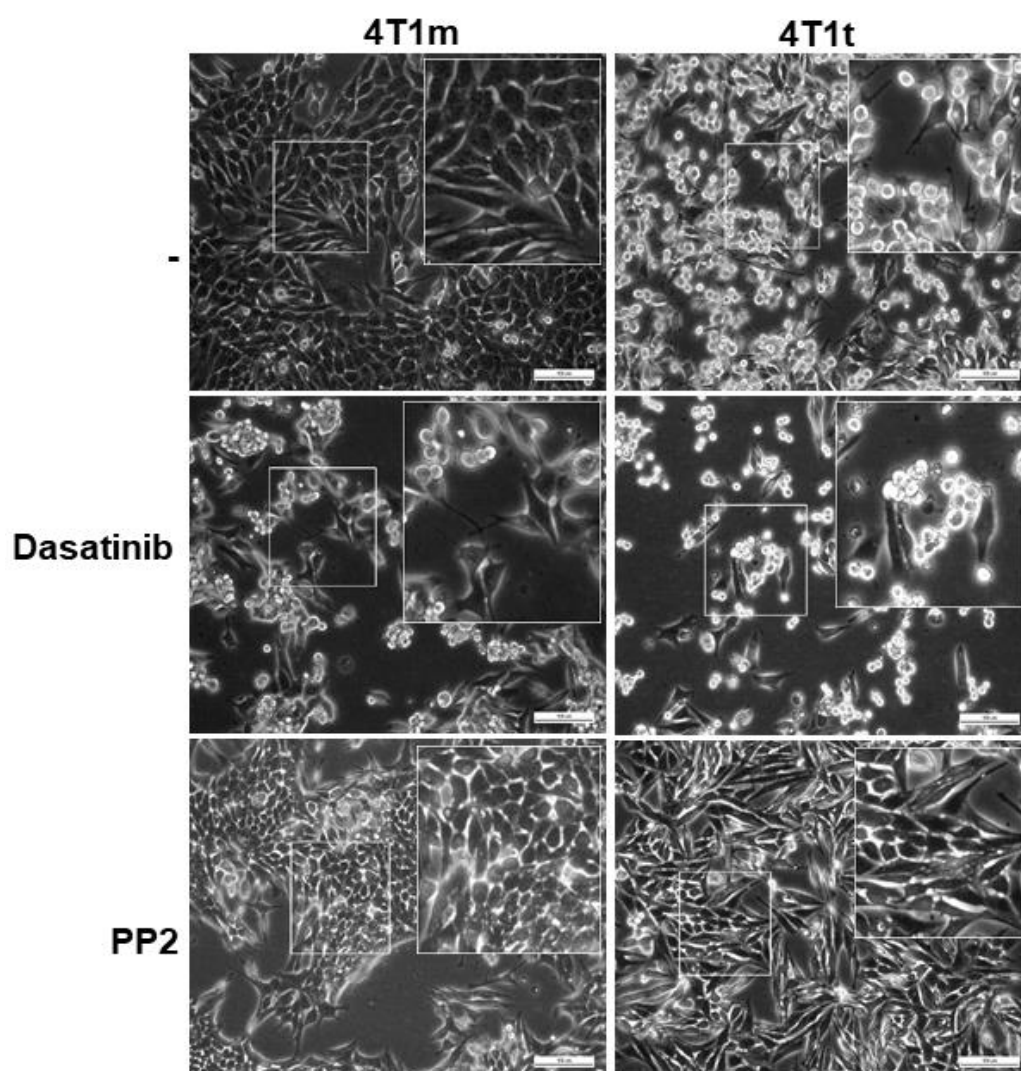


Figure S4. Phase contrast micrographs of 4T1m and 4T1t cells before and after treatment with Src kinase inhibitors. Cells were treated with Dasa (100 nM), PP2 (5 μM), and vehicle for 48 h. Bars, 100 μm .

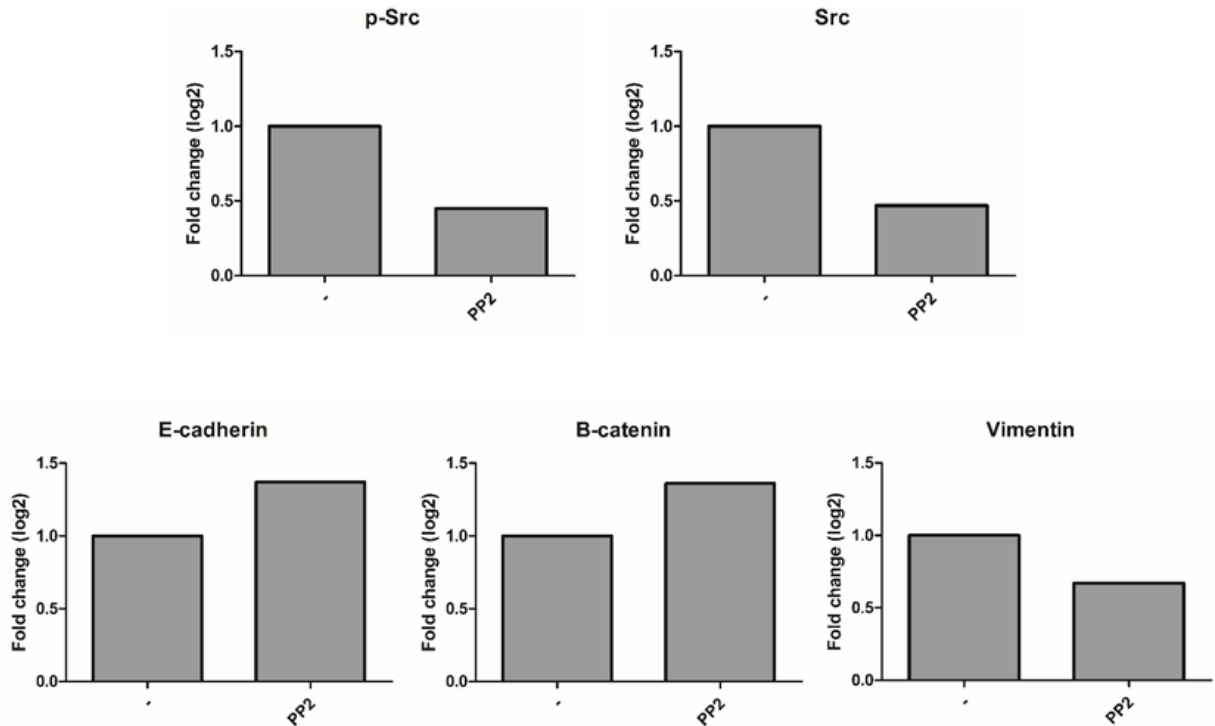


Figure S5. Quantification of Src and EMT protein markers expression changes after 4T1t treatment with PP2. The intensity of the bands of the Western blot showed in Fig. 5C were quantified by densitometric analysis, and values expressed relative to untreated cells, in which an arbitrary value of 1 was given.

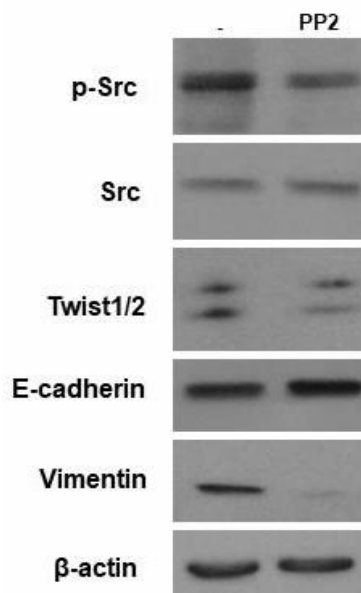


Figure S6. Effect of PP2 on the expression of EMT protein markers in 4T1m cells. Protein levels were determined by Western blot analysis. β -actin was used as a control for protein loading.

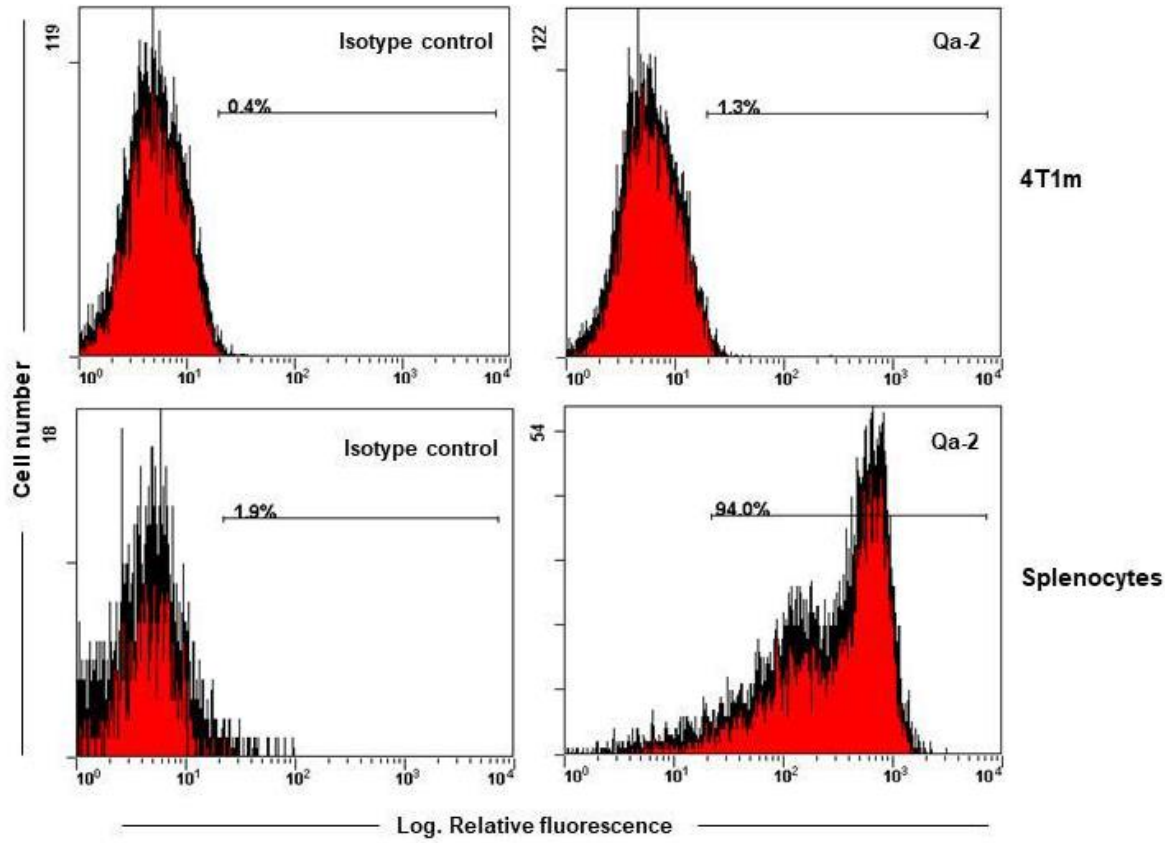


Figure S7. Isotype control for flow cytometry analysis of Qa-2 cell-surface expression. 4T1m cells and splenocytes were stained with IgG2a kappa isotype control and anti-Qa-2 antibody.



CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os modelos animais representam uma importante ferramenta para o estudo das mais diversas patologias, dentre elas o câncer de mama. Eles permitem o estudo aprofundado das etiologias, progressão, bases moleculares e genéticas, bem como a avaliação das diferentes terapêuticas (Alvarado, Faustino-Rocha et al. 2017). Os modelos aqui utilizados vêm sendo extensivamente estudados e propostos na utilização de estudos da progressão neoplásica e resposta imune tumoral em neoplasias mamárias experimentais (Pulaski and Ostrand-Rosenberg 2001; Kaur, Nagaraja et al. 2012; Ferrari-Amorotti, Chiodoni et al. 2014; Kabel, Omar et al. 2015; Frajacomo, de Souza Padilha et al. 2016).

O tumor sólido de Ehrlich e o tumor de células 4T1, embora sejam neoplasias mamárias murinas, inicialmente identificadas espontaneamente, são provenientes de cepas murinas distintas, e obviamente apresentam características díspares. O tumor sólido de Ehrlich é um carcinoma mamário proveniente de animais Swiss/Ha, portanto, não isogênico (Nielsen 1967), considerado originalmente como hiperploide, com alta capacidade transplantável, rápida proliferação, curto tempo para expansão e não apresenta antígenos de transplante específicos ao tumor, o que permite que seja transplantado em diferentes cepas murinas (Ozaslan et al. 2011). Outras características importantes deste tumor são, sua alta taxa de necrose associada a intensa inflamação e sua capacidade de metastatizar apenas regionalmente, seja em sua forma ascítica ou sua forma sólida (Miranda-Vilela, Portilho et al. 2011; Batista, da Silva et al. 2013).

Já o tumor de células 4T1, também um carcinoma mamário, foi originalmente isolado de um animal Balb/c, portanto, isogênico, altamente tumorigênico e invasivo, com capacidade de metastatizar espontaneamente para sítios distantes. Este tumor pode ainda ser transplantado de maneira ortotópica na região mamária, mimetizando melhor o microambiente tumoral original, incluso com maior ativação de alguns fatores de transcrição com NF- κ B (Pulaski and Ostrand-Rosenberg 2001; Takahashi, Nagai et al. 2015). Diferentemente do tumor de Ehrlich, o tumor de células 4T1 é mais imunogênico e não sofreu perda das moléculas de MHC de classe I (Lechner, Karimi et al. 2013).

O presente trabalho caracterizou pela primeira vez, o padrão de expressão de Qa-2 em dois modelos distintos de neoplasias mamárias experimentais. Enquanto a expressão de Qa-2 nas células neoplásicas e no infiltrado inflamatório peritumoral em animais com tumor sólido de Ehrlich sofre um aumento no estágio intermediário de desenvolvimento tumoral, em animais com tumor de células 4T1 foi observada redução progressiva da expressão de Qa-2 em células neoplásicas, do infiltrado inflamatório peritumoral e expressão de Qa-2 solúvel. As diferenças no nível de indiferenciação celular e na imunogenicidade descrita para cada modelo podem estar diretamente relacionadas aos diferentes padrões de expressão de Qa-2 observados. Isto porque, tais eventos são fortemente associados aos eventos da EMT, os quais promovem a perda da expressão de Qa-2, como observado neste trabalho e discutido posteriormente.

Outro fato interessante observado em relação ao padrão de expressão de Qa-2, foi o discreto aumento nos níveis de expressão de Qa-2 solúvel em animais com tumor sólido de Ehrlich. Tal evento pode ser consequência do corte das isoformas transmembranares (*shedding*), feito pelas MMPs, resultando em aumento tardio de Qa-2 solúvel associado a redução da expressão de isoformas transmembranares. Outra possibilidade seria, a mudança no padrão de expressão de Qa-2 de acordo com o estágio de desenvolvimento tumoral, onde, em estágios tardios, as isoformas transmembranares deixariam de serem expressas, tornando-se predominantes as isoformas solúveis.

A avaliação do perfil linfocítico T infiltrado no tumor sólido de Ehrlich, sinaliza uma possível regulação de Qa-2 sobre o infiltrado inflamatório peritumoral. A correlação positiva observada entre a expressão de Qa-2 e a infiltração de linfócitos T CD3⁺ possui duas possíveis origens: (1) o aumento de Qa-2 torna o tumor mais imunogênico recrutando indiretamente mais linfócitos para o sítio tumoral; ou (2) sendo o Qa-2 um marcador de linfócitos T maduros, essa correlação refletiria apenas a causalidade, se aumenta linfócito maduros no sítio tumoral, consequentemente aumentaria a expressão de Qa-2.

Ainda, foi observada correlação positiva entre a infiltração de linfócitos T CD3⁺ e o aumento do tamanho tumoral, enquanto CD4⁺ se correlacionou de maneira negativa com a mesma variável. Também, uma correlação negativa foi observada entre os dois marcadores. Tais

achados refletem que o crescimento tumoral incita maior infiltração de linfócitos T e que, ao se desenvolver, a resposta T auxiliar (CD4+) não apresenta efeitos em seu avanço. Dessa forma, a correlação negativa observada entre o marcador pan de linfócitos T (CD3+) e o marcador de linfócitos auxiliares (CD4+), não necessariamente representam grandezas inversamente proporcionais, mas sim, demonstra um desvio do padrão de resposta imune tumoral.

A variação observada no perfil linfocítico infiltrado no tumor sólido de Ehrlich, nos remete a uma resposta inflamatória inicial indefinida, ou seja, com presença de Foxp3+, CD8+ e CD4+. Ao tempo médio de desenvolvimento tumoral (7º dia), a resposta inflamatória apresenta pequena redução de linfócitos T CD4+, mas, os linfócitos T CD4+ restantes tendem a ter um perfil regulatório, já que, ocorre um incremento de linfócitos Foxp3+. Nesse estágio, ocorre simultaneamente um aumento da expressão de Qa-2 em células neoplásicas e do infiltrado peritumoral, demonstrando que, nesta fase a expressão de Qa-2 se faz necessária de maneira a tornar o tumor mais imunogênico e atrair a resposta imune para sua eliminação. Já ao estágio de desenvolvimento tumoral mais tardio (14º dia), os achados indicam uma redução da infiltração de linfócitos T CD4+, bem como Foxp3+, prevalecendo a resposta citotóxica CD8+. Ou seja, neste estágio tardio, a resposta imune contra o tumor, apresenta-se efetivamente formada, e a expressão de Qa-2 torna-se desnecessária, sendo perdida.

Já os experimentos com 4T1, demonstraram que a EMT sofrida pelas células derivadas, bem como, a aquisição de características de pluripotência celular, podem ser as causas da redução da expressão de Qa-2. Esses achados foram ainda confirmados através do experimento de inibição das proteínas da família Src quinases, as quais estão diretamente relacionadas a EMT e CSC (Sanchez-Bailon, Calcabrini et al. 2012; Patel, Sabbineni et al. 2016; Tan, Kwek et al. 2016). A inibição dessas proteínas iniciou o estado de reversão da EMT e consequentemente observamos discreto retorno da expressão de Qa-2. Eventos epigenéticos podem estar relacionados ao silenciamento da expressão de Qa-2 durante o processo de EMT, tais como, metilação do promotor ou mesmo a expressão de miRNAs. Outros eventos, como a perda da expressão do transportador de peptídeo TAP-2, tem sido descrita como causa da perda da expressão de Qa-2 em melanomas (Chiang, Henson et al. 2003), o qual também poderia estar relacionado a perda da expressão de Qa-2 nestes modelos.

Ainda, já foi demonstrado que Qa-2 participa na indução da proliferação de células embrionárias auxiliando na sua implantação (McElhinny, Kadow et al. 1998) bem como na proliferação de linfócitos T (Cook, Leone et al. 1992). Esta ativação da proliferação de linfócitos T ativada por Qa-2, é dependente de Fyn, um dos membros da família Src (De Fazio and Warner 2007). Nossos experimentos de inibição destas proteínas da família Src demonstraram uma relação entre elas e a expressão de Qa-2, a qual ainda não está completamente esclarecida. Acredita-se que a indução da proliferação celular realizada por Qa-2 e mediada por Fyn, poderia ocorrer também nas células neoplásicas, ou seja, Qa-2 estaria atuando de maneira ambígua, tornando o tumor mais imunogênico e ao mesmo tempo, favorecendo sua proliferação. Já os resultados obtidos após a inibição destas proteínas da família Src, onde resultou na restituição da expressão de Qa-2, nos levaram a propor algumas hipóteses que busquem explicar a relação existente entre Qa-2 e as proteínas desta família: (1) os membros da família Src estariam exercendo regulação direta sobre a expressão de Qa-2, assim como Qa-2 estaria regulando diretamente a expressão de Src ou, (2) a relação entre Src e Qa-2 seria indireta, ou seja, tratam-se de dois eventos independentes, onde se relacionam apenas por estarem associados a EMT. Desta forma, Qa-2 não estaria regulando Src, e Src não estaria regulando Qa-2, mas sim, ambos sofrem regulação por outros fatores relacionados a EMT e ao final, aparentam-se inversamente proporcionais.

Os dados aqui apresentados reforçam a teoria de que o papel do homólogo murino do HLA-G, o Qa-2, pode ser o oposto nestes modelos. Embora o Qa-2 seja descrito com funções semelhantes ao HLA-G em determinadas situações, (Tian, Xu et al. 1992; Chiang, Henson et al. 2002; Comiskey, Goldstein et al. 2003), especialmente em neoplasias, ele tem sido descrito com papel oposto ao HLA-G (Chiang and Stroynowski 2004; Chiang and Stroynowski 2006). Esses achados nos levam a presumir que o Qa-2 atua em neoplasias de maneira oposta ao HLA-G devido a sua alta capacidade de apresentar antígenos. O Qa-2 torna o tumor mais imunogênico levando a sua eliminação, fato não relatado sobre o HLA-G (He, Tabaczewski et al. 2001).

Por fim, embora os experimentos com o tumor sólido de Ehrlich e de células 4T1 apresentem padrões de expressão de Qa-2 diferentes, ambos experimentos demonstram que a expressão de Qa-2 está relacionada a menor agressividade tumoral por tornar o tumor mais imunogênico.

Visto que, no modelo de tumor de Ehrlich a expressão de Qa-2 se correlacionou com a infiltração de linfócitos T e no modelo com células 4T1, a superexpressão de Qa-2 propiciou menor crescimento tumoral e redução da ocorrência de metástases.



CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que, nos modelos murinos de tumor sólido de Ehrlich e no tumor de células 4T1, o Qa-2 desempenha um papel oposto ao descrito para o HLA-G, sendo relacionado a menor agressividade tumoral e modulação do infiltrado inflamatório peritumoral.

Ainda, os níveis de expressão de Qa-2 tecidual em animais com tumor sólido de Ehrlich sofre aumento ao tempo médio pós-inoculação, retornando posteriormente aos seus níveis iniciais. Já a expressão de Qa-2 solúvel, sofre aumento em estágios de desenvolvimento tumoral tardios. Além disso, Qa-2 mostrou-se capaz de editar a resposta imune tumoral, alterando o perfil de linfócitos infiltrantes no tumor.

Em animais com tumor de células 4T1, as expressões teciduais e séricas de Qa-2 sofreram redução em estágios mais avançados de desenvolvimento tumoral.

A redução da expressão de Qa-2 mostrou-se inversamente associada as características de EMT e CSC, observadas nas linhas celulares derivadas, 4T1m e 4T1t. Além disso, a utilização de inibidores de quinases Src *in vitro*, mostrou-se capaz de reverter a expressão de marcadores EMT e restabelecer a expressão de Qa-2.

A superexpressão de Qa-2 em células 4T1, promove redução do crescimento tumoral e do surgimento de metástases pulmonares.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abell, A. N. and G. L. Johnson (2014). "Implications of Mesenchymal Cells in Cancer Stem Cell Populations: Relevance to EMT." Curr Pathobiol Rep 2(1): 21-26.
- Alegre, E., R. Rizzo, et al. (2014). "Some basic aspects of HLA-G biology." J Immunol Res 2014: 657625.
- Alvarado, A., A. I. Faustino-Rocha, et al. (2017). "Experimental mammary carcinogenesis - Rat models." Life Sci 173: 116-134.
- Amiot, L., S. Ferrone, et al. (2011). "Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention?" Cell Mol Life Sci 68(3): 417-431.
- Amodio, G., R. Sales de Albuquerque, et al. (2014). "New insights into HLA-G mediated tolerance." Tissue Antigens 84(3): 255-263.
- Aumsuwan, P., S. I. Khan, et al. (2016). "Gene expression profiling and pathway analysis data in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines treated with dioscin." Data Brief 8: 272-279.
- Batista, A. P., T. G. da Silva, et al. (2013). "Melatonin effect on the ultrastructure of Ehrlich ascites tumor cells, lifetime and histopathology in swiss mice." Life Sci.
- Bottoni, P., M. A. Isgro, et al. (2016). "The epithelial-mesenchymal transition in cancer: a potential critical topic for translational proteomic research." Expert Rev Proteomics 13(1): 115-133.
- Bult, C. J., D. M. Krupke, et al. (2015). "Mouse Tumor Biology (MTB): a database of mouse models for human cancer." Nucleic Acids Res 43(Database issue): D818-824.
- Calixto-Campos, C., A. C. Zarpelon, et al. (2013). "The Ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: a novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening." Biomed Res Int 2013: 624815.
- Cannito, S., Novo E., et al. (2008). "Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells." Carcinogenesis 29(12):2267-78.

- Cao, W., C. A. Brenner, et al. (1999). "Search for a human homologue of the mouse Ped gene." Mol Hum Reprod 5(6): 541-547.
- Carosella, E. D., N. Rouas-Freiss, et al. (2015). "HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule." Adv Immunol 127: 33-144.
- Castano, Z., K. Tracy, et al. (2011). "The tumor macroenvironment and systemic regulation of breast cancer progression." Int J Dev Biol 55(7-9): 889-897.
- Chen, L., D. L. Gibbons, et al. (2014). "Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression." Nat Commun 5: 5241.
- Chen, X. H., Z. C. Liu, et al. (2015). "TGF-beta and EGF induced HLA-I downregulation is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) through upregulation of snail in prostate cancer cells." Mol Immunol 65(1): 34-42.
- Cheon, D. J. and S. Orsulic (2011). "Mouse models of cancer." Annu Rev Pathol 6: 95-119.
- Chiang, E. Y., M. Henson, et al. (2002). "The nonclassical major histocompatibility complex molecule Qa-2 protects tumor cells from NK cell- and lymphokine-activated killer cell-mediated cytotoxicity." J Immunol 168(5): 2200-2211.
- Chiang, E. Y., M. Henson, et al. (2003). "Correction of defects responsible for impaired Qa-2 class Ib MHC expression on melanoma cells protects mice from tumor growth." J Immunol 170(9): 4515-4523.
- Chiang, E. Y. and I. Stroynowski (2004). "A nonclassical MHC class I molecule restricts CTL-mediated rejection of a syngeneic melanoma tumor." J Immunol 173(7): 4394-4401.
- Chiang, E. Y. and I. Stroynowski (2006). "The role of structurally conserved class I MHC in tumor rejection: contribution of the Q8 locus." J Immunol 177(4): 2123-2130.
- Chockley, P. J. and V. G. Keshamouni (2016). "Immunological Consequences of Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Progression." J Immunol 197(3): 691-698.

- Cichon, M. A., A. C. Degnim, et al. (2010). "Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia 15(4): 389-397.
- Comiskey, M., C. Y. Goldstein, et al. (2003). "Evidence that HLA-G is the functional homolog of mouse Qa-2, the Ped gene product." Hum Immunol 64(11): 999-1004.
- Cook, R. G., B. Leone, et al. (1992). "Characterization of T cell proliferative responses induced by anti-Qa-2 monoclonal antibodies." Cell Immunol 144(2): 367-381.
- Curigliano, G., C. Criscitiello, et al. (2013). "Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G)." Clin Cancer Res 19(20): 5564-5571.
- Dagli, M. L. (1989). "Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental." , Fac. de Med. Veter. e Zootec. da USP São Paulo, 148pp.
- Damiano V., Brisotto G. et al. (2011). "Epigenetic Silencing of miR-200c in Breast Cancer Is Associated with Aggressiveness and Is Modulated by ZEB1." Genes, Chromosomes & Cancer 56(12):147-158.
- Das Roy, L., Pathangey L. B., et al. (2009) " Breast cancer-associated metastasis is significantly increased in a model of autoimmune arthritis." Breast Cancer 11(4): R56
- De Fazio, S. R. and C. M. Warner (2007). "Activation of T cells by cross-linking Qa-2, the ped gene product, requires Fyn." Am J Reprod Immunol 58(4): 315-324.
- de Kruijf, E. M., A. Sajet, et al. (2010). "HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients." J Immunol 185(12): 7452-7459.
- Derynck, R., B. P. Muthusamy, et al. (2014). "Signaling pathway cooperation in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition." Curr Opin Cell Biol 31: 56-66.
- Dranoff, G. (2011). "Experimental mouse tumour models: what can be learnt about human cancer immunology?" Nat Rev Immunol 12(1): 61-66.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity 21(2): 137-148.

- Elliott, R. L., X. P. Jiang, et al. (2011). "Human leukocyte antigen G expression in breast cancer: role in immunosuppression." Cancer Biother Radiopharm 26(2): 153-157.
- Eppig, J. T., H. Motenko, et al. (2015). "The International Mouse Strain Resource (IMSR): cataloging worldwide mouse and ES cell line resources." Mamm Genome 26(9-10): 448-455.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, et al. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." Int J Cancer 136(5): E359-386.
- Fernandes, P. D., F. S. Guerra, et al. (2015). "Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development." J Pharmacol Toxicol Methods 71: 83-89.
- Ferrari-Amorotti, G., C. Chiodoni, et al. (2014). "Suppression of invasion and metastasis of triple-negative breast cancer lines by pharmacological or genetic inhibition of slug activity." Neoplasia 16(12): 1047-1058.
- Ferreira, M. A., L. S. Barcelos, et al. (2007). "Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF)." Life Sci 81(3): 210-217.
- Flaherty L.L. The Tla region of the mouse: identification of a new serologically defined locus, Qa-2. Immunogenetics, 1976. 3:533–539
- Flaherty, L., E. Elliott, et al. (1990). "Immunogenetics of the Q and TL regions of the mouse." Crit Rev Immunol 10(2): 131-175.
- Frajacomo, F. T., C. de Souza Padilha, et al. (2016). "Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia." Life Sci 162: 47-53.
- Fulzele, S. V., A. Chatterjee, et al. (2006). "Inhalation delivery and anti-tumor activity of celecoxib in human orthotopic non-small cell lung cancer xenograft model." Pharm Res 23(9): 2094-2106.
- Giraldo, N. A., E. Becht, et al. (2015). "The immune response in cancer: from immunology to pathology to immunotherapy." Virchows Arch 467(2): 127-135.
- Gould, C. M. and S. A. Courtneidge (2014). "Regulation of invadopodia by the tumor microenvironment." Cell Adh Migr 8(3): 226-235.

- Haghi, M., M. A. Hosseinpour Feizi, et al. (2015). "14-bp Insertion/Deletion Polymorphism of the HLA-G gene in Breast Cancer among Women from North Western Iran." Asian Pac J Cancer Prev 16(14): 6155-6158.
- Hahn, A. B. and M. J. Soloski (1989). "Anti-Qa-2-induced T cell activation. The parameters of activation, the definition of mitogenic and nonmitogenic antibodies, and the differential effects on CD4⁺ vs CD8⁺ T cells." J Immunol 143(2): 407-413.
- Ham, M. and A. Moon (2013). "Inflammatory and microenvironmental factors involved in breast cancer progression." Arch Pharm Res 36(12): 1419-1431.
- He, X., D. D. Dong, et al. (2010). "HLA-G expression in human breast cancer: implications for diagnosis and prognosis, and effect on allocytotoxic lymphocyte response after hormone treatment in vitro." Ann Surg Oncol 17(5): 1459-1469.
- He, X., P. Tabaczewski, et al. (2001). "Promiscuous antigen presentation by the nonclassical MHC Ib Qa-2 is enabled by a shallow, hydrophobic groove and self-stabilized peptide conformation." Structure 9(12): 1213-1224.
- Ho, B. Y., C. H. Lin, et al. (2012). "Silibinin and Paclitaxel Cotreatment Significantly Suppress the Activity and Lung Metastasis of Triple Negative 4T1 Mammary Tumor Cell in Mice." J Tradit Complement Med 2(4): 301-311.
- Huang, P. H., P. J. Lu, et al. (2016). "TGFbeta promotes mesenchymal phenotype of pancreatic cancer cells, in part, through epigenetic activation of VAV1." Oncogene.
- Ishiwata, T. (2016). "Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Novel therapeutic targets for cancer." Pathol Int 66(11): 601-608.
- Islam, F., B. Qiao, et al. (2015). "Cancer stem cell: fundamental experimental pathological concepts and updates." Exp Mol Pathol 98(2): 184-191.
- Jaganathan, S. K., D. Mondhe, et al. (2010). "Effect of honey and eugenol on Ehrlich ascites and solid carcinoma." J Biomed Biotechnol 2010: 989163.
- Jeong, S., S. Park, et al. (2014). "Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients." PLoS One 9(5): e98284.

- Kabel, A. M., M. S. Omar, et al. (2015). "Effect of metformin and adriamycin on transplantable tumor model." Tissue Cell 47(5): 498-505.
- Kano, A. (2015). "Tumor cell secretion of soluble factor(s) for specific immunosuppression." Sci Rep 5: 8913.
- Kaur, P., G. M. Nagaraja, et al. (2012). "A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease." BMC Cancer 12: 120.
- Killion, J. J., R. Radinsky, et al. (1998). "Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice." Cancer Metastasis Rev 17(3): 279-284.
- Kim, R., M. Emi, et al. (2007). "Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape." Immunology 121(1): 1-14.
- Kim, S. S., L. Cao, et al. (2004). "Uterus hyperplasia and increased carcinogen-induced tumorigenesis in mice carrying a targeted mutation of the Chk2 phosphorylation site in Brca1." Mol Cell Biol 24(21): 9498-9507.
- Konig, L., S. Kasimir-Bauer, et al. (2016). "The prognostic impact of soluble and vesicular HLA-G and its relationship to circulating tumor cells in neoadjuvant treated breast cancer patients." Hum Immunol 77(9): 791-799.
- Lanari, C., C. A. Lamb, et al. (2009). "The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer." Endocr Relat Cancer 16(2): 333-350.
- Lang, J. E., J. S. Wechsler, et al. (2015). "Molecular markers for breast cancer diagnosis, prognosis and targeted therapy." J Surg Oncol 111(1): 81-90.
- Lechner, M. G., S. S. Karimi, et al. (2013). "Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy." J Immunother 36(9): 477-489.
- Lee, M., B. Choi, et al. (2010). "The role of Qa-2, the functional homolog of HLA-G, in a Behcet's disease-like mouse model induced by the herpes virus simplex." J Inflamm (Lond) 7: 31.

- Li, L. and W. Li (2015). "Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation." Pharmacol Ther 150: 33-46.
- Lin, J., X. Liu, et al. (2015). "Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem-like cells derived from carcinoma cell lines of the cervix uteri." Int J Clin Exp Pathol 8(1): 847-855.
- Liu, D., H. Xiong, et al. (2014). "Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer." Cancer Res 74(18): 5045-5056.
- Loumagne, L., J. Baudhuin, et al. (2014). "In vivo evidence that secretion of HLA-G by immunogenic tumor cells allows their evasion from immunosurveillance." Int J Cancer 135(9): 2107-2117.
- Lu, N., F. Wan, et al. (2009). "Qa-2 mRNA in peripheral blood mononuclear cells: a potential marker of acute allograft rejection." Med Sci Monit 15(4): BR99-105.
- Lu, N., C. Wang, et al. (2011). "Dynamic expression of Qa-2 during acute graft rejection." Mol Med 17(3-4): 248-255.
- Maccalli, C., A. Volonte, et al. (2014). "Immunology of cancer stem cells in solid tumours. A review." Eur J Cancer 50(3): 649-655.
- Manning, H. C., J. R. Buck, et al. (2016). "Mouse Models of Breast Cancer: Platforms for Discovering Precision Imaging Diagnostics and Future Cancer Medicine." J Nucl Med 57 Suppl 1: 60S-68S.
- Mao, Y., Q. Qu, et al. (2014). "The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis." PLoS One 9(12): e115103.
- Maria de Souza, C., L. Fonseca de Carvalho, et al. (2012). "Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice." Biomed Pharmacother 66(7): 491-498.
- McElhinny, A. S., N. Kadow, et al. (1998). "The expression pattern of the Qa-2 antigen in mouse preimplantation embryos and its correlation with the Ped gene phenotype." Mol Hum Reprod 4(10): 966-971.

- Miranda-Vilela, A. L., F. A. Portilho, et al. (2011). "The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumor-bearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations." J Nutr Biochem 22(11): 1091-1098.
- Mittal, D., M. M. Gubin, et al. (2014). "New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape." Curr Opin Immunol 27: 16-25.
- Nielsen, K. (1967). "Chromosome studies in the Ehrlich ascites tumor of the mouse grown in vitro." Hereditas 58(1): 73-85.
- Organização Mundial da Saúde (OMS) (2017) "Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012." [acesso em 20 jan 2017]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- Osman, A. e.-M., M. M. Ahmed, et al. (1993). "Hyperthermic potentiation of cisplatin cytotoxicity on solid Ehrlich carcinoma." Tumori 79(4): 268-272.
- Ostapchuk, E. O., V. Perfi L'eva Y, et al. (2015). "Content of HLA-G(+) T Cells in the Peripheral Blood from Healthy Women and Breast Cancer Patients." Bull Exp Biol Med 159(5): 649-651.
- Ottewell, P. D., R. E. Coleman, et al. (2006). "From genetic abnormality to metastases: murine models of breast cancer and their use in the development of anticancer therapies." Breast Cancer Res Treat 96(2): 101-113.
- Otvos, B., D. J. Silver, et al. (2016). "Cancer Stem Cell-Secreted Macrophage Migration Inhibitory Factor Stimulates Myeloid Derived Suppressor Cell Function and Facilitates Glioblastoma Immune Evasion." Stem Cells 34(8): 2026-2039.
- Ozaslan, M., Karagoz, I. D., et al. (2011). " Ehrlich ascites carcinoma." African Journal of Biotechnology 10(13):2375-2378.
- Patel, A., H. Sabbineni, et al. (2016). "Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis." Life Sci 157: 52-61.
- Plaks, V., N. Kong, et al. (2015). "The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells?" Cell Stem Cell 16(3): 225-238.

Plaks, V., C. D. Koopman, et al. (2013). "Cancer. Circulating tumor cells." Science 341(6151): 1186-1188.

Poussier, P., T. Ning, et al. (2002). "A unique subset of self-specific intrainestinal T cells maintains gut integrity." J Exp Med 195(11): 1491-1497.

Pulaski, B. A. and S. Ostrand-Rosenberg (2001). "Mouse 4T1 breast tumor model." Curr Protoc Immunol Chapter 20: Unit 20 22.

Qiao, A., F. Gu, et al. (2016). "Breast cancer-associated fibroblasts: their roles in tumor initiation, progression and clinical applications." Front Med 10(1): 33-40.

Reeves, E. and E. James (2017). "Antigen processing and immune regulation in the response to tumours." Immunology 150(1): 16-24.

Rossi, R. E., M. Pericleous, et al. (2014). "The role of dietary factors in prevention and progression of breast cancer." Anticancer Res 34(12): 6861-6875.

Rotzschke, O., K. Falk, et al. (1993). "Qa-2 molecules are peptide receptors of higher stringency than ordinary class I molecules." Nature 361(6413): 642-644.

Sanchez-Bailon, M. P., A. Calcabrini, et al. (2012). "Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells." Cell Signal 24(6): 1276-1286.

Sato, F., S. Saji, et al. (2016). "Genomic tumor evolution of breast cancer." Breast Cancer 23(1): 4-11.

Silva, I. D., Y. C. Muniz, et al. (2013). "HLA-G 3'UTR polymorphisms in high grade and invasive cervico-vaginal cancer." Hum Immunol 74(4): 452-458.

Silva, V. L., D. Ferreira, et al. (2016). "Selection of Novel Peptides Homing the 4T1 CELL Line: Exploring Alternative Targets for Triple Negative Breast Cancer." PLoS One 11(8): e0161290.

Singh, M., I. Ramos, et al. (2013). "Curcumin improves the therapeutic efficacy of Listeria(at)-Mage-b vaccine in correlation with improved T-cell responses in blood of a triple-negative breast cancer model 4T1." Cancer Med 2(4): 571-582.

- Steiner, J., J. Davis, et al. (2014). "Dose-dependent benefits of quercetin on tumorigenesis in the C3(1)/SV40Tag transgenic mouse model of breast cancer." Cancer Biol Ther 15(11): 1456-1467.
- Stroynowski, I. and P. Tabaczewski (1996). "Multiple products of class Ib Qa-2 genes which ones are functional?" Res Immunol 147(5): 290-301.
- Takahashi, K., N. Nagai, et al. (2015). "Mammary tissue microenvironment determines T cell-dependent breast cancer-associated inflammation." Cancer Sci 106(7): 867-874.
- Tan, B. S., J. Kwek, et al. (2016). "Src Family Kinases and p38 Mitogen-Activated Protein Kinases Regulate Pluripotent Cell Differentiation in Culture." PLoS One 11(10): e0163244.
- Teng, M. W., J. Galon, et al. (2015). "From mice to humans: developments in cancer immunoediting." J Clin Invest 125(9): 3338-3346.
- Thakur, R., R. Trivedi, et al. (2015). "Inhibition of STAT3, FAK and Src mediated signaling reduces cancer stem cell load, tumorigenic potential and metastasis in breast cancer." Sci Rep 5: 10194.
- Tian, Z., Y. Xu, et al. (1992). "Removal of Qa-2 antigen alters the Ped gene phenotype of preimplantation mouse embryos." Biol Reprod 47(2): 271-276.
- Torre, L. A., R. L. Siegel, et al. (2016). "Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 25(1): 16-27.
- Toth, M., A. Sohail, et al. (2012). "Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography." Methods Mol Biol 878: 121-135.
- Trufelli, D. M., Miranda, V. C., Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público." Rev Assoc Med Bras 54(1): 72-6
- Ulker, N., K. D. Lewis, et al. (1990). "Activated T cells transcribe an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of Qa-2 antigen." EMBO J 9(12): 3839-3847.
- Ungchusri, T., E. Y. Chiang, et al. (2001). "Widespread expression of the nonclassical class I Qa-2 antigens in hemopoietic and nonhemopoietic cells." Immunogenetics 53(6): 455-467.

- Ungefroren, H., S. Sebens, et al. (2011). "Differential roles of Src in transforming growth factor- α regulation of growth arrest, epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells." Int J Oncol 38(3): 797-805.
- Urosevic, M. and R. Dummer (2008). "Human leukocyte antigen-G and cancer immunoediting." Cancer Res 68(3): 627-630.
- Vallejo, C. G., A. Cruz-Bermudez, et al. (2013). "Evaluation of mitochondrial function and metabolic reprogramming during tumor progression in a cell model of skin carcinogenesis." Biochimie 95(6): 1171-1176.
- Vesely, M. D. and R. D. Schreiber (2013). "Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy." Ann N Y Acad Sci 1284: 1-5.
- Vlashi, E. and F. Pajonk (2015). "Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy." Semin Cancer Biol 31: 28-35.
- Wang, F., Shen, Y., et al. (2014). "Syngeneic transplantation of newborn splenocytes in a murine model of neonatal ischemia-reperfusion brain injury." J Matern Fetal Neonatal Med; 28(7): 842–847
- Weidle, U. H., F. Birzele, et al. (2017). "The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis." Cancer Genomics Proteomics 14(1): 1-15.
- Weiss, E. H., L. Golden, et al. (1984). "Organization and evolution of the class I gene family in the major histocompatibility complex of the C57BL/10 mouse." Nature 310(5979): 650-655.
- Wiese, D. A., T. Thaiwong, et al. (2013). "Feline mammary basal-like adenocarcinomas: a potential model for human triple-negative breast cancer (TNBC) with basal-like subtype." BMC Cancer 13: 403.
- Wilson, K. E., S. V. Bachawal, et al. (2014). "Multiparametric spectroscopic photoacoustic imaging of breast cancer development in a transgenic mouse model." Theranostics 4(11): 1062-1071.
- Wu, B., X. Cao, et al. (2015). "Epigenetic regulation of E1f5 is associated with epithelial-mesenchymal transition in urothelial cancer." PLoS One 10(1): e0117510.

- Wu, D., I. Kuiaste, et al. (2015). "Rescuing lymphocytes from HLA-G immunosuppressive effects mediated by the tumor microenvironment." Oncotarget 6(35): 37385-37397.
- Wu, L., H. Feng, et al. (1999). "Identification of two major histocompatibility complex class Ib genes, Q7 and Q9, as the Ped gene in the mouse." Biol Reprod 60(5): 1114-1119.
- Yuan, Y., Y. C. Jiang, et al. (2016). "Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review)." Oncol Rep 35(5): 2499-2515.
- Zhang, H., K. Cai, et al. (2014). "MiR-7, inhibited indirectly by lincRNA HOTAIR, directly inhibits SETDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway." Stem Cells 32(11): 2858-2868.
- Zheng, L., B. Zhou, et al. (2014). "A model of spontaneous mouse mammary tumor for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast cancer." Int J Oncol 45(6): 2241-2249.



APÊNDICES

APÊNDICE A
EXPRESSÃO DOS miR-125A E miR-125B EM TUMORES DE
EHRlich E DE CÉLULAS 4T1

Complementando os achados da expressão de Qa-2 em animais apresentando tumores sólidos de Ehrlich e de células 4T1, foi realizada a quantificação relativa da expressão dos miR-125a e miR-125b nos tumores após a eutanásia e exérese tumoral.

Metodologia

Para a quantificação relativa da expressão dos miRNAs, foi realizada a extração de RNA dos tumores através do kit “*mirVana™ miRNA Isolation Kit, with phenol*”, com posterior transcrição reversa e quantificação utilizando-se os ensaios TaqMan mmu-miR-125a (Assay ID: 449) e mmu-miR-125b (Assay ID: 448). O miR-125b não apresentou variação entre as amostras e foi utilizado como controle endógeno da reação (Byrne and Warner 2008). Os resultados foram avaliados pelo método do Ct comparativo e os resultados analisados estatisticamente como descrito no capítulo 3.

Resultados

Em tumores de Ehrlich, após a análise do Ct comparativo, a expressão relativa do miR-125a apresentou-se aumentada no estágio mais avançado do desenvolvimento tumoral. Esta diferença mostrou significativa entre os grupos EHR-7 *versus* EHR-14 (Figura 1; $p=0.04$). As análises de correlações não se mostraram estatisticamente significativas.

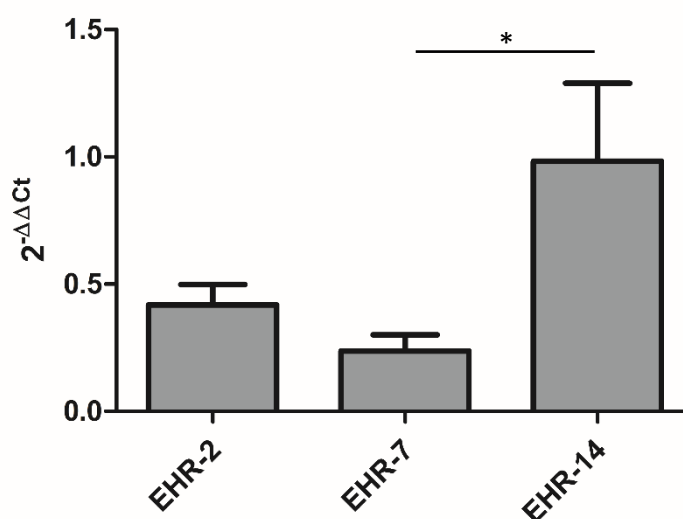


Figura 1: Expressão relativa do miR-125a em tumores sólidos de Ehrlich. A expressão relativa deste miRNA apresentou significativo aumento ao 14º dia após a inoculação tumoral quando comparado ao 7º dia (* $p=0.04$).

O miR-125a é descrito como potencial regulador da expressão de Qa-2 (Byrne and Warner 2008). Nossos resultados mostraram um aumento da expressão do miR-125a no estágio avançado do desenvolvimento do tumor de Ehrlich, que ocorre em sincronia com a redução da expressão de Qa-2. No entanto, nenhuma correlação foi observada.

Tais achados podem indicar que a perda da expressão de Qa-2 ocorrida no estágio tardio de desenvolvimento do tumor de Ehrlich seja ocasionada por eventos epigenéticos como, a expressão do miR-125a.

Já em tumores de células 4T1, a análise pelo método do Ct comparativo evidenciou um aumento da expressão do miR-125a ao 17º dia após a inoculação tumoral, com valor de $p=0.04$ na análise de variância, no entanto, sem diferença entre grupos no *post-test* (Figura 2). A análise de correlação não mostrou nenhuma correlação significativa.

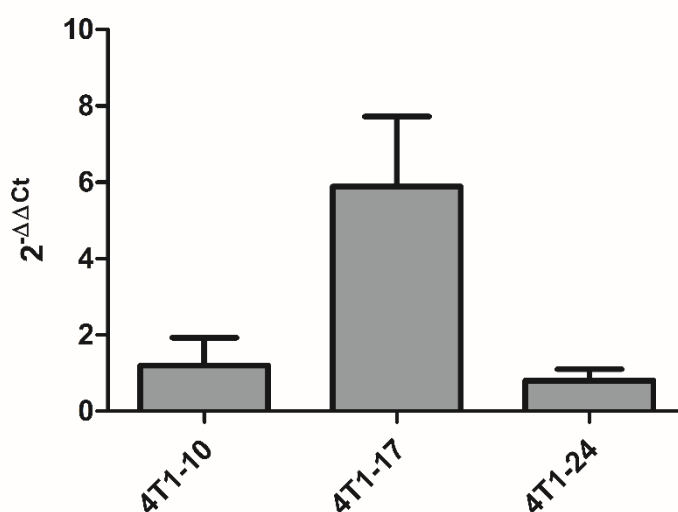


Figura 2: Expressão relativa do miR-125a em tumores de células 4T1. A análise de variância apresentou $p=0.04$, no entanto, sem diferença estatística entre os grupos.

Estes resultados evidenciam a inexistência de regulação da expressão de Qa-2 pelo miR-125a no modelo 4T1, visto que, a expressão de Qa-2 observada reduziu progressivamente não apresentado correlação com a expressão relativa deste miRNA. Esses achados indicam que a redução da expressão de Qa-2 pode ser ocasionada por outros eventos epigenéticos como metilação ou mesmo, regulação por outros miRNAs descritos.

Referência

Byrne, M. J. and C. M. Warner (2008). "MicroRNA expression in preimplantation mouse embryos from Ped gene positive compared to Ped gene negative mice." *J Assist Reprod Genet* 25(5): 205-214.



APÊNDICE B

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DO TUMOR DE CÉLULAS 4T1

É evidente a interação entre tumor e sistema imune, onde, um atuando sobre o outro, podem proporcionar modificações no microambiente tumoral, favorecendo sua progressão e propagação. Sendo assim, nós buscamos avaliar a intensidade, distribuição e padrão celular no infiltrado inflamatório peritumoral e intrapulmonar em animais com tumor de células 4T1, bem como intensidade do infiltrado inflamatório intratumoral, buscando correlações com as demais variáveis.

Metodologia

Para a avaliação do infiltrado inflamatório, amostras de tumores provenientes do experimento de expressão de Qa-2 em animais com tumores de células 4T1, foram processadas e coradas como descrito no capítulo 3. A avaliação consistiu em classificação da intensidade, distribuição e padrão celular predominante como descrito no mesmo capítulo.

Resultados

A distribuição do infiltrado inflamatório peritumoral, mostrou-se sempre difusa, principalmente composta por polimorfonucleares e mononucleares (Figura 1A). A intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral variou entre fraca e moderada, sendo observada maior intensidade ao 17º dia. Diferenças significativas foram observadas entre 4T1-17 e 4T1-24 (Figura 1B; $p=0.01$).

Como este modelo é bem consolidado como modelo de metástases espontâneas, nós realizamos a análise do infiltrado inflamatório intrapulmonar, uma vez que, este é também o principal sítio de metástases para câncer de mama. O infiltrado inflamatório intrapulmonar apresentou-se com distribuição focal no estágio inicial, e posteriormente de maneira difusa. O padrão celular foi predominantemente misto (mononuclear e polimorfonuclear). A intensidade foi principalmente moderada ou intensa e aumentou progressivamente com o decorrer do tempo de inoculação (Figura 1C). A análise estatística dos dados mostrou diferença entre 4T1-10 e 4T1-17 ($p<0.01$) e, entre 4T1-10 e 4T1-24 ($p<0.01$).

Já a intensidade do infiltrado inflamatório intratumoral, foi predominantemente fraca, e não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 1D).

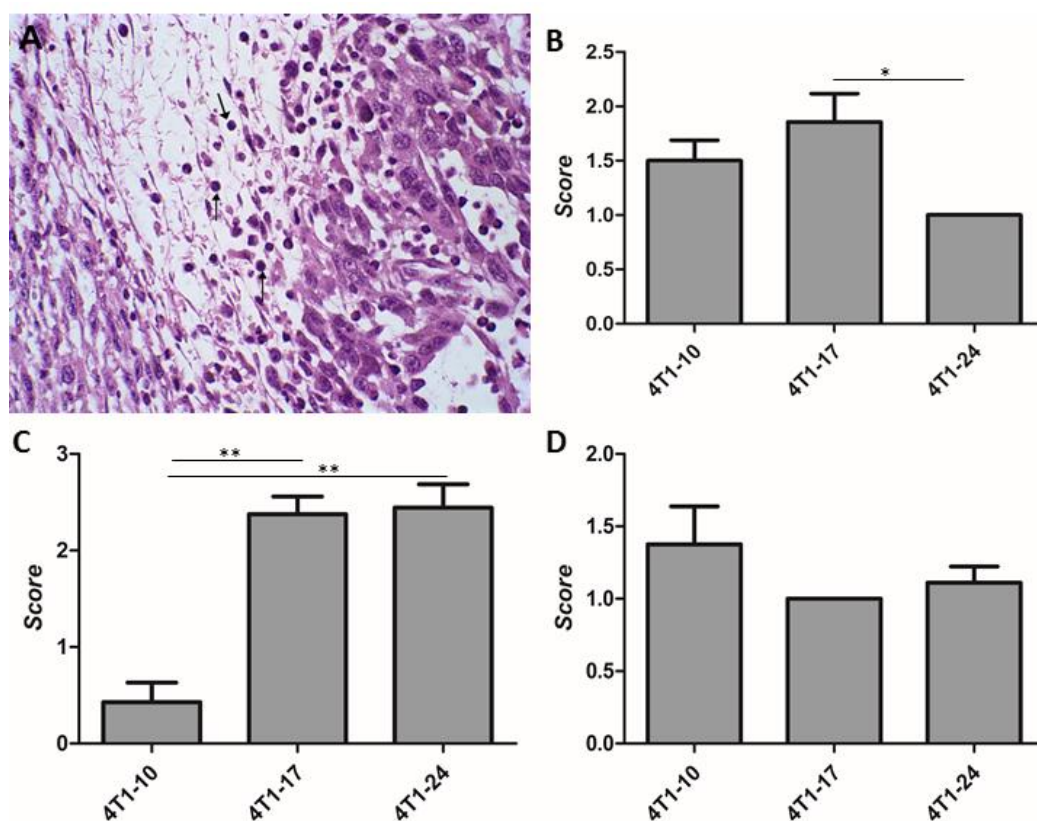


Figura 1: Avaliação histopatológica do infiltrado inflamatório em animais com tumor de células 4T1. (A) A distribuição do infiltrado inflamatório peritumoral foi difusa e com padrão celular misto evidenciando células inflamatório mononucleares e polimorfonucleares (setas). (B) A intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral mostrou-se mais proeminente ao 17º dia após a inoculação tumoral. Diferença estatística foi observada entre 4T1-17 e 4T1-24 (*p=0.01). (C) A intensidade do infiltrado inflamatório intrapulmonar mostrou aumento ao decorrer do tempo pós inoculação tumoral, com diferenças entre 4T1-10 e 4T1-17 (**p<0.01) e, 4T1-10 e 4T1-24 (**p<0.01). (D) A intensidade do infiltrado inflamatório intratumoral, apresentou discreta redução com o decorrer do tempo de inoculação. No entanto, diferenças significativas não foram evidenciadas.

Os resultados mostram o mesmo padrão celular infiltrando os diferentes sítios, o que pode refletir o mesmo padrão de resposta imune frente ao tumor primário e metástase. Interessantemente, a intensidade do infiltrado inflamatório pulmonar sofreu um aumento nos

estágios mais avançados do desenvolvimento tumoral, o que pode estar relacionado ao surgimento de metástases, observado nesses estágios de desenvolvimento do tumor.



APÊNDICE C

CARACTERIZAÇÃO COMPLEMENTAR DAS CÉLULAS 4T1M E 4T1T

Complementando a caracterização das células derivadas, publicada no artigo 2 (capítulo 4, seção 2), as células 4T1m e 4T1t também foram submetidas ao teste de motilidade celular, avaliação da expressão de marcadores EMT por imunofluorescência, ensaio de morte celular e formação de mamoesferas, os quais são descritos nesta seção juntamente com a sua respectiva metodologia.

Metodologia

Para a caracterização complementar as técnicas de imunofluorescência foi realizada como descrito no capítulo 3. Os anticorpos primários e secundários utilizados nesta caracterização complementar que não foram listados no capítulo de metodologia, são listados na Tabela 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados na Imunofluorescência

Alvo	Clone	Diluição	Conjugado	Marca
E-caderina	ECCD2	1:500	Não	Hibridoma*
β -catenina	610153	1:200	Não	BD Bioscience
CD44	KM-201	1:100	FITC	Molecular Probes
Vimentina	RV202	1:100	Não	BD Bioscience

*Hibridoma gentilmente cedido pela professora Dra. Amparo Cano – IIB-UAM, Espanha.

Tabela 2 – Anticorpos secundários utilizados na Imunofluorescência

Fluorocromo	Host/Target	Diluição	Marca
Alexa Fluor® 488	Goat anti-rat	1:200	Life Technologies
Alexa Fluor® 647	Goat anti-mouse	1:200	Life Technologies
Alexa Fluor® 548	Goat anti-mouse	1:200	Life Technologies

Para observar as mudanças no nível de migração das linhas celulares, o ensaio de “fechamento de ferida” foi desenvolvido. As células foram semeadas em placas T-6 e, ao atingirem a

confluência de aproximadamente 90%, três arranhaduras em sentido longitudinal foram realizadas manualmente com ponteiras p200. As células foram lavadas com PBS, e foi então adicionado meio condicionado (sem FBS). Fotos foram obtidas de áreas que apresentaram melhor delimitação da ferida realizada, e sinalizadas para acompanhamento. O acompanhamento foi feito durante as 48 horas seguintes. A área das feridas foi determinada utilizando-se o *software* Image J (NIH, USA).

Para a detecção de morte celular, lamínulas circulares recobertas com polisina foram adicionadas a placas p60, e recobertas com meio de crescimento celular. A quantidade de 7×10^5 células foi semeada e as placas incubadas a 37°C *overnight*. No dia seguinte, o meio foi aspirado, as células foram fixadas com formalina 3,7% por 10 minutos, lavadas com PBS e as lamínulas coletadas para a realização da permeabilização com Triton X-100 a 0,05%. Para a marcação de morte celular foi realizada a técnica histoquímica de TUNEL, sendo utilizado o In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a montagem das lâminas, as mesmas foram levadas ao microscópio fluorescente Eclipse 90i (Nikon®) para visualização e captura de imagens.

Para avaliar a capacidade tumorigênica *in vitro*, aproximadamente 5.000 células foram semeadas em triplicata, em placas T-24 de baixa aderência (Corning). As células foram cultivadas em *Cancer Stem Premium*TM (Promab), suplementado com 2% B27 sem vitamina A (Invitrogen), 20 ng/mL bFGF, 20 ng/mL EGF, 10 µg/mL heparina, 10 µg/mL insulina, 1 µg/mL hidrocortisona e 50 µg/mL gentamicina a 37 °C em incubador de CO₂ 5%. Decorridos 5 dias, fotos foram realizadas ao microscópio invertido DMIL LED FLUO (LEICA) e a capacidade de formar mamoesferas avaliada qualitativamente pelo aspecto esferoide formado em meio livre de soro e sem adesão ao plástico (Dontu and Wicha 2005).

Resultados

Tão importante quanto saber se marcadores epiteliais sofreram redução em seus níveis de expressão, é saber a localização destas proteínas, pois, muitas vezes os eventos de EMT podem resultar em proteínas inativas devido a sua localização e não necessariamente levar a redução da sua expressão (Ozawa and Kobayashi 2014). Para tanto, a expressão de E-caderina, vimentina, β -catenina, CD44 e Qa-2 foram avaliadas por imunofluorescência na linha celular parental e derivadas como demonstrado nas Figuras 1-5.

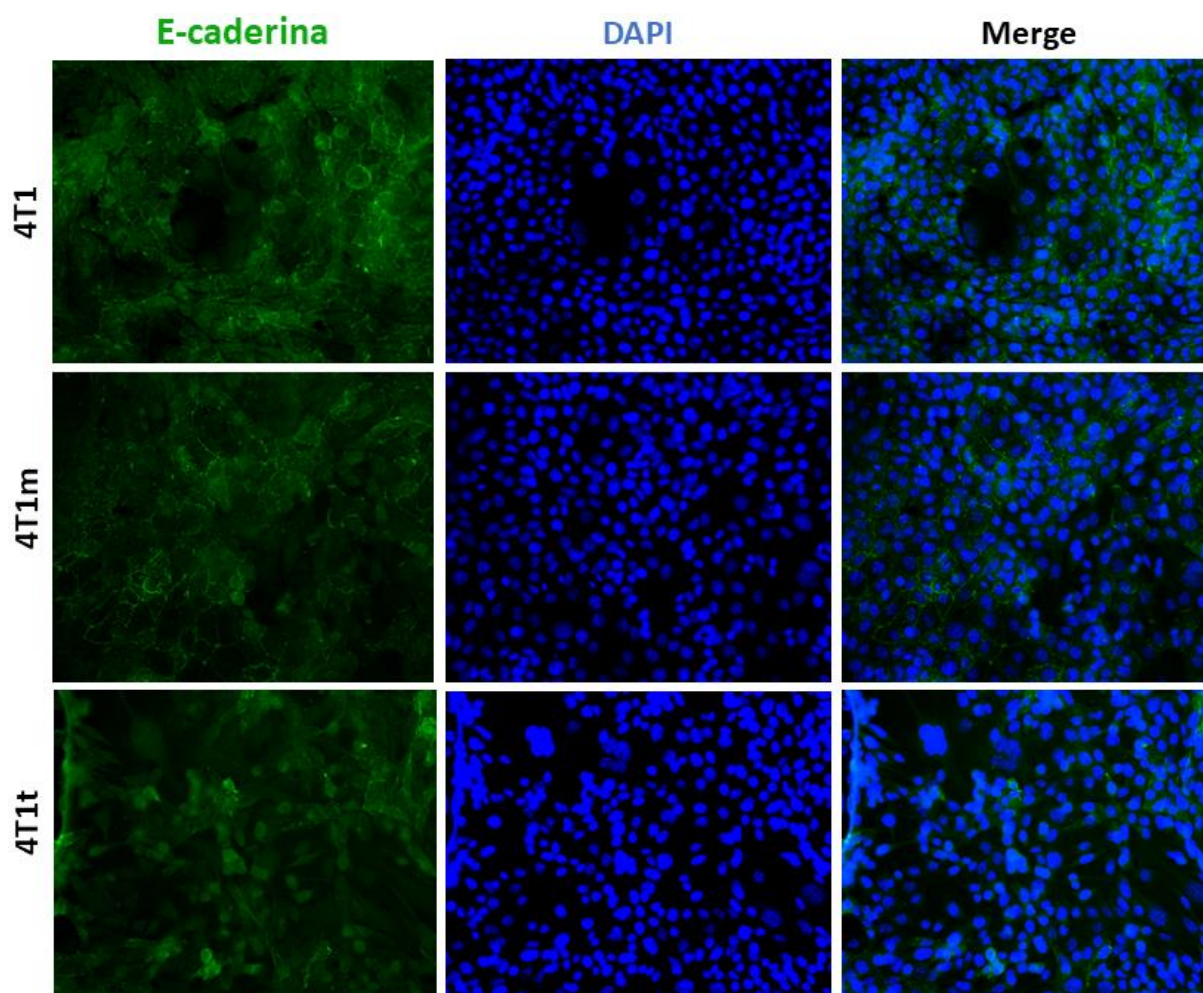


Figura 1 – Expressão de E-caderina avaliada por imunofluorescência. Painéis evidenciando da esquerda para a direita, a marcação para E-caderina, 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e a sobreposição das imagens (Merge). De cima para baixo, as linhas celulares 4T1, 4T1m e 4T1t. 200x.

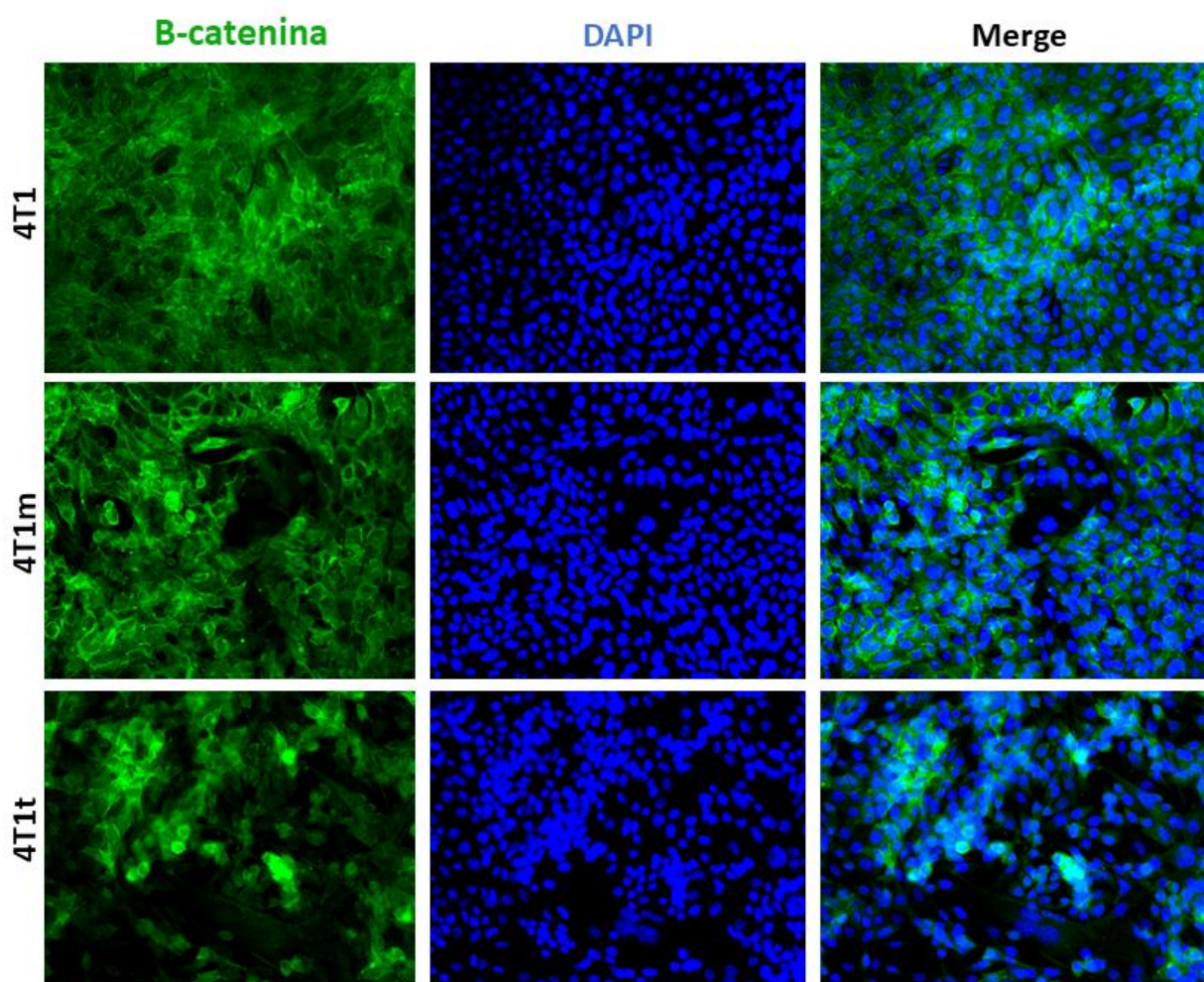


Figura 2 – Expressão de β -catenina avaliada por imunofluorescência. Painéis evidenciando da esquerda para a direita, a marcação para β -catenina, 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e a sobreposição das imagens (Merge). De cima para baixo, as linhas celulares 4T1, 4T1m e 4T1t. 200x.

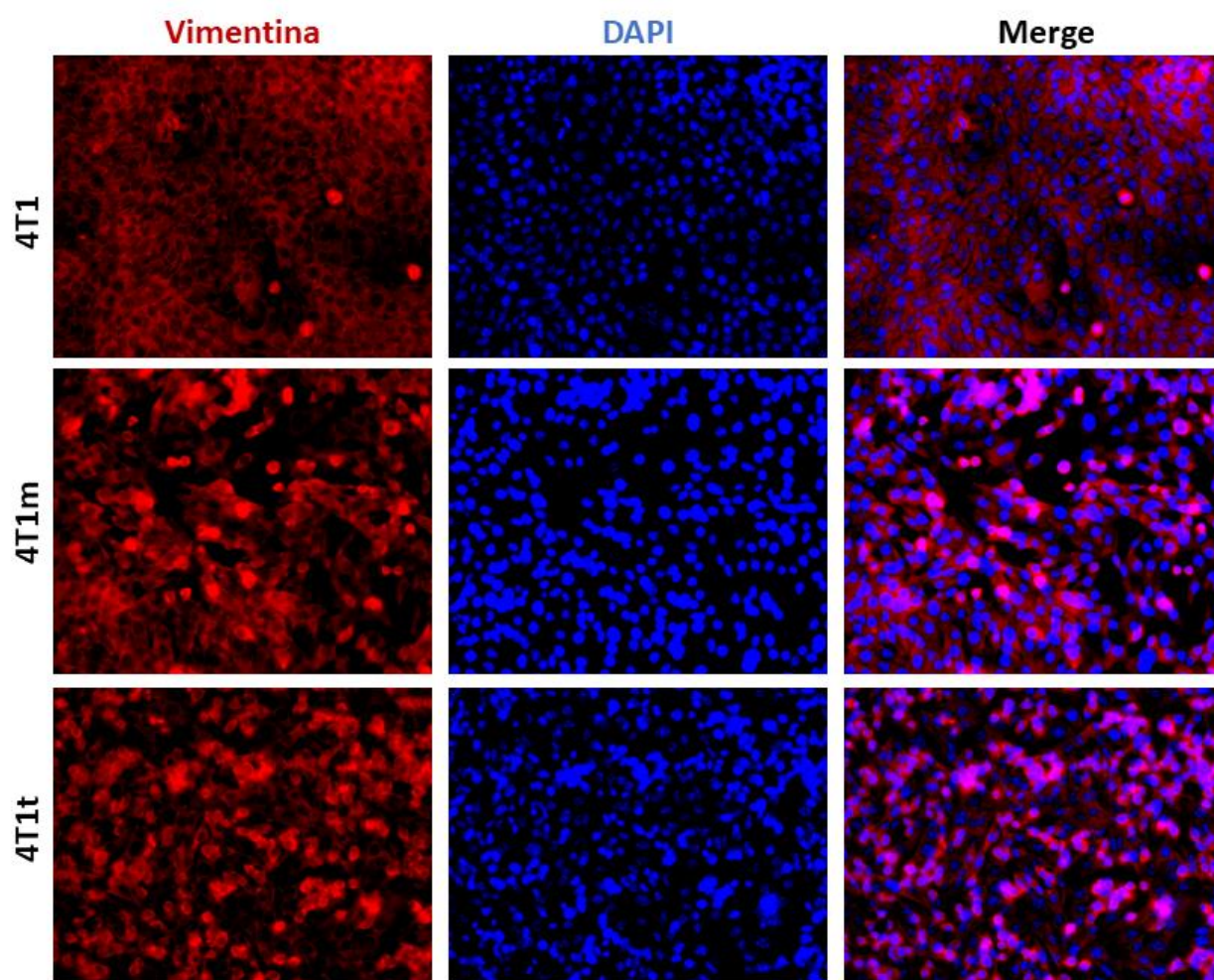


Figura 3 – Expressão de Vimentina avaliada por imunofluorescência. Painéis evidenciando da esquerda para a direita, a marcação para Vimentina, 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e a sobreposição das imagens (Merge). De cima para baixo, as linhas celulares 4T1, 4T1m e 4T1t. 200x.

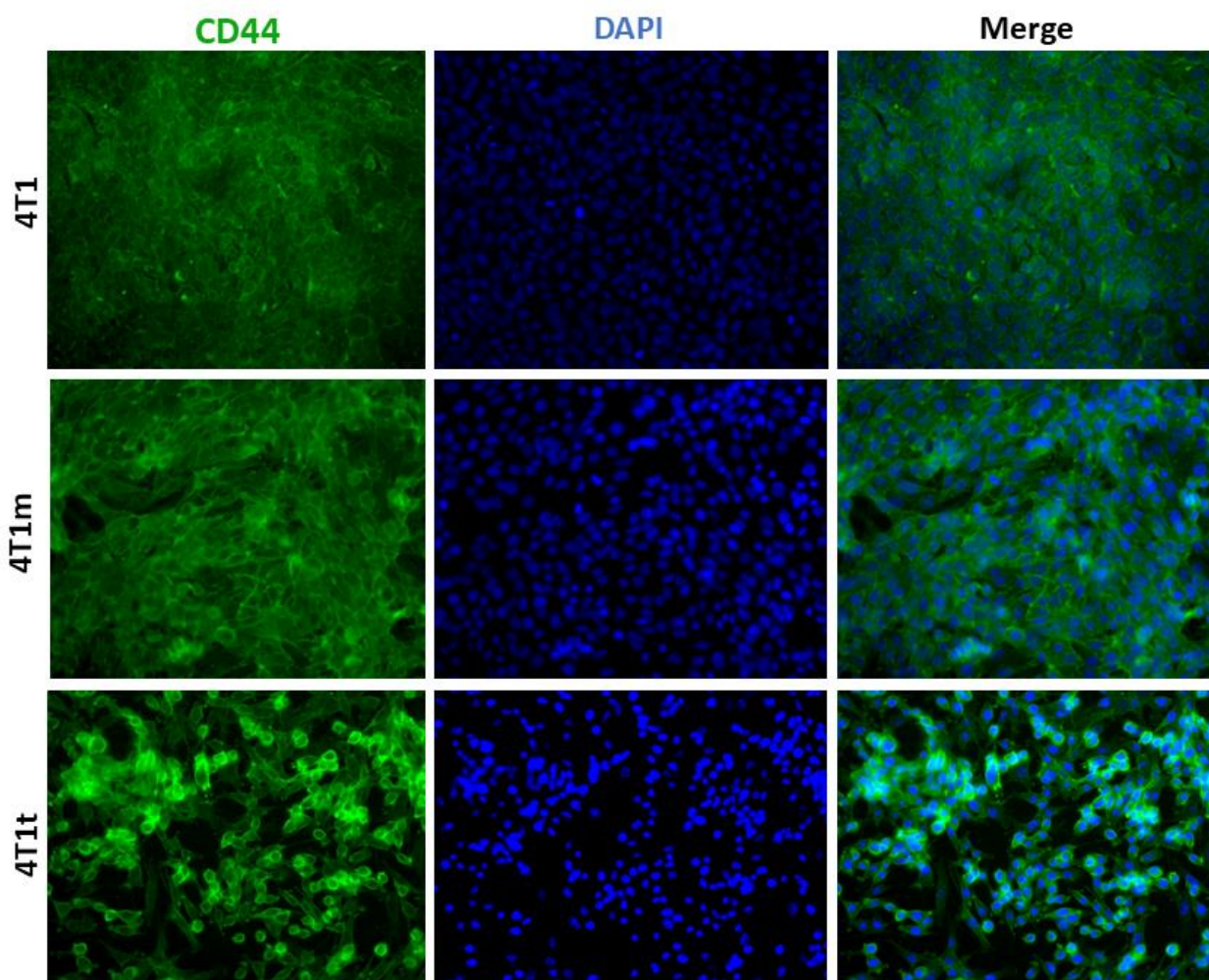


Figura 4 – Expressão de CD44 avaliada por imunofluorescência. Painéis evidenciando da esquerda para a direita, a marcação para CD44, 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e a sobreposição das imagens (Merge). De cima para baixo, as linhas celulares 4T1, 4T1m e 4T1t. 200x.

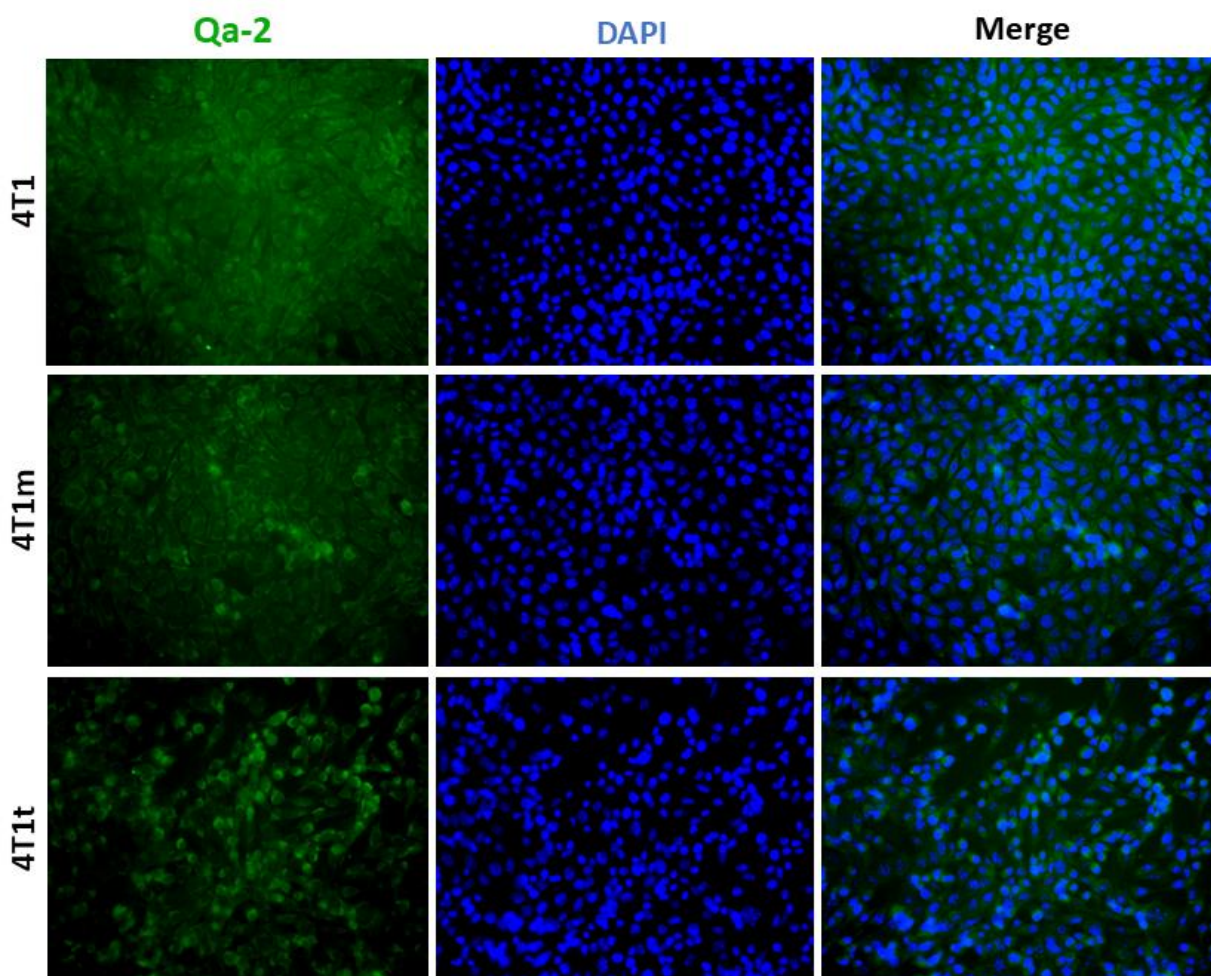


Figura 5 – Expressão de Qa-2 avaliada por imunofluorescência. Painéis evidenciando da esquerda para a direita, a marcação para Qa-2, 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e a sobreposição das imagens (Merge). De cima para baixo, as linhas celulares 4T1, 4T1m e 4T1t. 200x.

Os achados observados através da imunofluorescência corroboram com o evidenciado através do Western blot, onde observamos redução de E-caderina, β -catenina e Qa-2, com aumento de CD44 e vimentina. Alterações na localização destas proteínas não foram observadas.

A avaliação da capacidade migratória das células parentais e derivadas, contou ainda com uma linha celular controle, a MCA3D. Esta linha celular é originada de queratinócitos imortalizados e possui características de uma linha hiperplásica. Os resultados mostram que a linha celular 4T1t permanece com as mesmas capacidades migratórias que sua linha parental 4T1, enquanto, a linha 4T1m, perdeu um pouco esta capacidade. Diferenças significativas foram evidenciadas

entre 4T1 e 4T1m ($p<0.01$), 4T1 e MCA3D ($p<0.01$), 4T1m e 4T1t ($p<0.01$) e 4T1t e MCA3D ($p<0.05$; Figura 6A e B).

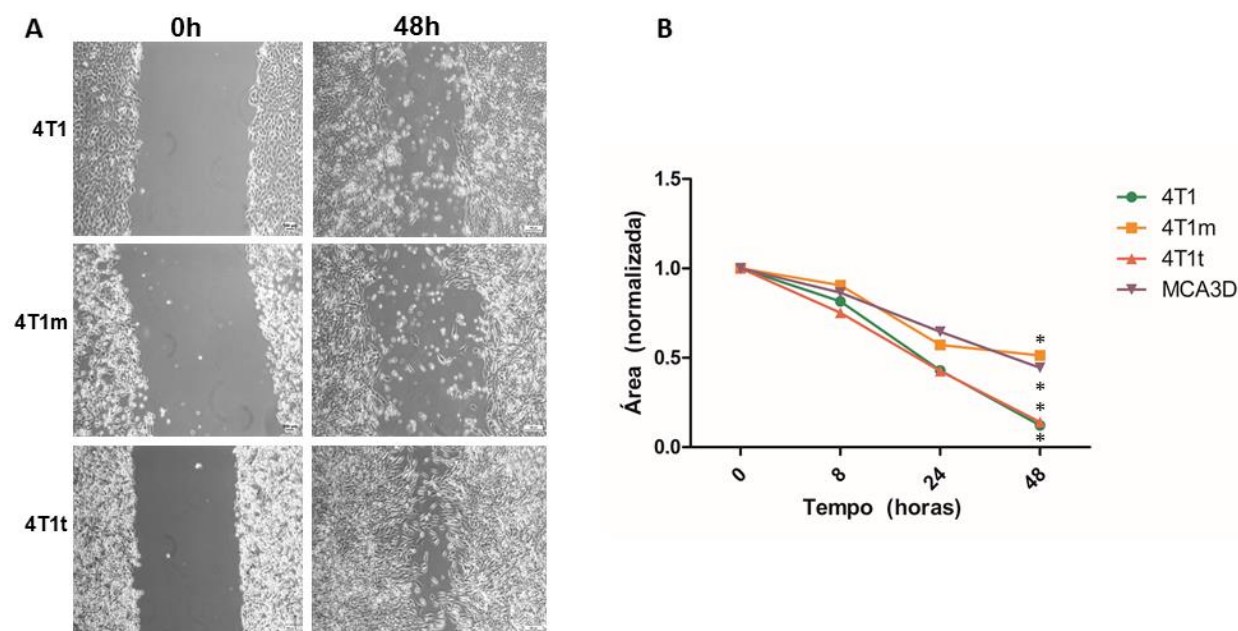


Figura 6: Ensaio de migração celular. (A) O ensaio de migração mostrou que as células 4T1t mantiveram as características de motilidade das suas parentais 4T1, fechando quase totalmente a ferida após as 48h e (B) ao normalizar os dados, a análise estatística mostrou diferença entre 4T1 e 4T1m ($p<0.01$), 4T1 e MCA3D ($p<0.01$), 4T1m e 4T1t ($p<0.01$) e 4T1t e MCA3D ($p<0.05$).

Esses resultados demonstram que, embora as células 4T1t tenham sofrido muitas modificações relacionadas à EMT, a sua capacidade migratória permanece semelhante às células 4T1. Por outro lado, as células 4T1m mostraram redução desta capacidade, demonstrando que o microambiente distinto pode ter ocasionado uma transformação celular distinta.

Após a realização do ensaio de proliferação, nos perguntamos como estaria o índice de morte nas linhas derivadas. Para isso, utilizamos o ensaio TUNEL o qual mostrou pouca morte celular em células 4T1 e derivadas, com ligeiro aumento em 4T1t (Figura 7A-E). Diferença

estatisticamente significativa entre os grupos não foi evidenciada. Estes resultados demonstram a alta capacidade de sobrevivência celular das células parentais e derivadas.

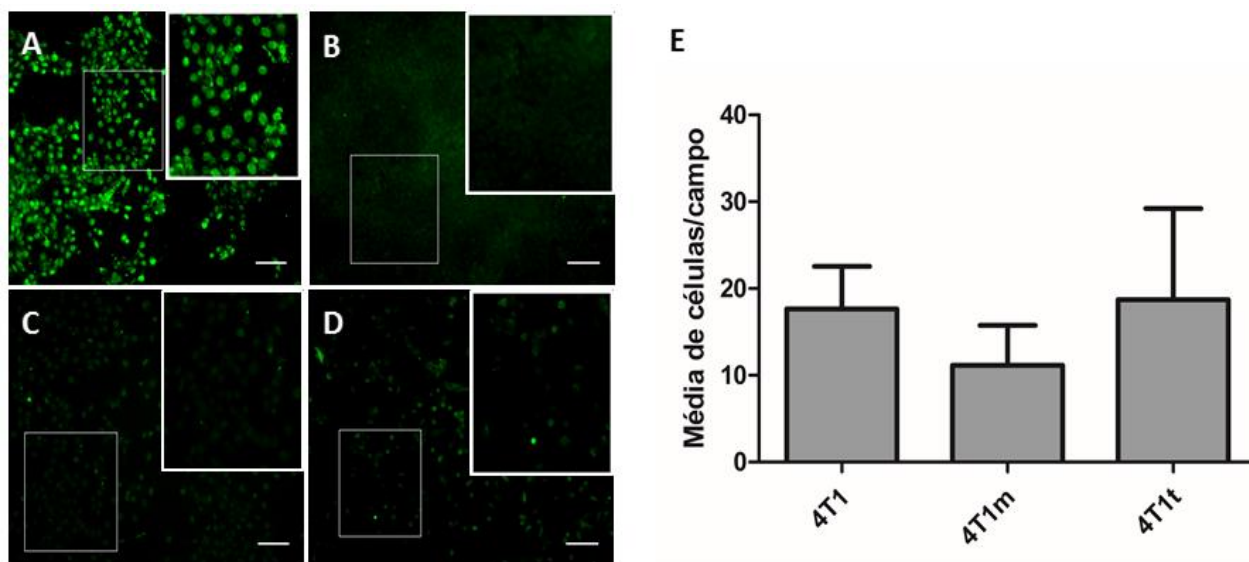


Figura 7: Ensaio de morte celular. (A) Controle positivo evidenciando marcação nuclear forte. (B) Células 4T1 apresentando pouca morte celular. (C) Células 4T1m apresentando pouca morte celular. (D) Células 4T1t apresentando discreto aumento no número de células mortas. (E) A análise quantitativa da marcação não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Complementando o ensaio de tumorigenicidade *in vivo*, realizamos o ensaio de tumorigenicidade *in vitro*, também conhecido como ensaio de formação de esferas, ou, neste caso, mamoesferas. Comumente, a análise é realizada pela contagem de esferas formadas, o que reflete a capacidade de auto-renovação das células. No entanto, em nosso experimento, as linhas derivadas foram incapazes de formar mamoesferas, impossibilitando sua contagem e tornando a análise apenas qualitativa. Apenas as células parentais (4T1) foram capazes de formar esferas em meio de suspensão (Figura 8A-C).

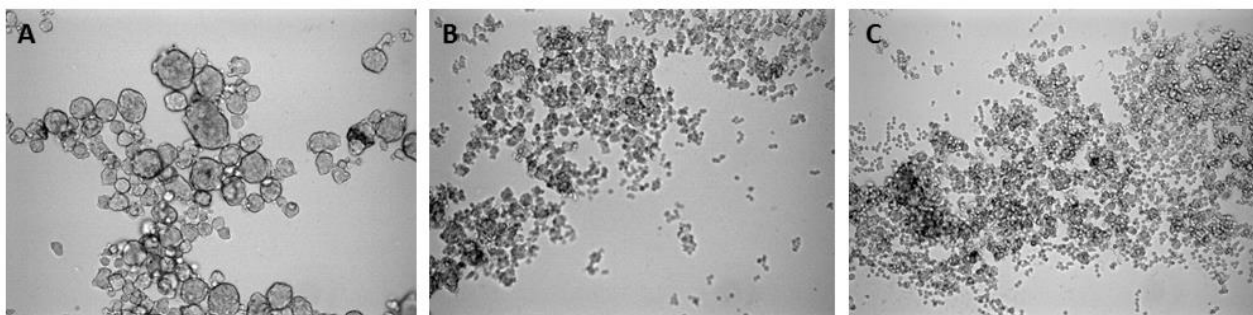


Figura 8: Ensaio de formação de esferas. (A) Células 4T1 apresentando formação de esferas, enquanto que, as células 4T1m (B) e as células 4T1t (C) foram incapazes.

Já foi demonstrado que a formação de mamoesferas é dependente da expressão de E-caderina (Manuel Iglesias, Beloqui et al. 2013), e, neste trabalho, evidenciamos redução da expressão deste marcador nas linhas celulares derivadas. Tais achados, podem explicar a incapacidade em formar mamoesferas apresentada pelas células derivadas. Esses resultados demonstram ainda, a necessidade da utilização de métodos complementares buscando complementar as limitações dos métodos convencionais.

Referências

- Dontu, G. and M. S. Wicha (2005). "Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **10**(1): 75-86.
- Manuel Iglesias, J., I. Beloqui, et al. (2013). "Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin." *PLoS One* **8**(10): e77281.
- Ozawa, M. and W. Kobayashi (2014). "Cadherin cytoplasmic domains inhibit the cell surface localization of endogenous E-cadherin, blocking desmosome and tight junction formation and inducing cell dissociation." *PLoS One* **9**(8): e105313



APÊNDICE D

CARACTERIZAÇÃO DE 4T1-NEO E 4T1-Q7

Antes da realização do experimento in vivo de avaliação dos efeitos da superexpressão de Qa-2 no desenvolvimento tumoral e surgimento de metástases, as células geradas no processo de clonagem e transfecção foram testadas quanto as suas características morfológicas e expressão de alguns marcadores EMT.

Metodologia

Para esta caracterização, a análise morfológica, ensaio de mamoesferas e avaliação da expressão relativa de Sox2, Oct3/4, Zeb1 e Hes1 foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos no capítulo de metodologia.

Resultados

A análise da morfologia das células após a realização da transfecção não evidenciou nenhuma modificação. Da mesma forma, a capacidade de formar esferas em meio de suspensão não foi alterada (Figura 1).

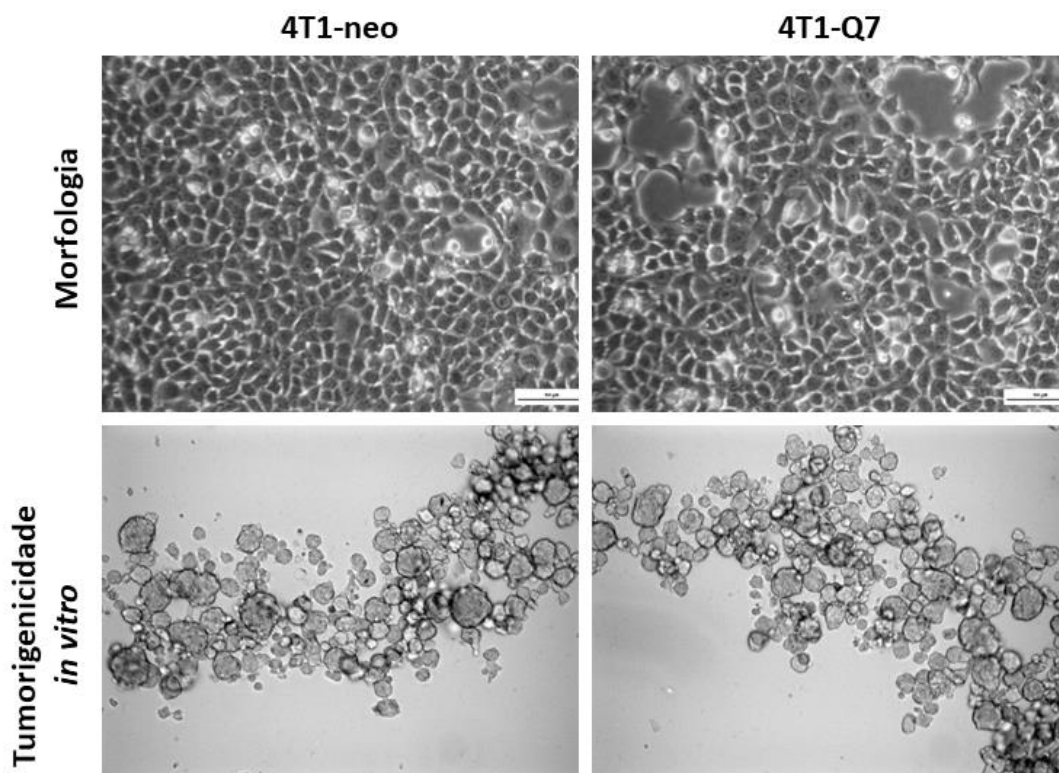


Figura 1 – Avaliação das características morfológicas e tumorigênicas *in vitro* das células 4T1-neo e 4T1-Q7. Painéis ilustrando da esquerda para a direita, as células 4T1-neo e 4T1-Q7, e de cima para baixo as características morfológicas e tumorigênicas *in vitro*.

A avaliação da expressão de alguns marcadores EMT por Western blot mostrou pouco ou nenhuma diferença entre as células controles (4T1-neo) e as células superexpressando Qa-2 (4T1-Q7). Apenas a isoforma variável de CD44 (CD44v) apresentou discreta redução. Já a análise da expressão relativa de Sox2, Oct3/4, Zeb 1 e Hes1, apresentou resultados curiosos. Enquanto Hes1 e Sox2 apresentaram um aumento nas células superexpressando Qa-2, Zeb1 e Oct3/4 apresentaram-se reduzidos nas mesmas células (Figura 2). Estes resultados indicam que a superexpressão de Qa-2 levou a um desvio na expressão de fatores de transcrição relacionados a EMT e CSC. No entanto, nossos resultados não são suficientes para indicar qual tipo de desvio ocorreu de fato, sendo necessários mais estudos que busquem evidenciar as vias de sinalização relacionadas ao Qa-2.

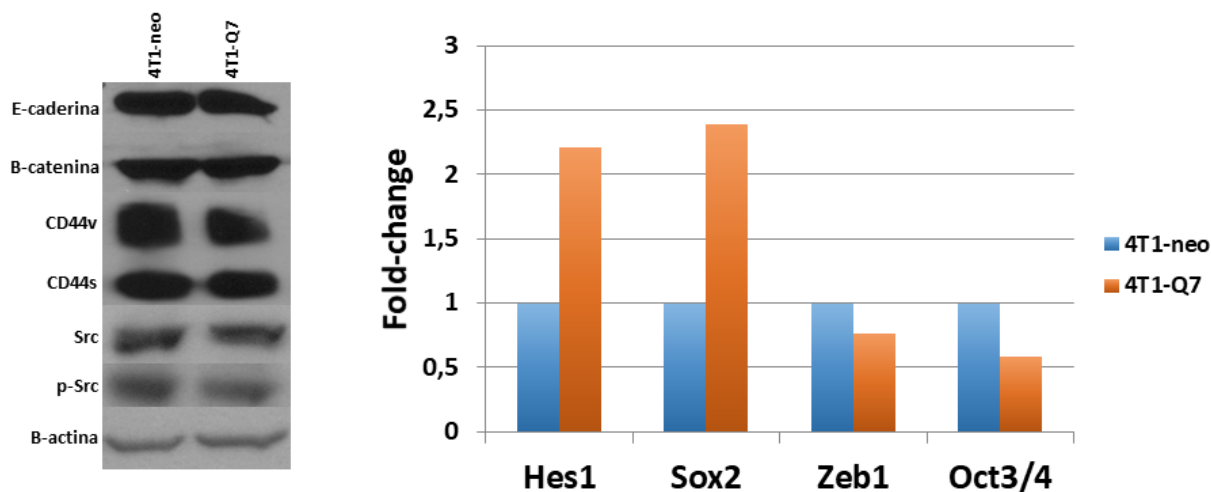


Figura 2 – Avaliação da expressão de fatores EMT e CSC em células controles e superexpressando Qa-2. Da esquerda para a direita, são apresentadas a expressão proteica determinada por Western blot de E-caderina, B-catenina, CD44, Src e fosfo-Src, onde, pode-se observar redução da expressão da isoforma variável de CD44. Ainda, é apresentada a expressão relativa de Hes1, Sox2, Zeb1 e Oct3/4, evidenciando aumento de Hes1 e Sox2 e redução de Zeb1 e Oct3/4 nas células que superexpressão Qa-2.



APÊNDICE E

SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO DE QA-2

Complementando os achados do experimento de avaliação dos efeitos da superexpressão de Qa-2 no desenvolvimento tumoral e surgimento de metástases, foi realizado também experimentos de silenciamento utilizando-se lentivírus e shRNAs como descrito abaixo.

Metodologia

Para o silenciamento, primeiramente foram identificadas sequências de iRNA que tivessem como alvo o par gênico Q7/Q9. Estas sequências foram clonadas em vetor pLKO.1. Após a clonagem, o constructo foi utilizado para a construção de partículas lentivirais. Estas partículas lentivirais foram então utilizadas na infecção de células 4T1-luc. Os procedimentos detalhados são descritos a seguir.

Ainda, como maneira de caracterizar as células geradas, citometria de fluxo, imunofluorescência e Western blot foram realizados como descrito previamente no capítulo de material e métodos.

Construção dos lentivírus e infecção

Os procedimentos realizados para obtenção do silenciamento da expressão de Qa-2 foram extraídos do protocolo disponibilizado juntamente com o vetor utilizado (<https://www.addgene.org/tools/protocols/plko/>) com algumas modificações aqui descritas.

Foram utilizados *short hairpin* RNAs em vetores lentivirais para obtenção de uma interferência estável, portanto, primeiramente foram selecionadas sequências de siRNAs que possuíam como alvo o par gênico Q7/Q9 através da ferramenta disponibilizada pelo *Whitehead Institute for Biomedical Research* (<http://sirna.wi.mit.edu/>). A escolha da sequência foi realizada levando em consideração o conteúdo de G-C (36-52%), a extremidade 3' contendo baixa estabilidade, evitando segmentos intrônicos, evitando 4 ou mais repetições de nucleotídeos, entre outras recomendações disponíveis em <http://www.broadinstitute.org/rnai/public/resources/rules>. As sequências obtidas a partir da referida ferramenta são descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequências de RNAi direcionados ao par gênico Q7/Q9

	Sequência (5'– 3')
Sh1	AAGAGTATGTGACCTTGATTG
Sh2	AATGGTTGAGAATACTTAGCA

Sequências complementares foram adicionadas para a tornar os oligos compatíveis com o vetor a serem inseridos, neste caso, pLKO.1. A sequência final para obtenção do shRNA são descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Oligos usados na construção dos lentivírus shRNAs direcionados ao par gênico Q7/Q9

Iniciadores	Sequência (5'– 3')
Sh1 – <i>Foward</i>	CCGGAAGAGTATGTGACCTTGATTGCTCGAGCAATCAAGGTCACATACTCTTTTTTTG
Sh1 – <i>Reverse</i>	AATTCAAAAAAAGAGTATGTGACCTTGATTGCTCGAGCAATCAAGGTCACATACTCTT
Sh2 – <i>Foward</i>	CCGGAATGGTTGAGAATACTTAGCACTCGAGTGCTAAGTATTCTCAACCATTTTTTTG
Sh2 – <i>Reverse</i>	AATTCAAAAAAATGGTTGAGAATACTTAGCACTCGAGTGCTAAGTATTCTCAACCATT

Após todas as verificações *in silico*, a síntese dos oligos foi solicitada. Em seguida, os oligos foram ressuspensos a uma concentração de 20µM e anelados para a formação de um inserto fita dupla. Para tanto, 5µL de oligo *foward* e 5µL de oligo *reverse* foram homogeneizados com 5µL de 10x NEB buffer 2 (New England Biolabs) e ajustados com UltraPure™ DEPC-Treated Water para o volume final de 35µL. A mistura foi então incubada a 95°C por 4 minutos em termociclador. Em seguida, a 70°C por 10 minutos e depois deixado esfriar lentamente em temperatura ambiente por diversas horas.

O vetor pLKO.1 foi então digerido primeiramente com a enzima de restrição AgeI (New England Biolabs). A eficiência da digestão foi avaliada em gel de agarose 0,8% (Sigma-Aldrich) utilizando Syber Safe (ThermoFisher) para a marcação do DNA e posterior visualização em PhotoDoc-It 55 + transiluminador LM26E (Cultek). Em seguida, as bandas

foram cortadas e purificadas para a seguinte digestão com EcoRI (New England Biolabs). O mesmo procedimento para a avaliação foi realizado, e a visualização de duas bandas com tamanhos 7kb e 1.9kb demonstraram a eficiência da digestão. Então, a banda de 7kb foi cortada, purificada e quantificada em Nanodrop® (ThermoFisher) para a seguinte etapa do processo. Todas as digestões foram realizadas de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Os oligos previamente anelados foram ligados ao inserto já digerido, utilizando-se T4 DNA ligase (Promega) por 18 horas a 16°C. Um tubo de reação contendo apenas o vetor foi utilizado como controle negativo. O volume de 2µL do produto de ligação foi transformado em 25µL de bactérias competentes DH5α e semeadas em placas de LB ágar contendo 100µg/mL de ampicilina.

As placas foram incubadas a 37°C *overnight* e no dia seguintes verificadas para o crescimento bacteriano. Diferentes colônias foram rascadas e semeadas em 5 mL de meio LB líquido contendo 100µg/mL, para a realização da extração plasmidial. Após a incubação *overnight* a 37°C, a extração plasmidial foi realizada através do PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega), seguindo todas as recomendações do fabricante.

A presença e integridade do inserto foram então verificadas através de sequenciamento utilizando-se o primer para pLKO.1 (5' CAA GGC TGT TAG AGA GAT AAT TGG A 3') pelo método de Sanger em ABI 3130xl Genetic Analyzer (ThermoFisher). As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências desenhadas através do programa Geneious® (Auckland, New Zealand). Feita a confirmação, os melhores constructos foram selecionados e novamente transformados em bactérias competentes como previamente descrito. As bactérias recém transformadas foram semeadas em 200mL de meio LB líquido contendo 100µg/mL para a realização da extração plasmidial com o kit QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen).

Para a produção das partículas lentivirais, HEK-293T previamente semeadas em placas p60, em confluência média, e incubadas *overnight*, foram transfectadas com 1µg do plasmídeo pLKO.1 contendo o inserto, juntamente com 750ng de plasmídeo de capsídeo pCMV e 250ng de plasmídeo de envelope pMD2.G (Addgene), utilizando FuGENE® HD Transfection

Reagent (Promega) e meio reduzido em soro fetal bovino Opti-MEM® (Gibco). A transfecção foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. O sobrenadante da cultura contendo as partículas virais foi coletado a cada 24h nos dois dias seguintes, acondicionado em criotubos e armazenados em freezer -80°C.

Para a infecção lentiviral, 100µl do sobrenadante contendo as partículas lentivirais, juntamente do 50µl de nanopartículas de ouro (sintetizadas e gentilmente cedidas pela professora doutora María del Pilar Martín Duque – Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, Espanha) foram adicionados a 500µl de meio sem soro e incubados por 20 minutos. Após a incubação, a mistura foi adicionada as células 4T1luc previamente semeadas em placas p60 e mantidas em incubador a 37°C 5% CO₂ *overnight*. As células cobertas com a mistura, foi novamente incubada por 40 minutos também em incubador. Decorrido este tempo, 1,5mL de meio completo foi adicionado.

Após 48 horas, o sobrenadante foi descartado e as células passadas a seleção com antibiótico Blastidicina na concentração previamente padronizada de 7 µg/mL. Decorridas duas semanas de seleção, as células foram testadas para o silenciamento da expressão de Qa-2 por imunofluorescência, PCR quantitativa e convencional e por citometria de fluxo. As células foram nomeadas como 4T1sh1 e 4T1sh2 de acordo com o par de shRNA recebido.

Ensaio *in vivo*

Para avaliação dos efeitos do silenciamento de Qa-2, os animais foram divididos em 2 grupos: 4T1sh1 (n=5) e 4T1sh2 (aqui utilizadas como controles e melhor aclarado mais adiante; n=5). O grupo 4T1sh1 e 4T1sh2 foi obtido a partir da inoculação das respectivas células na quantidade de 1×10^5 células em PBS para um volume final de 0,1 mL. Os animais foram acompanhados através do ensaio de luciferase em intervalos irregulares, sendo a cada 3-5 dias, para avaliação do crescimento tumoral e metástases. Após 18 dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂.

Resultados

Após a produção das partículas lentivirais e das respectivas infecções, as células selecionadas por resistência foram avaliadas quanto a expressão de Qa-2. A citometria de fluxo mostrou redução da expressão de Qa-2 nas células 4T1sh1 quando comparadas as células que as deram origem (4T1luc). Por outro lado, o silenciamento ocasionou um aumento em 4T1sh2 (Figura 1A). Já a análise da expressão relativa do mRNA de Qa-2, mostrou resultados um pouco diferentes, onde, o silenciamento foi efetivo, especialmente em 4T1sh2 (Figura 1B e C). A avaliação das características morfológicas celulares também foi realizada, no entanto, nenhuma diferença foi observada (dados não mostrados).

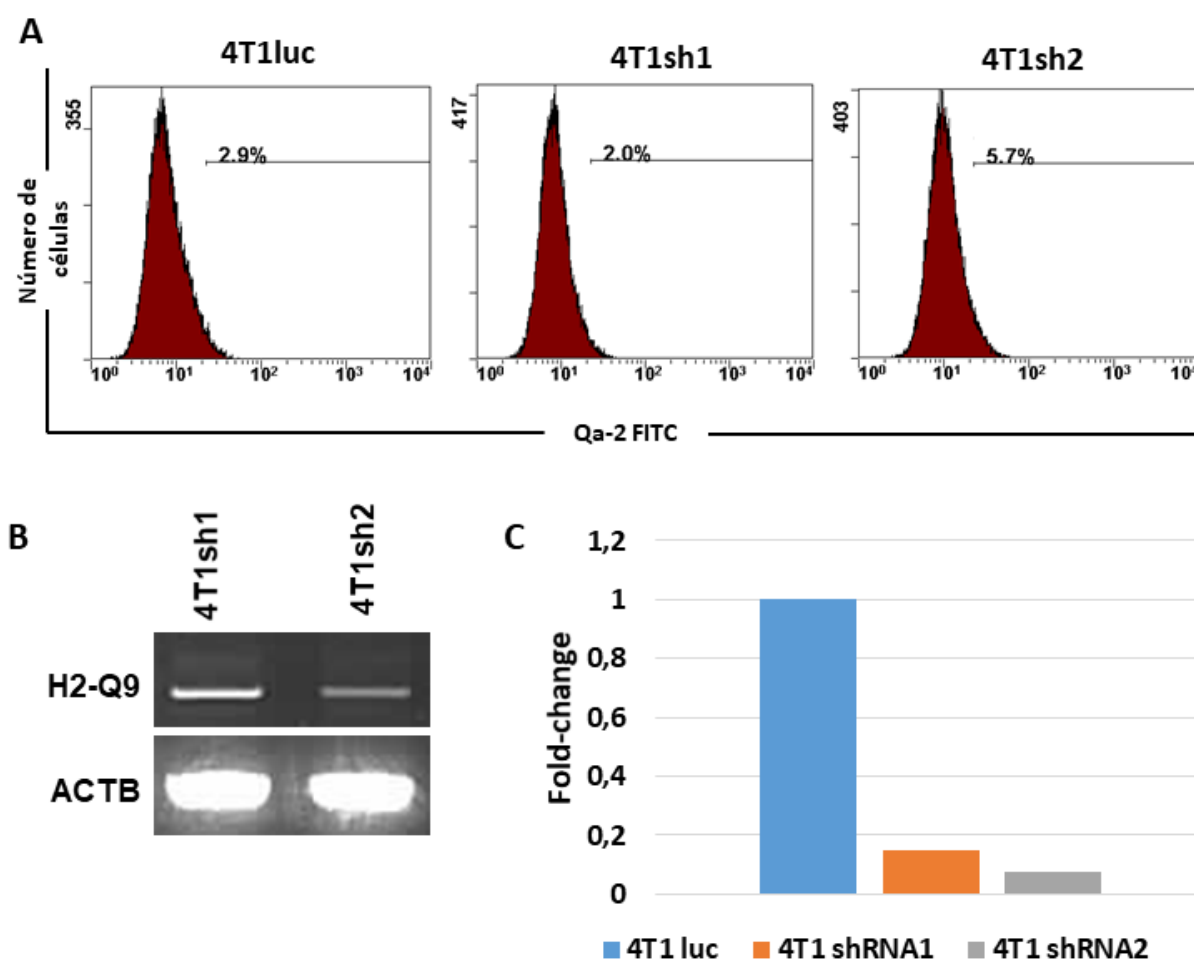


Figura 1 – Expressão de Qa-2 após o silenciamento de Q7/Q9. (A) Expressão de Qa-2 avaliada por citometria de fluxo, demonstrando redução da expressão de Qa-2 em 4T1sh1 e aumento em 4T1sh2. (C) PCR convencional e (C) PCR quantitativa demonstrando redução da expressão relativa do mRNA de Qa-2 nas células silenciadas, especialmente em 4T1sh2.

Uma vez que a linhagem celular 4T1 é proveniente de um animal Balb/c, e, esta cepa murina possui apenas os genes *Q6* e *Q7* funcionais (Stroynowski and Tabaczewski 1996), o silenciamento direcionado a *Q7/Q9* poderia ser ineficiente uma vez que, *Q6* não estaria silenciado. No entanto, também já foi descrito que os transcritos formados pelo par gênico *Q6/Q8* não são capazes de gerar um fenótipo *Qa-2+*. Tal fato pode ser ocasionado pela geração de proteínas irreconhecíveis por anticorpos específicos para *Qa-2*, ou ainda por serem mutados em sua porção 5', impedindo sua tradução em proteínas (Elliott, Rathbun et al. 1989).

Quando observamos os resultados encontrados para o par de shRNA1, podemos notar coerência na discreta redução dos níveis proteicos e de transcritos para *Qa-2*. No entanto quando observamos os resultados encontrados para o shRNA2, notamos uma discrepância. Para este shRNA, ocorreu aumento dos níveis proteicos com redução dos níveis de transcritos. Tais resultados sugerem que, o silenciamento com o sh2 foi eficiente ao propiciar degradação dos transcritos, mas, por outro lado, desencadeou mecanismos compensatórios, os quais, resultaram em uma regulação positiva da tradução dos transcritos remanescentes, culminando em aumento da proteína. Embora os miRNAs tenham predominantemente um efeito negativo nos níveis de expressão proteica, em alguns casos, eles podem apresentar efeitos inversos, resultando em aumento da proteína (Nyayanit and Gadgil 2015). Esta regulação positiva da tradução dos transcritos pode ser decorrente de eventos combinatórios, uma vez que, os alvos não são regulados por um único miRNA, não representando necessariamente uma regulação positiva direta pelo shRNA utilizado.

Tendo em vista os resultados obtidos na caracterização das linhas celulares geradas após o silenciamento, estabeleceu-se que as linhas 4T1sh2 não poderiam ser consideradas silenciadas para *Qa-2*, e, portanto, seriam utilizadas como controle, passando a serem tratadas por esse nome.

Após a caracterização das linhas celulares geradas, passamos então a avaliação dos efeitos do silenciamento no desenvolvimento tumoral. A avaliação do crescimento tumoral realizada através da bioluminescência emitida pela quebra da luciferina, mostrou que os tumores gerados

pela inoculação das células 4T1sh1 cresciam mais quando comparados aos tumores controles (Figura 2A e B). Tais achados foram confirmados pela mensuração dos tumores após a eutanásia, onde os tumores 4T1sh1 foram maiores que os tumores controles (Figura 2C). No entanto, nenhuma dessas diferenças foi estatisticamente significativa. A avaliação das metástases foi comprometida devido ao frágil estado de saúde apresentado por animais controles e 4T1sh1, levando-os a serem eutanasiados ao 18º dia após a inoculação tumoral. Nesse estágio de desenvolvimento tumoral, é possível que existam metástases, no entanto, muitas vezes são ainda micrometástases, o que dificulta a detecção pela técnica de bioluminescência utilizada.

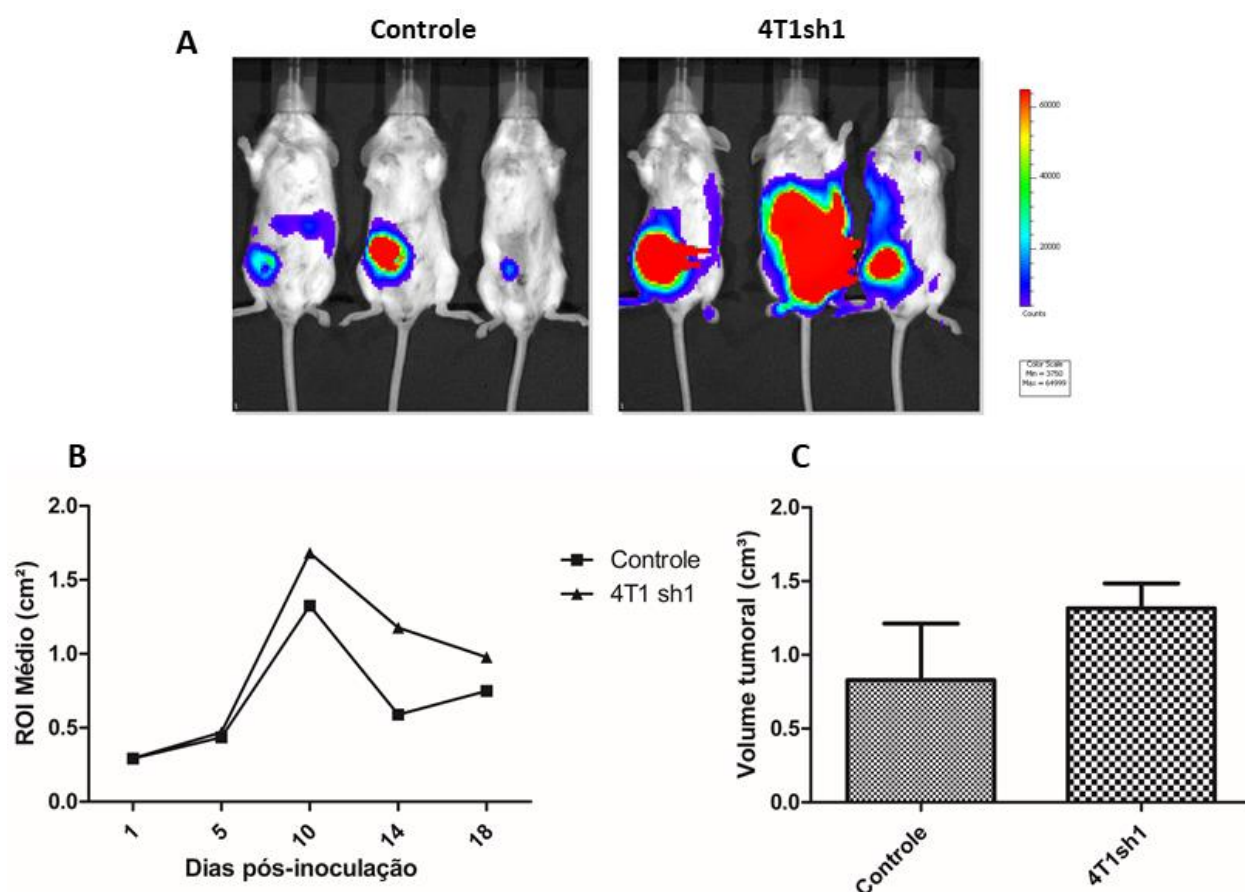


Figura 2 – Avaliação do crescimento tumoral após silenciamento da expressão de Qa-2. (A) Imagens obtidas a partir do ensaio de Luciferase realizado ao 10º dia após a inoculação tumoral, evidenciando maior crescimento tumoral em animais 4T1sh1. (B) A avaliação das regiões de interesse obtidas através do software *Living Image*, confirmou maior crescimento tumoral nos animais inoculados

com células silenciadas para Qa-2. (C) A mensuração dos tumores após a eutanásia também evidencia maior volume tumoral em animais 4T1sh1. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos.

Os presentes resultados confirmam os achados do experimento de superexpressão de Qa-2, onde, o aumento da expressão de Qa-2 levou a redução do crescimento tumoral. Aqui, o silenciamento de Qa-2 mostrou que a perda da expressão de Qa-2 favorece o crescimento tumoral, reforçando o papel “anti-tumoral” exercido por essa molécula. No entanto, os achados aqui apresentados não se mostraram estatisticamente significativos. Como já é descrito que células tumorais tendem a perder a expressão de Qa-2 (Ungchusri, Chiang et al. 2001), silenciar Qa-2 partindo de células com expressão basal já reduzida, como as células 4T1, pode resultar em dados não significativos, já que, trata-se de silenciar algo que praticamente não é expresso.

Referências

- Elliott, E., D. Rathbun, et al. (1989). "Genetics and expression of the Q6 and Q8 genes. An LTR-like sequence in the 3' untranslated region." *Immunogenetics* **29**(6): 371-379.
- Nyayanit, D. and C. J. Gadgil (2015). "Mathematical modeling of combinatorial regulation suggests that apparent positive regulation of targets by miRNA could be an artifact resulting from competition for mRNA." *RNA* **21**(3): 307-319.
- Stroynowski, I. and P. Tabaczewski (1996). "Multiple products of class Ib Qa-2 genes which ones are functional?" *Res Immunol* **147**(5): 290-301.
- Ungchusri, T., E. Y. Chiang, et al. (2001). "Widespread expression of the nonclassical class I Qa-2 antigens in hemopoietic and nonhemopoietic cells." *Immunogenetics* **53**(6): 455-467.



ANEXOS



ANEXO A

CERTIFICADOS CEUA



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 350 / 2012, relativo ao projeto intitulado "Expressão da molécula Qa-2 e sua relação com a regulação de microRNAs no modelo murino de tumor de Erlich e de células 4T1", que tem como responsável Enio Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 14/03/2013. Este certificado espira-se em 14/03/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 350 / 2012, related to the Project entitled "Qa-2 expression and its relation to the microRNAs regulation in murine model of 4T1 tumor cells and Erlich tumor.", under the supervision of Enio Ferreira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 14/03/2013. This certificate expires in 14/03/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 14/03/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@pqm.ufmg.br



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 3 / 2015, relativo ao projeto intitulado "CARACTERIZAÇÃO DE MODELOS COMPARATIVOS DE CÂNCER DE MAMA E MELANOMA: avaliação da resposta imune tumoral e fatores de crescimento epidérmico", que tem como responsável Enio Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 14/04/2015. Este certificado espira-se em 14/04/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 3 / 2015, related to the Project entitled "CHARACTERIZATION OF COMPARATIVE MODELS OF BREAST CANCER AND MELANOMA: evaluating tumor immune response and epidermal growth factors", under the supervision of Enio Ferreira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 14/04/2015. This certificates expires in 14/04/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 14/04/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



ANEXO B

ACEITE DO ARTIGO 2

2017-6-28

Scientific Reports



manuscripttrackingsystem

SCIENTIFIC REPORTS

tracking system home

author instructions

reviewer instructions

help

tips

logout

journal home

Close Window

[Print Email](#)**Date:** 14th June 17 06:21:36**Last Sent:** 14th June 17 06:21:36**Triggered By:** Redacted**BCC:** Redacted**Subject:** Scientific Reports: Decision letter for SREP-17-08665A**Message:** Dear Prof Quintanilla,

We are delighted to accept your manuscript entitled "Reduced expression of the murine HLA-G homolog Qa-2 is associated with malignancy, epithelial-mesenchymal transition and stemness in breast cancer cells" for publication in Scientific Reports. Thank you for choosing to publish your work with us.

You should have just received another email from scientificreports@nature.com with instructions for the next step, which is to complete your publication agreements. To continue with your publication agreements you will need to create a new account on this new system. Please complete these as soon as possible so we can start preparing your manuscript for publication. The agreements include the licence, which defines the terms of publication, and billing information for your Open Access article. Please see our <http://www.nature.com/openresearch/publishing-with-npg/article-processing-charges-faqs/?shunter=1484759720810> for further information about article processing charges.

After we've prepared your paper for publication, you will receive a PDF proof for checking. At that point, please check the author list and affiliations to ensure that they are correct. For the main text, only errors that have been introduced during the production process or those that directly compromise the scientific integrity of the paper may be corrected at this stage. Please ensure that only one author communicates with us and that only one set of corrections is returned. The corresponding (or nominated) author is responsible on behalf of all co-authors for the accuracy of all content, including spelling of names and current affiliations.

To ensure prompt publication, your proofs should be returned within two working days; please contact SciRep.Production@nature.com immediately if you wish to nominate a contributing author to receive the proofs on your behalf.

Acceptance of your manuscript is conditional on all authors' agreement with our publication policies (see <http://www.nature.com/srep/policies/index.html>). In particular, your manuscript must not be published elsewhere and there must be no announcement of this work to any media outlet until the publication date is confirmed. We will inform you by email as soon as your manuscript is scheduled for publication, which will be after we have received and approved your proof corrections. Advice about media relations is available from the Nature Research press office at press@nature.com.

Your article will be open for online commenting on the Scientific Reports website. You may use the report facility if you see any comments which you consider inappropriate, and of course, you can contribute to discussions yourself. If you wish to track comments on your article, please register for this service by visiting the 'Comments' section in the full text (HTML) version of your paper.

A form to order reprints of your article is available at <http://www.nature.com/reprints/author-reprints.html>. To obtain the special author reprint rate, orders must be made within a month of the publication date. After that, reprints are charged at the normal (commercial) rate.

We look forward to publishing your article.

Best regards,

Karen Blyth
Editorial Board Member
Scientific Reports

P.S. If appropriate, you may also consider uploading any biologically- or biomedically-related protocols used in this manuscript to the protocol exchange, part of our on-line web resource, nature.com/protocolexchange. By participating, you are enabling researchers to more readily reproduce or adapt the methodology you use. The protocol exchange is fully searchable, providing your protocols and paper with increased utility and visibility. Please submit your protocol to <http://protocols.nature.com/manuscripts>. After entering your nature.com username and password you

http://mts-srep.nature.com/cgi-bin/main.plex?form_type=view_decision_letter&_id=110&ms_id=144597&ms_rev_no=1&ms_id_key=ftdobUY7rI9uYqHPxv... 1/2

2017-6-28

Scientific Reports

will need to enter your manuscript number (SREP-17-08665A). Further information can be found at www.nature.com/protocolexchange.

[Print Email](#)[Close Window](#)

[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#) | [terms of use](#)