

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

TESE DE DOUTORADO

**MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES: UM POTENCIAL ALVO
TERAPÊUTICO EM CÂNCER DE MAMA**

**Belo Horizonte
2018**

DIEGO CARLOS DOS REIS

**MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES: UM POTENCIAL ALVO
TERAPÊUTICO EM CÂNCER DE MAMA**

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.

Área de concentração: Patologia Investigativa
Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali
Coorientadores: Prof. Dr. Enio Ferreira e Prof. Dr. Remo de Castro Russo

Belo Horizonte

2018

Reis, Diego Carlos dos.

R375m Macrófagos associados a tumores [manuscrito]: um potencial alvo terapêutico em Câncer de Mama. / Diego Carlos dos Reis. - - Belo Horizonte: 2018. 123f.: il.

Orientador (a): Geovanni Dantas Cassali.

Coorientador (a): Enio Ferreira; Remo de Castro Russo.

Área de concentração: Patologia.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Macrófagos. 2. Talidomida. 3. Neoplasias da Mama. 4. Metástase Neoplásica. 5. Imunoterapia. 6. Versicanas. 7. Inflamação. 8. Dissertação Acadêmica. I. Cassali, Geovanni Dantas. II. Ferreira, Enio. III. Russo, Remo de Castro. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WH 650

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA



ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO DIEGO CARLOS DOS REIS

Realizou-se, no dia 10 de dezembro de 2018, às 14:00 horas, CAD-1 - Sala 302/UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES: UM POTENCIAL ALVO TERAPÊUTICO EM CÂNCER DE MAMA*, apresentada por DIEGO CARLOS DOS REIS, número de registro 2014654039, graduado no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Geovanni Dantas Cassali - Orientador (UFMG), Prof. Remo de Castro Russo (UFMG), Prof. Enio Ferreira (UFMG), Prof(a). Luciola da Silva Barcelos (UFMG), Prof. André Luís Branco de Barros (UFMG), Prof(a). ROSY IARA MACIEL DE AZAMBUJA RIBEIRO (UFSJ - Divinópolis), Prof(a). Sílvia Ligório Fialho (FUNED).

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, 10 de dezembro de 2018.

Prof. Geovanni Dantas Cassali (Doutor)

Prof. Remo de Castro Russo (Doutor)

Prof. Enio Ferreira (Doutor)

Prof(a). Luciola da Silva Barcelos (Doutora)

Prof. André Luís Branco de Barros (Doutor)

Prof(a). Rosy Iara Maciel De Azambuja Ribeiro (Doutora)

Prof(a). Sílvia Ligório Fialho (Doutora)

DEDICATÓRIA

Aos sonhadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a força divina, luz de todos os dias. Inspiração de tantas horas. O apanhador de corações.

Meus pais e meus irmãos minha eterna gratidão. Minhas cunhadas e sobrinhos, a todos vocês agradeço pelos sorrisos fáceis e os momentos de apoio e descontração.

Ao meu orientador professor Geovanni, agradeço por todo apoio, ensinamentos e os anos de convivência. Serei sempre grato às portas abertas e confiança que me foi dedicada.

Ao meu coorientador Enio, minha gratidão vem de muito longe. Obrigado pela aquela primeira aula de metodologia de pesquisa na graduação, por me fazer acreditar que tudo era possível, pelos ensinamentos, amizade, correções e tantas horas de longas conversas.

Ao meu coorientador Remo, agradeço pelo incentivo, ensinamentos, amizade e as infinitas correções.

À Rubia Camilo, minha amiga conterrânea e companheira de muitos anos. Por todos os cafés e refeições compartilhadas, as horas de conversas, os encorajamentos, aquele acolhimento ao final de cada dia difícil. Certamente sem você, minha cara amiga, Belo Horizonte não teria sido tão bela assim.

À Michele e o professor Dawidson, pela confiança e amizade que me dedicaram. Por terem ajudado o meu sonho do doutorado sanduíche se tornar possível.

Aos meus amigos do LPC, aos que já se foram: Conrado, Liliane, Istéfani, Thiago, Marina, Cecília, Karine, Stéfane, Miriã e os que ainda ficaram: Emerson, Bruna, Fernanda Camargo e Aline, obrigado por fazer a caminhada parecer mais fácil.

A todos os alunos e alunas de iniciação científica que diretamente ou indiretamente ajudaram nesse trabalho, em especial a Maria, Ana Carolina, Fernanda Freitas, Gabriela, Carla, Josi e Renato.

Aos alunos de pós-graduação Matheus, Luciana, Nati, Lucas, Tamara, Greg e Vítor, obrigado pela colaboração neste trabalho.

A todos os professores, alunos de pós-graduação, técnicos de laboratório, secretárias do departamento de patologia e da Faculdade de Medicina que participaram de diferentes formas na minha formação.

Ao Kurt Schalper e toda sua equipe do *Translational Immuno-Oncology lab* em Yale, em especial o Ângelo, Franz, Shruti e Adam.

À Fernanda Lemos, uma grande anfitriã em New Haven e hoje uma grande amiga, obrigado por tudo, inclusive aquele nosso jantar natalino comendo comida árabe (o único lugar aberto).

À minha querida amiga baiana Karinex, mais do que uma colega de trabalho, vínculos que se fortaleceram para além dos desafios da pós-graduação. Agradeço muito por todo o apoio e carinho.

A Lorena, minha eterna “noiva” por toda a sua amizade, companheirismo, força e coragem. Pelo seu exemplo de baiana arretada e superação.

À Priscila Tótaro, um grande presente que a UFMG me proporcionou.

A todos meus amigos de Barão de Cocais, em especial a Yanne, Bruna, Everton, Klauder e Wallace.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À UFMG, casa de muitos sonhos e aprendizados.

Soneto I

*Dos raros, desejamos descendência,
Que assim não finde a rosa da beleza,
E morto o mais maduro, sua essência
Fique no herdeiro, por inteiro acesa.
Mas tu, que só ao teu olhar te aliás,
Em flama própria ao fogo te consumes
Criando a fome onde fartura havia,
Rival perverso de teu próprio nome.
Tu que és do mundo o mais fino ornamento
E a primavera vens anunciar,
Enterras em botão teus suprimentos:
– Doce avareza, estroina em se poupar.
Doa-te ao mundo ou come com fartura
O que lhe debes, tu e a sepultura*

William Shakespeare



UF *m* G



Yale University
School of Medicine

Este trabalho foi realizado em grande parte no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral – ICB / UFMG, com apoio financeiro do CNPq e CAPES e no *Translational Immuno-Oncology lab* do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Yale, com apoio do programa PDSE-CAPES (88881.133311/2016-01), definido pela bolsa de inserção de doutorado sanduíche.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
LISTA DE APÊNDICES	xviii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
CAPÍTULO 1	21
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Hipótese	27
1.2. Objetivos	28
CAPÍTULO 2	29
2. REFERENCIAL TEÓRICO	29
2.1. Câncer	29
2.2. Câncer de Mama	31
2.3. Inflamação e Câncer.....	37
2.4. Talidomida	44
CAPÍTULO 3	47
3. ARTIGO 1	47
3.1. Resumo	48
3.2. Introdução	48
3.3. Materiais e Métodos.....	49
3.4. Resultados	51
3.5. Discussão e Conclusão.....	57
3.6. Referências Bibliográficas	60
CAPÍTULO 4	62
4. ARTIGO 2	62
4.1. Resumo	63
4.2. Introdução	64
4.3. Materiais e Métodos.....	65
4.4. Resultados	67

4.5. Discussão	76
4.6. Conclusão.....	78
4.7. Referências Bibliográficas	79
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
7. APÊNDICES.....	97
APÊNDICE A: Projeto Doutorado Sanduíche.....	97
7.1. Introdução	97
7.2. Metodologia	98
7.3. Resultados Parciais e Discussão	101
7.4. Conclusão Parcial.....	114
7.5. Referência Bibliográfica	115
APÊNDICE B: Produção Científica	117
ANEXOS	122
ANEXO 1: Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal	122
ANEXO 2: Comprovante de submissão do artigo 2	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil imunofenotípico usados para a classificação molecular de tumores de mama	35
---	----

Artigo 1 - Versican and Tumor-Associated Macrophages Promotes Tumor Progression and Metastasis in Canine and Murine Models of Breast Cancer

Table 1: Spearman's correlation analyses between versican expression and macrophages, cytokines, chemokines, angiogenesis, collagen deposition, and lung metastasis in 4T1 primary tumor	54
--	----

Table 2: Spearman's correlation analyses among versican expression and macrophages, cytokines, chemokines, and leukocytes in the 4T1 pulmonary metastases	57
---	----

Artigo 2 - Evaluation of the immunomodulatory activity of thalidomide on tumor-associated macrophages in 4T1 murine metastatic breast cancer model

Table 1: Thalidomide effects in serum of 4T1 tumor-bearing mice.....	68
--	----

Table 2: Thalidomide effects in hematological index of 4T1 tumor-bearing mice.....	68
--	----

Projeto Doutorado Sanduíche: Análise da via de CSF1R em câncer de pulmão

Tabela 1: Mapa do TMA – 372, composto por tecidos e diferentes linhagens celulares.....	106
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1 - Versican and Tumor-Associated Macrophages Promotes Tumor Progression and Metastasis in Canine and Murine Models of Breast Cancer

Figure 1 - Expression and distribution of versican and TAMs in spontaneous canine mammary carcinomas	51
Figure 2 - Expression and distribution of versican and TAMs during 4T1 mammary carcinoma progression in mice	52
Figure 3 Inflammation milieu in primary tumor during 4T1 breast carcinoma in mice	54
Figure 4 - Angiogenesis and tissue remodeling during 4T1 breast carcinoma in mice	55
Figure 5 - Expression and distribution of versican and metastasis in lungs during 4T1 breast cancer progression in mice	56
Figure 6 - Pulmonary inflammation related to 4T1 mammary carcinoma metastasis progression in mice	58
Figure 7 - Assessment of pulmonary mechanic functions at different stages of lung metastasis during 4T1 breast carcinoma metastasis progression in mice	59

Artigo 2 - Evaluation of the immunomodulatory activity of thalidomide on tumor-associated macrophages in 4T1 murine metastatic breast cancer model

Figure 1 - Thalidomide decreased 4T1 tumor growth associated with increased tumor inflammatory infiltration	69
Figure 2 - Thalidomide reduces the neoplastic proliferation of primary tumor and lung metastases of the 4T1 tumor.....	71
Figure 3 - Thalidomide administration decreased TAMs infiltration in the 4T1 primary tumor.	73
Figure 4 - Thalidomide treatment increases tissue inducible nitric oxide synthase enzyme (iNOS) expression in primary tumors and lungs of the 4T1 tumor-bearing mice.....	75

Projeto Doutorado Sanduíche: Análise da via de CSF1R em câncer de pulmão

Figure 1: Mapa do TMA controle utilizado para as análises de QIF.	101
Figura 2: Titulação do anticorpo anti-CSF1R (clone SP211, Abnova).....	102
Figura 3: <i>Quantitative Immunofluorescence analyses</i> para CSF1R.....	103
Figura 4: Análise de regressão linear.	104

Figura 5: Titulação de CSF1R.....	105
Figura 6: Análise de regressão linear e distribuição entre os anticorpos anti-CSF1R (1/500, clone SP211, Abnova) e anti-CSF1R/M-CSF (1/1000, E7S2S, Cell Signaling Technology).	107
Figura 7: Análise de regressão linear e distribuição entre os anticorpos anti-CSF1R (1/100, clone SP211, Abnova) e anti-CSF1R/M-CSF (1/1000, E7S2S, Cell Signaling Technology).	108
Figura 8: Quantitative Immunofluorescence analyses para CSF1R.....	109
Figura 9: Titulação do anticorpo anti-CSF1R (clone D3O9X, Cell Signaling Technology).	110
Figura 10: Western blotting das linhagens celulares Bewo e THP-1.....	111
Figura 11: Silenciamento da proteína CSF1R.	112
Figura12: Titulação de IL-34.....	113
Figura 13: Quantitative Immunofluorescence analyses para IL-34.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

BAL - Bronchoalveolar lavage

CCL2 - Chemokine (C-C motif) ligand 2

CCR2 - C-C chemokine receptor type 2

Cdyn - Dynamic compliance forced

COX - Ciclooxygenases

CSF1 - Fator estimulador de colônia 1

CSF1R – Receptor do fator estimulador de colônia 1

CTLA-4 - Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4

CXCR-4 - C-X-C chemokine receptor type 4

DAB - 3-3'-diaminobenzidina

DAPI - 4',6-diamino-2-fenilindol

DDB1 - Proteína 1 de ligação ao DNA lesado

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EBV- Vírus Epstein-Barr

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

EGFR - Receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico

FEV100 - Forced expiratory volume at 100 ms

FEV50 - Forced expiratory volume at 50 ms

FRC - Functional residual capacity

FVC - Forced vital capacity

H&E - Hematoxilina e eosina

HER-2 - Receptor de crescimento epidermal humano tipo 2

HIF-1 α - Fator de indução de hipóxia 1 α

HIV - Vírus da imunodeficiência adquirida

HPV - Papiloma vírus humano

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IFN- γ - Interferon gama

IL-1 α , 6, 12, 23, 34 – Interleucina 1 α , 6, 12, 23, 34

INCA - Instituto Nacional de Câncer

iNOS - Oxido nítrico sintase induzível

I κ B - Inibidor quinase κ B

LPS- Lipopolissacarídeo

MDSCs - *Myeloid-derived suppressor cells*

MEC - Matriz extracelular

MMP - Metaloproteinases

NAG - N-acetyl- β -D-glucosaminidase

NF- κ B - Fator de transcrição nuclear κ B

NO - Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PD-1 - *Programmed cell death 1*

PD-L1 - *Programmed cell death ligand 1*

QIF - *Quantitative immunofluorescence*

RE - Receptores de estrógeno

Rl - *Lung resistance*

ROC1 - Proteína reguladora de culina

RP - Receptor de progesterona

RV - *Residual volume*

SIM - Sistema de Informações de Mortalidade

siRNA - *Small interfering RNA*

TAMs - *Tumor-associated macrophages*/Macrófagos associados a tumores

TGF- β 1 - Fator de transformação do crescimento beta 1

Thal - *Thalidomide*

TLR - Receptor do tipo Toll

TMA - *Tissue Microarrays*

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TRAF6 - *Tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6*

VEGF - Fator de crescimento de endotélio vascular

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A: Projeto Doutorado Sanduíche	97
Apêndice B: Produção Científica	117

RESUMO

Os macrófagos associados a tumores (TAMs) são os leucócitos mais abundantes no microambiente tumoral do câncer de mama. TAMs podem atuar no desenvolvimento neoplásico sobre diferentes mecanismos a depender do seu status de ativação. Diante das evidências do papel dessas células no microambiente tumoral, esse trabalho teve como objetivo avaliar a participação de TAMs na progressão metastática do carcinoma mamário murino 4T1 e de carcinomas mamárias espontâneas da cadela. Ademais, foi avaliado o efeito imunomodulador da talidomida como um possível alvo terapêutico na polarização de TAMs em camundongos inoculados com o carcinoma mamário murino 4T1. As células 4T1 foram inoculadas em camundongos BALB/c fêmeas para obtenção do tumor sólido e os animais foram eutanasiados em diferentes tempos de progressão tumoral (14^o, 21^o e 28^o dia de inoculação). As amostras de tumor primário e pulmão foram coletadas para a avaliação de TAMs, expressão de versican, mediadores inflamatórios, angiogênese e metástases. A espirometria forçada foi também realizada para avaliar as funções pulmonares desses animais. As amostras de carcinoma mamário espontâneo da cadela foram selecionadas e avaliadas quanto à infiltração de TAMs e expressão de versican. Em um segundo experimento, camundongos inoculados com células 4T1 receberam tratamento diário por via oral de talidomida nas doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 150mg/kg durante 24 dias. Os resultados obtidos demonstram que a infiltração de TAMs e a expressão de versican estão associadas tumores mamários de baixo grau e em estádios mais avançados. Em camundongos, TAMs e versican mostraram-se aumentados em estágios tardios de progressão tumoral e associados com aumento da inflamação e angiogênese nos tumores primários, enquanto no pulmão à infiltração de TAMs esteve associada à disfunção pulmonar devido aumentado número de nódulos metastáticos, influxo de leucócitos para as vias aéreas e elevadas quantidade de mediadores inflamatórios. O tratamento com talidomida na dose de 150 mg/kg resultou em uma redução do crescimento tumoral, diminuição da proliferação celular no tumor primário e aumento da inflamação tecidual com reduzido número de TAMs. No pulmão, o tratamento com 150 mg/kg de talidomida diminui a proliferação celular e redução no número de nódulos metastáticos associados a um aumento da inflamação com elevado número de TAMs. Tais achados nos levam a concluir que os TAMs possuem um papel importante na progressão metastática do câncer de mama e o efeito imunomodulador da talidomida pode ser uma opção terapêutica para essa doença.

Palavras chaves: macrófagos, talidomida, neoplasias da mama, metástase neoplásica, imunoterapia, versicanas, inflamação

ABSTRACT

Tumor-associated macrophages (TAMs) representing most of the leukocyte population in the tumor microenvironment of breast cancer. TAMs can act on neoplastic development over different mechanisms depending on their activation status. Considering the evidence of the critical role of these cells in the tumor microenvironment, this work aimed to evaluate the role of TAMs on the metastatic progression of 4T1 mouse mammary carcinoma and spontaneous canine mammary carcinomas. Additionally, it was evaluated the immunomodulatory effects of thalidomide as a possible therapeutic target on TAMs polarization in mice inoculated with 4T1 mouse mammary carcinoma. The 4T1 cells were inoculated into female BALB/c mice to obtain the solid tumor and the animals were euthanized at different times of tumor progression (14th, 21st and 28th day of inoculation). Primary tumor and lung were collected for the evaluation of TAMs, versican expression, inflammatory mediators, tumor angiogenesis, and metastases. Forced spirometry technique was also performed to evaluate the mice's pulmonary functions. Spontaneous canine mammary carcinomas samples were selected and evaluated for TAMs infiltration and versican expression. In a second experiment, 4T1 tumor-bearing mice received oral daily treatment of thalidomide at concentrations of 50 mg/kg, 100 mg/kg, and 150 mg/kg for 23 days. The results obtained demonstrate that TAMs infiltration and versican expression was associated to low-grade and advanced stages of canine mammary carcinomas. In mice, TAMs and versican shown higher in late stages of tumor progression and associated to increased inflammation and angiogenesis of the primary's tumors, while in the lung TAMs infiltration was associated with pulmonary dysfunction due to the increased number of metastatic nodules, airways leukocytes influx, and high inflammatory mediators' levels. In the lung, the administration of thalidomide at dose 150 mg/kg reduced the neoplastic proliferation and the numbers of metastatic nodules associated to an increase in inflammation with higher number of TAMs. In conclusion, TAMs appear to play a critical role in the metastatic progression of breast cancer, the immunomodulatory effect of thalidomide may be a therapeutic option for this disease.

Keywords: macrophages, thalidomide, breast neoplasms, neoplasm metastasis, immunotherapy, versicans, inflammation

1. INTRODUÇÃO

A palavra câncer pode ser entendida como um nome genérico, dado a um conjunto de doenças que compartilham alterações anormais no controle da proliferação, diferenciação e morte celular, que possui distribuição mundial e afeta diferentes tipos de populações, levando todos os anos à morte de milhares de pessoas em todo mundo (INCA, 2018¹).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2015, o câncer foi a primeira ou segunda causa de morte em indivíduos com idade inferior aos 70 anos em 91 países de 172 avaliados; em outros 22 países, o câncer foi a terceira ou quarta causa de morte. No ano de 2015, 8,8 milhões de pessoas morreram por câncer em todo mundo. Para ano de 2018, estimou-se 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de óbitos em todo mundo, excluindo os cânceres de pele do tipo não melanoma esse número cai para 17 milhões de novos casos e 9,5 milhões de óbitos (BRAY *et al.*, 2018).

Em termos de incidência mundial, excluindo os tumores de pele do tipo não melanoma, os quatro tipos mais comuns de câncer em 2018 foram o câncer de pulmão (2,0 milhões), mama (2,1 milhões), próstata (1,2 milhão) e colón (1,0 milhão). O câncer de pulmão apresentou a maior taxa de mortalidade (18,4% de todos os cânceres diagnosticados), seguido pelo câncer de cólon e reto (9,2%), estômago (8,2%) e fígado (8,2%). Entretanto, diferenças são observadas quando se avalia o gênero. Em homens, o câncer de pulmão foi responsável pelas maiores taxas de incidência e mortalidade, seguido pelo câncer de próstata e câncer de cólon e reto para incidência e câncer de fígado e estômago para mortalidade. Em mulheres, o câncer de maior incidência e mortalidade foi o câncer de mama, seguido pelo câncer de cólon e reto e câncer de pulmão. O câncer cervical em mulheres representou a quarta causa de mortalidade e incidência (BRAY *et al.*, 2018).

A taxa de mortalidade mundial por câncer difere um pouco da taxa de incidência, uma vez que as principais causas de morte estão associadas ao tumor² de pulmão, estômago e fígado. Sendo assim, para qualquer tipo de câncer, a relação de incidência com a mortalidade é uma

¹ Disponível em: <http://www2.inca.gov.br>. Acesso em: 17 de julho de 2018.

² **Tumor:** qualquer lesão expansiva ou intumescimento localizado, podendo ser causado por outras lesões, tais como inflamações, hematomas, etc. Neste texto, o termo tumor será empregado como sinônimo de neoplasia, ou seja, qualquer lesão expansiva formada por aumento do número de células neoplásicas.

indicação de prognóstico (favorável ou desfavorável). Taxas semelhantes de incidência e mortalidade são indicadoras de uma condição essencialmente fatal (STEWART; KLEIHUES, 2003).

No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o ano de 2018, estimou-se a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil novos casos), os tipos de câncer com maior frequência foram os cânceres de próstata (68.220) em homens e mama (59.700) em mulheres. O perfil epidemiológico do Brasil assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata em homens e mama em mulheres foram os mais frequentes. Além desses tipos mencionados, encontramos o câncer de cólon e reto (intestino – 36.360 novos casos), pulmão (31.270), estômago (21.290), colo do útero (16.370), cavidade oral (14.700), sistema nervoso central (11.320), leucemias (10.800) e esôfago (10.970) como os tipos de câncer com maior incidência no Brasil (INCA, 2018).

Embora novas terapias e métodos diagnósticos mais eficazes tenham avançado nas últimas décadas, o câncer ainda consiste em um desafio para a saúde pública mundial, sobretudo devido à alta taxa de mortalidade e morbidade que alguns tipos de câncer ainda apresentam (STEWART; KLEIHUES, 2003). Nesse contexto, as pesquisas na área oncológica tornam-se essenciais para melhor compreender aspectos patofisiológicos desse conjunto de doenças, no intuito de prevenir novos casos, bem como o tratamento desses pacientes. Sendo assim, esse trabalho se situa no contexto dos estudos envolvendo o sistema imune e câncer. Para tal, foram utilizados tumores mamários espontâneos da mama de cadelas (CASSALI *et al.*, 2011) e um modelo murino metastático de câncer de mama (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001). Adicionalmente, foi realizada a avaliação do potencial imunoterapêutico da talidomida (VON MOOS *et al.*, 2003), sobretudo, com o foco principal no efeito desse fármaco na imunomodulação de macrófagos associados a tumores (TAMs) infiltrados na lesão primária e suas metástases pulmonares.

O sistema imunológico é a principal arma de defesa contra diversos patógenos e as células cancerosas (COUSSENS; WERB, 2002). Diversos estudos têm demonstrado o papel dual do sistema imunológico no desenvolvimento das neoplasias (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; COUSSENS; WERB, 2002; ALLAVENA *et al.*, 2008a; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; GRIVENNIKOV, 2013; PALUCKA; COUSSENS, 2016). Dentre as respostas imunes em vertebrados, podemos separá-las em respostas da imunidade inata ou natural e

respostas da imunidade adaptativa ou adquirida. A imunidade inata fornece resposta inicial rápida a uma infecção, em minutos a horas, e é relativamente inespecífica. Seu componente celular compreende células *natural killer* (NK), células linfoides inatas (ILCs) e fagócitos como monócitos, macrófagos e neutrófilos. Este último grupo de células pode envolver bactérias e partículas. O sistema complemento, junto com uma grande variedade de defensinas, quimiocinas e citocinas, compreende o componente humoral (não celular) do sistema imunológico inato. Ele fornece um mecanismo de defesa do hospedeiro por meio da ativação de uma complexa maquinaria de proteínas precursoras, que após ativação desencadeia uma cascata de amplificação de clivagem de proteínas, resultando na fixação do complemento. O sistema complemento ativado pode induzir inespecificamente a ruptura da parede celular de microrganismos invasores e, por meio da opsonização (processo em que ocorre a ligação de proteínas a uma partícula), facilitar a limpeza de materiais estranhos e restos celulares pelos os fagócitos (MULDER, 2019).

As respostas imunes adaptativas são realizadas por linfócitos T e B que reconhecem especificamente um patógeno, proliferam e se tornam ativados contra esse patógeno. Essas células também constroem uma memória imunológica daquela infecção específica. A especificidade da resposta do sistema imune adaptativo é mediada pela recombinação dos genes da imunoglobulina no nível dos linfócitos. A memória imunológica resulta em uma resposta imune mais rápida e quantitativamente melhor (em comparação com a resposta imune inata) contra um antígeno encontrado anteriormente (MULDER, 2019).

Grande parte dos estudos envolvendo o sistema imune como uma ferramenta terapêutica na oncologia, vem utilizando a imunidade adaptativa (VESELY *et al.*, 2011; BAJGAIN *et al.*, 2018). Contudo, o sistema imune inato tem sido mostrado cada vez mais importante para o sucesso terapêutico, bem como a ineficácia de diversas terapias antitumorais (MANTOVANI; ALLAVENA, 2015; KUMAR *et al.*, 2017; MULDER, 2019).

Conseqüentemente, nos últimos anos as pesquisas vêm direcionando esforços para criação de novas terapias baseadas na imunomodulação das células que compõem a imunidade inata, tais como macrófagos (KUMAR *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2014), células dendríticas (SABADO; BALAN; BHARDWAJ, 2017) e células *Natural Killer* (NK) (NAIR; DHODAPKAR, 2017; TERABE; BERZOFSKY, 2004, 2007) e células T $\gamma\delta$ (MORANDI *et al.*, 2020).

Dentre as modalidades terapêuticas em oncologia, tais como cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapia-alvo, as imunoterapias têm sido consideradas um novo pilar no combate ao câncer. Em geral, as imunoterapias são caracterizadas por usar componentes do próprio sistema de defesa no combate as células neoplásicas. Anticorpos monoclonais, transferências de células T (*CAR T- cell therapies*), vacinas e terapias não específicas (utilizando fármacos imunomoduladores, tais como a talidomida, lenalidomida, pomalidomida, etc) e adjuvantes, são as mais estudadas (KHALIL *et al.*, 2016).

Embora grande avanço tenha sido encontrado na última década no tratamento do câncer de pulmão, melanoma e câncer renal usando as imunoterapias, sobretudo aquelas baseadas em anticorpos monoclonais bloqueadores da via *programmed cell death 1* (PD-1)/*programmed cell death ligand 1* (PD-L1), poucos estudos foram realizados em câncer de mama de estadió avançado e os mesmos ainda parecem controversos (DUA; TAN, 2017; VONDERHEIDE; DOMCHEK; CLARK, 2017). Em parte, os tumores de mama triplo-negativos (negativos para receptores de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-2) e tumores de mama em estadió avançado, mostram-se pouco infiltrados por linfócitos quando comparado com câncer de pulmão, renal e melanoma (*The Cancer Genome Atlas*³) e as células neoplásicas de mama também tendem a expressar menores taxas das proteínas PD-1/PD-L1, o que tem sido sugerido como justificativa da modesta resposta terapêutica encontrada para esses tumores (VONDERHEIDE; DOMCHEK; CLARK, 2017). Ainda, recentemente, os TAMs foram mostrados associados à resistência terapêutica usando anticorpos monoclonais anti-PD-1/PD-L1 (ARLAUCKAS *et al.*, 2017), o que poderia também ser um mecanismo adicional aos resultados pouco eficientes encontrados nos estudos com imunoterapia em câncer de mama, uma vez que esses tumores são altamente infiltrados por macrófagos (RUFFELL *et al.*, 2012).

Diante do exposto, os estudos envolvendo os mecanismos imunes da doença primária e metastáticas do câncer de mama são necessários para uma melhor compreensão dessa doença, no intuito de se obter resultados relevantes que possam ser usados em conjunto para conseguir melhores estratégias terapêuticas nesses pacientes (VONDERHEIDE; DOMCHEK; CLARK, 2017). Nesse intuito, os modelos experimentais em oncologia mamária são largamente empregados na pesquisa de agentes terapêuticos antitumorais, bem como em estudos

³ The Human Genoma Atlas: Disponível <https://cancergenome.nih.gov/>. Acesso 10 de março de 2018.

envolvendo os mecanismos patogênicos dessas neoplasias (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001; DAMASCENO *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014; LINDE *et al.*, 2018).

O carcinoma mamário murino 4T1 é um tumor pobremente imunogênico, que quando transplantado para camundongos BALB/c na região subcutânea da mama ou flanco, originará metástases para os mesmos sítios (linfonodo, pulmão, fígado, ossos e cérebro) encontrados no câncer de mama humano (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001). No Laboratório de Patologia Comparada (LPC), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), o tumor 4T1 vem sendo utilizado há alguns anos em estudos envolvendo o potencial terapêutico da talidomida como monoterapia (REIS *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2012) ou em associação com a carboplatina (SOUZA *et al.*, 2014). Os resultados destes trabalhos também deram suporte à pesquisa envolvendo o uso da talidomida em neoplasias da glândula mamária de cadelas (CAMPOS *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2017).

A talidomida é um derivado sintético do ácido glutâmico, que foi produzida pela empresa alemã *Chemie Grünenthal* e introduzida no mercado em 1954, para o tratamento de enjoos matinais em mulheres grávidas (VON MOOS *et al.*, 2003). Todavia, posteriormente, foi demonstrado a associação do uso desse fármaco e o nascimento de diversas crianças com anomalias em órgãos internos (focomelia) e em membros (LENZ; KNAPP, 1962; MCBRIDE, 1963). Após a descoberta do seu efeito teratogênico, a talidomida foi retirada do mercado. Anos mais tarde, além dos efeitos sedativo-hipnótico e teratogênico, a propriedade anti-inflamatória (MOREIRA *et al.*, 1993), anti-angiogênica (D'AMATO *et al.*, 1994) e imunomoduladora (BARTLETT; DREDGE; DALGLEISH, 2004) seriam demonstradas, tornando a talidomida uma promessa para o tratamento de doenças inflamatórias e diversos tipos de câncer (VON MOOS *et al.*, 2003). Com a descoberta do alvo molecular da talidomida relacionado à teratogenicidade, a proteína cereblon (ITO *et al.*, 2010), diversas pesquisas na oncologia ganharam impulso com esse fármaco e seus derivados lenalidomida e pomalidomida (LOPEZ-GIRONA *et al.*, 2012; MIN *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2011).

Resultados preliminares realizados por nossa equipe demonstraram uma possível ação da talidomida modulando macrófagos no sítio primário e metástases pulmonares do carcinoma

mamário murino 4T1 (REIS, 2013⁴). No entanto, nesse estudo não foi bem caracterizado o potencial imunomodulador da talidomida nessas células. Dessa forma, este trabalho pretendeu caracterizar o papel de TAMs no desenvolvimento tumoral do câncer de mama, utilizando dois modelos de estudos: carcinoma mamário murino 4T1 e carcinomas espontâneos de cadela, e os efeitos imunomoduladores da talidomida em TAMs no tumor primário e metástases pulmonares do tumor 4T1.

⁴ Avaliação da resposta inflamatória na progressão tumoral do carcinoma mamário murino 4T1 após o tratamento com diferentes doses de talidomida. Reis, D. C., 2013. Dissertação defendida ao programa de Patologia Investigativa da Faculdade de Medicina da UFMG.

1.1. HIPÓTESE

A talidomida inibe o crescimento metastático do carcinoma mamário murino 4T1 associada a uma imunomodulação de TAMs para um perfil anti-tumoral no tumor primário e suas metástases pulmonares.

1.2. OBJETIVOS

Capítulo 3

Avaliar o papel de TAMs e versican no microambiente tumoral do tumor primário e metástases pulmonares do carcinoma mamário murino 4T1 e em carcinomas mamários espontâneos da cadela.

Capítulo 4

Avaliar o efeito imunomodulatório e antitumoral da talidomida em TAMs no tumor primário e metástases pulmonares do carcinoma mamário murino 4T1.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CÂNCER

História do câncer

O câncer é um conjunto de doenças complexas, de caráter multifatorial e com distribuição mundial, que consiste na segunda causa de morte em todo mundo após as doenças cardíacas e acidente vascular encefálico (BRAY *et al.*, 2018).

O termo câncer é a tradução latina da palavra grega carcinoma (de *karkinos* = crustáceo, caranguejo), que foi empregado pela primeira vez por Galeno para descrever um tumor maligno de mama no qual as veias superficiais do órgão eram túrgidas e ramificadas, assemelhando as patas do caranguejo (LUIGI; BRASILEIRO FILHO, 2012).

Dados históricos, no entanto, demonstram que o câncer é uma doença antiga. Fósseis de dinossauros descobertos em 2003 e datados entre aproximadamente 70 a 80 milhões de anos apresentaram a evidência mais antiga dessa doença. Em humanos, os dados remontam a presença de câncer encontrado em múmias no Egito antigo a 3.000 a.C. Entretanto, achados ainda mais remotos apontam a presença de um tumor maligno em um ancestral humano, o *Australopithecus*, encontrado por Louis Leakey em 1932. Todavia, foi somente encontradas as primeiras descrições de condutas terapêuticas oncológicas na Babilônia e antigo Egito nos anos de 1750 a.C e 1600 a.C, respectivamente. Posteriormente, diversas descrições de casos de câncer e diferentes terapias foram encontradas na China (1100 a 400 a.C), Índia (500 a.C) e Peru (400 a.C). Ademais, na China por volta de 250 a.C, foi descrito no *The Nei Ching* ou o Clássico de Medicina Interna do Imperador Amarelo o primeiro quadro clínico de câncer de mama, incluindo os processos de progressão, metástases e morte, além do prognóstico de aproximadamente dez anos após o diagnóstico (<http://canceratlas.cancer.org>).

Entre 460 a 370 a.C, aproximadamente, o médico grego Hipócrates pai da medicina moderna postulou que as doenças era causadas por um desequilíbrio dos quatro humores ou fluidos corporais, sendo eles a bÍlis amarela, bÍlis negra, sangue e fleuma, e

que o câncer era resultante do acúmulo exacerbado da bile negra em um órgão particular ou região do corpo. Essa teoria da origem do câncer foi aceita durante toda a Idade Média por mais de 1.300 anos, devido à proibição religiosa da realização de autópsias, esse pensamento comprometeu grandemente os estudos sobre o câncer nesse período. Após a teoria dos humores postulada por Hipócrates, diversas outras teorias foram descritas até a descoberta dos oncogenes e os genes supressores de tumores, por volta dos anos de 1970; que ganharam impulso após o prêmio Nobel de 1962 de Watson e Crick, pela descrição da hélice helicoidal do ácido desoxirribonucleico (DNA - *desoxyribonucleic acid*). Após esse período, grande avanço foi conseguido no entendimento de como os genes funcionam e como eles podem ser lesados, isso tudo resultou na identificação de diversas substâncias químicas, radiações e vírus capazes de lesar o DNA. A esse conjunto de substâncias deu-se o nome de carcinógenos⁵ e o processo de lesão do DNA, de mutação (SUDHAKAR, 2009).

Etiologia

As células neoplásicas originam-se de células precursoras normais que sofreram alterações no DNA (fatores genéticos) ou em mecanismos que controlam a expressão gênica (fatores epigenéticos) em um ou mais genes envolvidos no controle da proliferação, diferenciação e morte celular (LUIGI; BRASILEIRO FILHO, 2012).

A extrema variação na incidência de câncer entre os tecidos reflete um paradigma importante na carcinogênese humana (BRAY *et al.*, 2018). Sabendo-se hoje que somente 5 a 10% de todos os cânceres são causados por fatores hereditários, os fatores ambientais representam parcela significativa dessa doença. Entretanto, os fatores ambientais, tais como a exposição a um dado carcinógeno, por exemplo a exposição ao tabaco aumentando o risco de câncer de pulmão, a exposição à radiação ultravioleta e o risco elevado de câncer de pele e câncer de útero, ovário e cabeça e pescoço após às infecções por HPV, aplicam-se somente as essas populações expostas a estes carcinogênicos. Ademais, os fatores ambientais por si só não explicam como um menor risco de câncer pode ser encontrado em tecidos que são expostos a alto número de substâncias mutagênicas, como por exemplo o intestino, e outros tecidos com menor

⁵ **Carcinógeno:** qualquer substância de origem física, química ou biológica capaz de induzir a formação do câncer.

exposição a essas substâncias, como o cérebro, o risco de câncer seja mais elevado (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015).

Nesse sentido, se a hereditariedade e os fatores ambientais não explicam totalmente as diferenças entre o risco de câncer em determinados órgãos. A busca por uma terceira causa levou à aceitação de um modelo estocástico, onde o risco de câncer pode ser entendido e determinado através do número de divisão de células tronco em um dado tecido. Em síntese, no modelo estocástico o câncer é visto como resultante de várias alterações genômicas simplesmente ocorridas durante o processo de replicação do DNA (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015).

Diante do exposto, a carcinogênese pode ser entendida como um processo complexo, multifásico e dependente de fenômenos genéticos e epigenéticos que resultam no surgimento de clones de células anômalas que adquirem a capacidade de se multiplicar autonomamente, invadir os tecidos vizinhos e gerar metástases. Contudo, o desenvolvimento do câncer não depende somente das alterações genéticas encontradas nas células neoplásicas, mas também através da interação entre as células neoplásicas e o estroma tumoral (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012; MAO *et al.*, 2013; NATRAJAN *et al.*, 2016).

2.2. CÂNCER DE MAMA

Epidemiologia

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comumente diagnosticado em mulheres e a principal causa de morte por câncer em todo o mundo nessa população. Estima-se que, em 2012, 1,68 milhões de novos casos de carcinoma invasivo foram diagnosticados em todo mundo, correspondendo a 25% do total de todos os casos de câncer diagnosticados em mulheres e 15% de todas as mortes por câncer nessa população. Antes dos 75 anos de idade, estima-se que 1 em cada 22 mulheres serão diagnosticadas com câncer de mama e 1 em cada 73 mulheres irão morrer por essa doença. Em homens, o câncer de mama é raro compreendendo apenas 1% do total de todos os casos de câncer de mama diagnosticados (IARC, 2016).

No ano de 2012, a estimativa global revelou que o câncer de mama foi três vezes maior que os outros tipos de câncer mais comumente encontrados em mulheres, tais

como o câncer de cólon e reto, câncer de pulmão e câncer cervical. A taxa de mortalidade do câncer de mama em mulheres mostrou-se próxima da encontrada para o câncer de pulmão e maior quando comparada aos outros tipos de câncer mais frequentes na mulher (cólon e reto e câncer cervical). Similar ao encontrado em outros tipos de câncer, a taxa de incidência e mortalidade para o câncer de mama aumenta com a idade. Mulheres com idade próximas aos 50 anos correspondem ao maior número de casos diagnosticados e de mortes por câncer de mama mundialmente (IARC, 2016).

No Brasil, para o ano de 2018 estimou-se 59.700 novos casos de câncer de mama. Dados do Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) indicaram que no ano de 2013, houve 14.388 mortes por câncer de mama, sendo dessas 14.206 mulheres e 181 homens. Apesar de considerado um câncer de bom prognóstico quando diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de óbito por câncer de mama no Brasil ainda continuam elevadas. No ano de 2013, a cada 100 mil mulheres 14 foram a óbito devido ao câncer de mama (INCA, 2018).

A sobrevida em cinco anos dessa doença aumentou globalmente nas mulheres diagnosticadas entre 2005 a 2009, excedendo 80% na Europa (excluindo o leste Europeu), Austrália, Nova Zelândia e alguns países da América do Sul e Ásia e aproximou-se a 90% nos Estados Unidos (IARC, 2016). No Brasil, as taxas saltaram de 78% nos anos de 1995 a 1999 para 87% nos anos de 2005 a 2009 (INCA, 2018). Todos esses resultados devem-se às políticas de prevenção, rastreamento precoce e melhora nas condutas terapêuticas para com essas pacientes.

Etiologia

O câncer de mama é considerado uma doença multifatorial que envolve fatores biológico-endócrinos, vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida. Os fatores de riscos para o desenvolvimento do câncer de mama estão associados ao envelhecimento, fatores econômicos e fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, sendo o maior número de filhos e maior período de amamentação um fator protetor. O histórico familiar de câncer de mama, ou seja, a presença de mulheres com mãe e irmãs acometidas têm taxas de risco aumentadas para essa doença, bem como se apresentaram algum caso de familiar com câncer de mama com idade inferior a 35 anos. A alta densidade do tecido mamário (razão entre tecido glandular e adiposo na mama), bem como os fatores relacionados aos hábitos de vida, como sedentarismo e alcoolismo, são

fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama. A maior exposição a radiações ionizantes é considerada também agente potencial para o desenvolvimento dessa doença (INCA, 2018).

Dentre os fatores de riscos acima descritos, a idade demonstra ser um dos fatores mais importantes, sendo corroborada pelo crescimento rápido da taxa de incidência em mulheres com idade até os 50 anos. Após esse período, as taxas de incidência aumentam de forma mais lenta, o que reforça uma participação dos hormônios femininos na patogênese do câncer de mama. O histórico familiar representado pelos casos de câncer de mama na família e alterações no gene BRCA1 e BRCA2 aumentam significativamente o risco de câncer de mama. Em mulheres jovens, geralmente apresentando mutações para os genes BRCA1 e BRCA2 e superexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico (HER2), os tumores de mama são mais agressivos e apresentam características clínicas e epidemiológicas diferentes das observadas em mulheres mais velhas (INCA, 2018).

A prevenção primária para o câncer de mama tem como medidas a mudança de hábitos de vida sedentários para hábitos saudáveis, como a prática de exercício físico, diminuição da gordura corporal, manutenção do peso ideal e alimentação saudável. Acredita-se que essas mudanças possam ser responsáveis pela a diminuição de até 30% dos casos de câncer de mama. Adicionalmente, a mamografia bienal é indicada para todas as mulheres com idade entre 50 a 69 anos, como uma estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde no Brasil (INCA, 2018).

Classificação

As lesões encontradas na glândula mamária da mulher são comumente classificadas em lesões benignas e lesões malignas de acordo com os critérios histopatológicos apresentados em cada lesão (LAKHANI *et al.*, 2012). As lesões benignas frequentemente não apresentam repercussão clínica para a paciente e na sua maioria não estão associadas a uma progressão para o câncer de mama, excetuando-se apenas as lesões epiteliais hiperplásicas e lesões epiteliais hiperplásicas com atipias, que aumentam o risco de câncer de mama numa magnitude de 1,5-2,0 e 2,5-4,0 vezes, respectivamente (IARC, 2016).

Os tumores de mama mais frequentes são os carcinomas invasivos, seguidos pelo carcinoma ductal *in situ* e com menor frequência o carcinoma lobular invasivo. Os carcinomas invasivos podem apresentar subtipos especiais, tais como carcinoma cístico adenoide, carcinoma metaplásico, carcinoma medular, carcinoma mucinoso, carcinoma papilífero, carcinoma tubular, carcinoma micropapilar e carcinoma misto. Os subtipos especiais podem apresentar bom prognóstico, igual ou pior quando comparado aos carcinomas invasivos (IARC, 2016).

O estadiamento clínico dos carcinomas invasivos é realizado através do método TNM, onde T (T1-4) refere-se ao tamanho do tumor, N (N1-3) linfonodos regionais acometidos por metástases e M (M0-1) à presença de metástases à distância. Tumores com estadiamento elevados (IV) são caracterizados pela presença de metástases à distância e uma condição essencialmente fatal (IARC, 2016).

A graduação histológica, proposta por Elston e Ellis (1991), é um forte método prognóstico⁶ para a graduação dos carcinomas invasivos, que leva em consideração o grau de diferenciação glandular (tubular) das células neoplásicas, o pleomorfismo nuclear e a frequência do número de mitoses. Tumores de alto grau apresentam-se geralmente pouco diferenciados, com elevado número de mitoses e associados a um pior prognóstico quando comparados a tumores de baixo grau, que por sua vez, preservam mais as características tubulares e possuem geralmente menor pleomorfismo nuclear e figuras de mitose (IARC, 2016).

Diversas alterações moleculares caracterizam os carcinomas invasores. As características imunofenotípicas de diversos marcadores estão relacionadas à sobrevida e assinaturas moleculares específicas, que sugerem a possibilidade de terapias alvos (IARC, 2016). Os marcadores empregados para a classificação molecular e as respectivas classificações estão apresentados na tabela a seguir.

⁶ Fator prognóstico: são parâmetros mensurados durante o diagnóstico capazes de prever a sobrevida da paciente, tais como o tamanho do tumor, condição dos linfonodos axilares, história familiar, grau histológico, receptores hormonais e c-erbB-2 (HER2).

Tabela 1: Perfil imunofenotípico usados para a classificação molecular de tumores de mama

Subtipo molecular	Classificação com o índice de Ki-67 a 14%
	Padrão de imunomarcção
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥14%
Superexpressão de HER2	RE+, RP+, HER2+ (luminal HER2)
Basaloide	RE-, RP- e HER2+
Triplo-negativo não basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+

HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR: receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; CK5: citoqueratina 5.

O estrogênio é um hormônio mitogênico expresso em 80% dos tumores invasivos da mama. Sua expressão está associada à resposta à terapia adjuvante hormonal com tamoxifeno, assim os tumores RE+ estão associados a um melhor prognóstico quando comparados a tumores RE-. O receptor de progesterona serve como um fator preditivo⁷ à hormonioterapia (IARC, 2016).

O ERBB2/HER2 é um oncogene amplificado em aproximadamente 20% dos carcinomas invasivos e como resultado, a proteína transmembrana com atividade cinase HER2 mostra-se superexpressa nesses tumores. A superexpressão de HER2 é um fator preditivo independente de sobrevida e também é utilizada como alvo terapêutico através do anticorpo monoclonal trastuzumab (IARC, 2016).

Os marcadores de proliferação celular, tais como o Ki-67, têm sido extensivamente empregados por seu valor prognóstico, embora a padronização nas metodologias empregadas ainda seja um fator limitante ao seu uso (IARC, 2016).

⁷ **Fator preditivo:** são parâmetros mensuráveis que irão predizer a resposta terapêutica a determinado tratamento.

Tratamento

Os avanços alcançados no diagnóstico e conduta terapêutica para o câncer de mama tem resultado largamente na redução da taxa de mortalidade e a cura das pacientes. Como o câncer de mama é uma doença diversa, com distintos tipos histológicos, assinaturas moleculares e genéticas, tem a indicação terapêutica é variada (YEO; TURNER; JONES, 2014).

Para tumores em estágios iniciais e localizados, a nodulectomia seguida de terapia adjuvante⁸ com a radioterapia são indicados (FISHER *et al.*, 2002). Em lesões extensas envolvendo dois ou mais quadrantes da mama, a mastectomia seguida de terapia adjuvante com tamoxifeno é recomendada a todos as pacientes (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2011). A pesquisa do linfonodo sentinela em detrimento do esvaziamento axilar deve ser considerada para avaliar o envolvimento da lesão e a diminuição de morbidade observada nos quadros de linfadenite (KIM; GIULIANO; LYMAN, 2006). A quimioterapia e radioterapia são indicadas para estágios iniciais de câncer de mama, sendo a terapia alvo com o anticorpo monoclonal transtuzumab indicada para os tumores com superexpressão de HER2 (YEO; TURNER; JONES, 2014).

Para os tumores localmente avançados, aqueles classificados em estágios IIIa a IIIc, ressecáveis cirurgicamente ou não, diversos protocolos podem ser empregados. A mastectomia radical modificada seguida de radioterapia e quimioterapia pode ser empregada aos tumores ressecáveis, enquanto que para os tumores não ressecáveis a terapia neoadjuvante⁹ é recomendada até que o tumor diminua e possa ser submetido à remoção cirúrgica seguida de terapia adjuvante (YEO; TURNER; JONES, 2014).

Os tumores classificados no estágio IV não tem cura e o tratamento tem como foco o aumento da sobrevida e da qualidade de vida da paciente. A primeira linha de tratamento indicado consiste de hormonioterapia para casos positivos para RE e RP e com metástases em ossos e tecidos moles ou metástases assintomáticas. Para tumores

⁸ **Terapia adjuvante:** é a terapia empregada após um tratamento considerado definitivo, tal como a cirurgia. A depender do estadiamento do tumor, a terapia adjuvante pode consistir de quimioterapia, hormonioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia-alvo.

⁹ **Terapia neoadjuvante:** é a terapia empregada anteriormente a um tratamento definitivo. Os tipos de terapia neoadjuvante são a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia alvo.

refratários, negativos para os receptores hormonais e com metástases sintomáticas em vísceras, a quimioterapia sistêmica é a mais indicada (YEO; TURNER; JONES, 2014).

Para o tratamento do câncer de mama, todos os riscos e benefícios devem ser considerados para a escolha do melhor protocolo terapêutico empregado, para cada paciente. Devido à dificuldade do manejo de pacientes com o câncer de mama em estadiamento avançado e os tumores triplo-negativos, novas pesquisas têm direcionados esforços na tentativa de obtenção de repostas mais efetivas nesses grupos. Nesse contexto, as imunoterapias vêm surgindo ainda modestamente. Os resultados preliminares com as terapias para bloqueio das vias *programmed cell death protein 1* (PD-1) / *programmed death-ligand 1* (PD-L)1 ou *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) foram pouco pronunciados ou insatisfatórios. Vacinas contra diferentes epítomos têm sido criadas e embora tenham se mostrado eficaz para gerar resposta imunológica, o benefício terapêutico tem se mostrado menos eficiente (VONDERHEIDE; DOMCHEK; CLARK, 2017). Recentemente, novos *trials* têm sido realizados combinando diferentes terapias, usando bloqueadores das vias PD-1/PD-1L combinado com vacinas, quimioterapias ou mesmo como monoterapias (<https://clinicaltrials.gov/>).

2.3. INFLAMAÇÃO E CÂNCER

Aspectos Históricos e Epidemiológicos

A primeira descrição relacionando inflamação e câncer foi realizada por Rudolf Virchow em 1863. Virchow hipotetizou que a origem do câncer se dava em sítios de inflamação crônica, sendo a lesão tecidual juntamente aos mediadores produzidos responsáveis pela proliferação celular das células neoplásicas. Décadas se passaram até que a hipótese de Virchow fosse confirmada e a inflamação aceita como um processo carcinogênico em diversos tipos de câncer (COUSSENS; WERB, 2002).

O espectro de tumores ligados a infecções revela grande diversidade. As primeiras estatísticas realizadas por Parkin *et al.* (1984) demonstraram que 15% de todos os cânceres humanos eram relacionados às infecções virais. Contudo, com a descoberta da relação entre a bactéria *Helicobacter pylori* e o câncer gástrico esse percentual foi aumentado (PARKIN *et al.*, 2005). Posteriormente, mostrou-se que as estatísticas de Parkin e colaboradores haviam subestimado os tumores de orofaringe associados às

infecções pelo papilomavírus humano (HPV). Assim, estudos posteriores mostraram que 25% desses tumores estavam associados ao HPV (JEMAL *et al.*, 2011). As estimativas também não incluíram 10% de tumores gástricos causados pelo vírus Epstein-Barr (EBV). Consequentemente, dados atuais incluindo todos os cânceres de genitálias relacionados ao HPV, leucemia de linfócitos-T em adultos, sarcoma de *Kaposi* e os cânceres causado por infecções parasitárias, mostram que as infecções são responsáveis por um pouco mais de 20% de todas as causas de câncer em todo mundo (PARKIN; STJERNWARD; MUIR, 1984; HAUSEN, 2006a; JEMAL *et al.*, 2011; BRAY *et al.*, 2018).

A diferença entre a taxa de incidência de câncer relacionado às infecções em homens e mulheres é notável. Em mulheres o alto risco de infecção por HPV é a principal causa de câncer cervical enquanto que em homens as infecções por esse vírus apresentam um papel pequeno. Em contrapartida, a infecção por *H. pilory* em homens representa a principal causa de câncer gástrico. Ademais, fatores socioeconômicos refletem grandes diferenças na distribuição geográfica de cânceres relacionados às infecções, sobretudo quando comparados com países desenvolvidos e em desenvolvimento (PARKIN; STJERNWARD; MUIR, 1984; HAUSEN, 2006a; JEMAL *et al.*, 2011; BRAY *et al.*, 2018).

Relação entre inflamação e câncer

A lesão tecidual por agentes químicos, físicos e infecciosos resulta em eventos múltiplos que constituem a resposta inflamatória. A inflamação é um mecanismo importante que age no sentido de eliminar o agente lesivo, reparar os danos causados e reestabelecer a homeostase do tecido ou órgão. O processo inflamatório envolve mecanismos diversos de ambas as imunidades inata e adaptativa, que são caracterizadas por células e mediadores específicos que coordenadamente extravasam do sangue para os locais de lesão. Todavia, em processos crônicos, quando o agente lesivo não é eliminado ou o estímulo à lesão persiste, a inflamação pode levar a alterações em genes relacionados ao câncer e modificações em proteínas envolvidas no ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (COUSSENS; WERB, 2002; EIRO; VIZOSO, 2012; PALUCKA; COUSSENS, 2016).

O surgimento de determinada lesão neoplásica em resposta a um agente infeccioso é um processo complexo, que pode estar relacionado a mecanismos diretos e indiretos.

Alguns agentes infecciosos, tais como os vírus, são capazes de integrar seu material genético nas células do hospedeiro e causar modificações em genes importantes no controle de proliferação celular. Assim, as células transformadas adquirem a capacidade de imortalização e se multiplicam indefinidamente. Proteínas virais produzidas podem também se associar a proteínas do hospedeiro, tal como a proteína viral E6 do HPV que se liga à proteína supressora tumoral p53, resultando na degradação desse complexo no proteossomo (HAUSEN, 2006b). A p53 é uma importante proteína no reparo do DNA, as células lesadas no material genético que não foram reparadas são induzidas à apoptose através da proteína p21. Embora o material genético viral possa ser encontrado em células humanas em sítios de lesão neoplásica, a relação de casualidade entre infecção e câncer ainda é um processo obscuro para diversos vírus (KOCH, 2006). Em agentes infecciosos, tais como bactérias e parasitas, o processo de carcinogênese parece estar associado às células inflamatórias e mediadores produzidos. A lesão persistente levará a alterações em genes e mecanismos importantes de controle da proliferação celular, reparo do DNA e apoptose (HAUSEN, 2006c).

Doenças crônicas de caráter não infeccioso também estão relacionadas ao surgimento de câncer. Nesse contexto, os exemplos mais bem conhecidos são a doença de Chron e colite ulcerativa associada ao câncer de cólon e reto, cirrose alcoólica levando ao carcinoma hepatocelular e a prostatite e câncer de próstata (BRAY *et al.*, 2018). Em todos esses processos crônicos, as agressões sucessivas ao DNA e a exposição a diversos mediadores inflamatórios desencadeiam no surgimento das células transformadas (COUSSENS; WERB, 2002).

Microambiente tumoral

O microambiente tumoral é constituído por células neoplásicas e células estromais, que incluem fibroblastos, células endoteliais, pericitos e vários tipos de leucócitos (COUSSENS; WERB, 2002; BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012; QUAIL; JOYCE, 2013). No câncer de mama, os leucócitos representam mais de 50% de todas as células estromais (RUFFELL *et al.*, 2012). Em estágios precoces da tumorigênese, as células neoplásicas e estromais respondem à hipóxia e necrose, resultantes da proliferação exacerbada das células neoplásicas, produzindo quimiocinas e fatores de crescimento que serão responsáveis pela migração de monócitos e macrófagos. Tais fatores incluem o fator estimulador de colônia 1 (CSF1) e fator de transformação do

crescimento beta (TGF- β 1). A interação entre monócitos/macrófagos e as células tumorais levam à liberação de diversos fatores quimiotáticos e citocinas que serão responsáveis pelo recrutamento dos demais leucócitos para o microambiente tumoral (LI; FAN; HOUGHTON, 2007; EIRO; VIZOSO, 2012).

A princípio acreditava-se que os leucócitos recrutados seriam responsáveis pela imunidade antitumoral, numa tentativa de o próprio organismo eliminar as células neoplásicas (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). De fato, vários estudos foram conduzidos evidenciando o papel da imunidade inata e adaptativa como potentes efetores da imunidade antitumoral (BROWN *et al.*, 2014; NAIR; SCHALPER *et al.*, 2015; DHODAPKAR, 2017). Contudo, outras evidências levaram ao reconhecimento de que a infiltração de leucócitos resultava também na progressão neoplásica através de mediadores produzidos no microambiente tumoral, tais como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteases (MORRIS; KONG, 2004; QIAN *et al.*, 2011; SHIELS *et al.*, 2013; TANG, 2013; WEI; YEUNG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2014; ZAYNAGETDINOV *et al.*, 2015).

Evidências ao longo dos anos foram acumuladas e hoje se sabe que a alta infiltração de leucócitos está associada a um pior prognóstico no câncer de pulmão (MEI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2011) e câncer de mama (RUFFELL *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2017), enquanto em câncer de cólon e reto (MOJARAD; ESAFAHANI; ZALI, 2018), câncer de ovário (DARB-ESFAHANI *et al.*, 2018) e câncer gástrico (LEE *et al.*, 2018) a infiltração de leucócitos pode estar associado a um bom prognóstico. Conjuntamente esses dados sugerem que em determinadas situações os leucócitos podem apresentar um papel efetor na imunidade antitumoral, enquanto em outras situações a infiltração dessas células estará relacionada ao favorecimento de mecanismos relacionados à progressão tumoral.

Diante do exposto, os estudos subsequentes vêm direcionando esforços para a caracterização dos perfis de leucócitos presentes nas diferentes neoplasias, bem como compreender o papel dessas células e seus mediadores na progressão neoplásica (PEREZ-GRACIA *et al.*, 2017; SCHALPER *et al.*, 2017). Ainda no âmbito terapêutico, avanços têm sido alcançados utilizando componentes do sistema imune como mecanismos efetores das repostas antitumorais (KHALIL *et al.*, 2016).

A seguir será feita uma descrição dos macrófagos e seu papel na patogênese do câncer de mama, foco principal desse estudo.

Macrófagos associados a tumores

Os macrófagos são células da imunidade inata responsáveis pela defesa e manutenção da homeostase tecidual. Os macrófagos inflamatórios ou residentes são derivados de monócitos produzidos na medula óssea. Essas células precursoras migram para diferentes tecidos e se diferenciam em macrófagos que adquirem diferentes *status* de ativação em respostas às condições encontradas em cada microambiente (SUGIMOTO *et al.*, 2006; EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014). Cada perfil de ativação do macrófago é representado por um conjunto de citocinas, enzimas e marcadores moleculares de superfície (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013; TANG, 2013; SPILLER *et al.*, 2016). Em geral, os macrófagos são classificados em dois perfis: o macrófago classicamente ativado ou macrófago M1 e o macrófago alternativamente ativado ou M2. Macrófagos classicamente ativados são produzidos através da citocina do tipo Th1interferon- γ (IFN- γ), produtos da parede de bactérias como o lipopolissacarídeo (LPS) e agonistas de receptor do tipo Toll (TLR). Macrófagos M1 são caracterizados pela produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina (IL) 6, 12 e 23, óxido nítrico (NO) e a expressão elevada de moléculas de superfície do complexo de histocompatibilidade de classe 1 e 2. Consequentemente, os macrófagos M1 são responsáveis por respostas pró-inflamatórias e antitumorais. Por sua vez, os macrófagos alternativamente ativados apresentam propriedades anti-inflamatórias e pró-tumorais e podem ser subdivididos em M2a, M2b, M2c e M2d (CHANMEE *et al.*, 2014). As citocinas do tipo Th2 IL-4 e IL-13 são responsáveis pela ativação do macrófago M2a, enquanto os macrófagos M2b são ativados na presença de imunocomplexos e agonistas de TLRs, na presença de IL-10 os macrófagos polarizam para o perfil M2c, macrófagos M2d são vistos por apresentarem o mesmo perfil de ativação de TAMs (SICA; MANTOVANI, 2012; BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013; ITALIANI; BORASCHI, 2014; MANTOVANI *et al.*, 2004; MURRAY *et al.*, 2014; SPILLER *et al.*, 2016).

O recrutamento de monócitos e macrófagos para os tumores é regulado por diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento produzidos pelas células tumorais e pelas células estromais no microambiente tumoral (CHANMEE *et al.*, 2014). Dentre os

fatores produzidos, destaca-se a quimiocina CCL2 em câncer de mama. A expressão desse quimiotático tem sido associada a um pior prognóstico, maior infiltração de TAMs, aumento da angiogênese e metástases (CONTI; ROLLINS, 2004; SORIA; BEN-BARUCH, 2008; QIAN *et al.*, 2011). De fato, CCL2 atua como potente quimiotático para monócitos, macrófagos e linfócitos ao se ligar ao receptor CCR2. CCL2 também induz a diferenciação de linfócitos Th0 através de uma resposta do tipo Th2 com a produção de IL-4, que por sua vez favorece a polarização de TAMs M2. O recrutamento e a polarização desses macrófagos para o microambiente tumoral favorecerá também a angiogênese através da produção do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF). Macrófagos recrutados para os sítios tumorais respondem à hipóxia tecidual com a polarização de macrófagos imunossupressores M2. A produção de citocinas de caráter anti-inflamatório levará também a uma diminuição da resposta antitumoral por outros leucócitos (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; CONTI; ROLLINS, 2004; YANO *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2013; TANG, 2013; CHANMEE *et al.*, 2014).

Angiogênese tumoral, versican e metástases

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos que possui um papel essencial no crescimento e metastatização do câncer de mama (SCHNEIDER; MILLER, 2005). Estudos em modelos animais revelam que o processo de neoformação vascular precede a transformação maligna de células hiperplásicas para neoplásicas e a inibição da angiogênese resulta em uma diminuição do crescimento tumoral e metástases. No carcinoma invasivo de mama, a expressão de diversos fatores pró-angiogênicos é comumente observada e a alta densidade vascular está associada a tumores de estágios mais avançados e com maior taxa de metástases (SCHNEIDER; MILLER, 2005). Diversos processos estão associados à formação dos novos vasos sanguíneos no microambiente tumoral (FERRARA; K; ALITALO, 1999; FERREIRA *et al.*, 2004; FU *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2013; ASANO *et al.*, 2017), dentre eles a hipóxia tecidual e o recrutamento e a presença de TAMs nessas áreas tem se mostrado fortemente associados. A hipóxia tecidual leva a polarização de macrófagos para um perfil pró-tumorigênico através do fator de indução de hipóxia 1α (HIF- 1α), essas células ativadas por HIF- 1α aumentam a expressão de genes de CXCR4 e diminui a expressão de CCR2 e CCR5. Como resultado, há um aumento da afinidade do receptor CXCR4 pela quimiocina CXCL12, macrófagos e monócitos que expressam esse

receptor migram para os sítios de hipóxia, enquanto a migração em resposta a quimiocina CCL2 é diminuída pela diminuição da expressão de seus receptores (CCR2 e CCR5). HIF-1 α aumenta também a expressão dos genes de VEGF-A e de enzimas da família das metaloproteinases (MMPs). Como resultado, esses macrófagos produzem diferentes MMPs que degradam proteínas da membrana basal das células endoteliais. Na presença de VEGF e outros fatores de crescimento haverá a formação dos primeiros brotamentos de novos vasos sanguíneos, dando início assim ao processo de angiogênese tumoral (CHANMEE *et al.*, 2014; ASANO *et al.*, 2017).

A produção e ação de diferentes MMPs por TAMs não restringirá apenas a formação de novos vasos sanguíneos (FU *et al.*, 2011), diversos trabalhos demonstram que a quebra de componentes da matriz extracelular (MEC) por essas enzimas acarretará em um processo de modulação do sistema imune e remodelação tecidual que favorecerá a migração e invasão de células neoplásicas (SZABO; SINGH, 2005; LU; WEAVER; WERB, 2012; BOCKSTAL *et al.*, 2014; NABA *et al.*, 2014). Os leucócitos interagem com a matriz extracelular através de ligantes específicos expressos em diferentes componentes da matriz, que fornecem a ancoragem necessária para que essas células migrem em respostas aos diferentes fatores quimiotáticos produzidos no microambiente tumoral. A interação através do receptor CD44 em macrófagos ao ácido hialurônico e/ou versican, dois componentes da MEC, resulta na ativação dessas células e consequente produção de citocinas, quimiocinas, proteases e fatores de crescimento (WIGHT; KANG; MERRILEES, 2014a). O versican é um proteoglicano de matriz extracelular que é expresso em altas quantidades durante o período embrionário e sua produção é reduzida durante o período adulto, todavia, sua expressão é aumentada em processos inflamatórios e nas neoplasias. No câncer de mama, a expressão estromal elevada de versican tem sido associada à progressão disseminação metastática das células neoplásicas. Ainda, a indução da expressão desse proteoglicano nas células neoplásicas indica um caráter invasor no carcinoma de mama (FAN; HOUGHTON, 2007; KISCHEL *et al.*, 2010; LI; MAO *et al.*, 2013; GOSWAMI *et al.*, 2016; ASANO *et al.*, 2017;).

A formação de metástases é um processo complexo e envolve a supressão de diversos genes nas células neoplásicas e a expressão de tantos outros que permitirão o destacamento dessas células da massa primária e invasão nos tecidos adjacentes. Uma vez que penetram nos vasos sanguíneos e linfáticos, as células neoplásicas precisam

vencer os mecanismos efetores de defesa imune e as forças de cisalhamento proporcionadas pela circulação sanguínea até que consigam transmigrar dos vasos e colonizar outros órgãos e tecidos. A predileção das células tumorais por determinados órgãos-alvos para metástases tem sido o paradigma de diversos estudos. O consenso obtido corrobora com a teoria do solo fértil, aonde as células neoplásicas irão somente estabelecer em um órgão secundário caso haja todas as condições necessárias à colonização (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006). Nesse contexto, o recrutamento de monócitos inflamatórios e TAMs para os sítios metastáticos são mostrados como etapa importante na formação de metástases no câncer de mama. Os estudos revelam que essas células migram em estágios precoces de progressão tumoral para tecidos específicos e que a formação das metástases é facilitada pela presença dessas células nos órgãos alvo de metástases (LU; KANG, 2009; QIAN *et al.*, 2011).

As evidências acima descritas apontam os macrófagos como leucócitos que possuem um papel central no microambiente tumoral. A relação dessas células em diversos mecanismos de progressão tumoral faz delas um potencial alvo terapêutico em oncologia. Assim, buscando estratégias eficazes direcionadas a eliminar essas células no microambiente tumoral ou mesmo reprogramá-las a um perfil antitumoral, estudos experimentais têm sido conduzidos utilizando fármacos, anticorpos monoclonais e silenciamento de RNA (siRNA) (QIAN *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2014). Resultados satisfatórios foram encontrados em diferentes modelos de lesões neoplásicas, contudo a transposição dos mesmos para a clínica ainda parece ser o maior desafio (JIAN ZHANG, LALIT PATEL; PIENIA, 2010).

2.4. TALIDOMIDA

A talidomida (N-(2,6-diazo-3-piperidil)ftalimida) é um derivado sintético do ácido glutâmico inicialmente utilizada para o tratamento de enjoos matinais em mulheres grávidas (VON MOOS *et al.*, 2003) e posteriormente foi retirada do mercado após a descoberta de seus efeitos teratogênicos (LENZ; KNAPP, 1962; MCBRIDE, 1963). Anos mais tarde retornava como um potente fármaco com propriedades anti-inflamatórias (MOREIRA *et al.*, 1993), anti-angiogênica (D'AMATO *et al.*, 1994) e imunomoduladora (BARTLETT; DREDGE; DALGLEISH, 2004). Com a descoberta da proteína cereblon (CRBN), alvo molecular da talidomida relacionado à teratogenicidade (ITO *et al.*, 2010), os efeitos imunomoduladores desse fármaco e seus

derivados lenalidomida e pomalidomida têm sido largamente investigados (ZHU *et al.*, 2011; LOPEZ-GIRONA *et al.*, 2012; MIN *et al.*, 2016).

A proteína CRBN, inicialmente descoberta associada quando mutada ao retardo mental não síndrômico autossômico recessivo, forma um complexo E3 ubiquitina ligase com a proteína 1 de ligação ao DNA lesado (DDB1), culina-4A (CUL4A) e a proteína reguladora de culina (ROC1) resultando na proteólise de diversos substratos, dentre eles as proteínas *Ikaros* e *Aiolos*. Em mieloma múltiplo o silenciamento de *Ikaros* e *Aiolos* leva a diminuição dos fatores de sobrevivência e proliferação celular *interferon regulatory factor 4 (IRF4)* e *MYC*, resultando na diminuição da viabilidade celular observada após o tratamento com a talidomida e seus derivados. *Ikaros* e *Aiolos* são também fatores repressores da transcrição de IL-2, assim a degradação dessas proteínas resulta no aumento da produção de IL-2 em linfócitos após o tratamento com lenalidomida em humanos (LOPEZ-GIRONA *et al.*, 2012; CHAMBERLAIN *et al.*, 2014). Em camundongos, no entanto, a presença de dois polimorfismos no sítio de ligação à lenalidomida e a diferença em apenas um único aminoácido no receptor murino são sugeridas como as causas das diferenças encontradas desses efeitos imunomoduladores entre humanos e murinos (LOPEZ-GIRONA *et al.*, 2012; CHAMBERLAIN *et al.*, 2014; KRONKE *et al.*, 2015).

Em estudos posteriores, Min e Colaboradores (2016) identificaram mecanismos imunes adicionais relacionados à proteína CRBN. A superexpressão de CRBN em células humanas THP-1 resultou na inibição do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e na produção das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 β em resposta à ativação por TLR4. Estudos funcionais de silenciamento realizados por esse grupo revelaram que a molécula CRBN regula negativamente a via de sinalização de TLR4 através da ubiquitinação de TRAF6 (*tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6*) (MIN *et al.*, 2016). Em contrapartida, estudos realizados por outro grupo de pesquisadores revelaram que a regulação negativa de TLR4 em camundongos pela talidomida e pomalidomida pode acontecer também independentemente de CRBN (MILLRINE *et al.*, 2016a).

O potencial antitumoral da talidomida é associado a sua atividade antiangiogênica, através da redução da síntese dos fatores pró-angiogênicos (D'AMATO *et al.*, 1994; VERHEUL *et al.*, 1999; BELO *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2012), da imunomodulação

de células e citocinas no microambiente tumoral (DAVIES *et al.*, 2001; KAWAMATA *et al.*, 2006; NAU; LEWIS, 2008) e da ação anti-proliferativa (MITSIADES *et al.*, 2002).

Em relação à ação da talidomida sobre macrófagos, ainda pouco se sabe sobre o efeito desse fármaco no contexto de câncer. Todavia, em doenças inflamatórias tal como a infecção pulmonar induzida pela bactéria *Klebsiella pneumoniae B5055*, a talidomida mostrou-se um potente modulador negativo na síntese das citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-1 α (KUMAR; CHHIBBER, 2008; KUMAR; HARJAI; CHHIBBER, 2010). O mesmo foi observado em macrófagos murinos peritoneais e células de Langherans humanas tratados com talidomida (CAMPELO *et al.*, 2011). Em modelo de asma induzido por ovalbumina, a talidomida inibiu a ativação alternativa de macrófagos (M2) *in vivo* e *in vitro*, bem como reduziu a produção de citocinas do tipo Th2 por essas células (LEE *et al.*, 2015). Embora os mecanismos imunomoduladores da talidomida em macrófagos não sejam completamente compreendidos, é reconhecido que a inibição de NF- κ B via inativação do inibidor quinase κ B (I κ B) resulta na diminuição da expressão de genes relacionados às citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 α , IL-8 e IL-12 (KEIFER *et al.*, 2001; HERNANDEZ *et al.*, 2011). Ademais, o efeito anti-inflamatório da talidomida também é relacionado à inibição da síntese de ciclooxigenases (COX) induzida por LPS (FUJITA *et al.*, 2001) e da proteína Rabex-5 que regula negativamente TLR através da via de sinalização intracelular de STAT1/IRF (MILLRINE *et al.*, 2016b).

A metodologia, resultados e discussão serão apresentados na forma de artigos científicos.

CAPÍTULO 3

3. Artigo publicado na revista *Frontiers in Oncology*.

Versican and Tumor-associated Macrophages Promotes Tumor Progression and Metastasis in Canine and Murine Models of Breast Carcinoma

Diego Carlos dos Reis, Karine Araújo Damasceno, Cecília Bonolo de Campos, Emerson Soares Veloso, Gabriela Rafaela Arantes Pêgas, Lucas Rocha Kraemer, Michele Angela Rodrigues, Matheus Silvério Mattos, Dawidson Assis Gomes, Paula Peixoto Campos, Enio Ferreira, RemoCastro Russo and Geovanni Dantas Cassali



Versican and Tumor-Associated Macrophages Promotes Tumor Progression and Metastasis in Canine and Murine Models of Breast Carcinoma

Diego Carlos dos Reis^{1,2}, Karine Araújo Damasceno³, Cecília Bonolo de Campos¹, Emerson Soares Veloso¹, Gabriela Rafaela Arantes Pêgas¹, Lucas Rocha Kraemer², Michele Angela Rodrigues¹, Matheus Silvério Mattos², Dawidson Assis Gomes⁴, Paula Peixoto Campos¹, Enio Ferreira¹, Remo Castro Russo^{2†} and Geovanni Dantas Cassali^{1*†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Bernd Kaina,
Johannes Gutenberg University
Mainz, Germany

Reviewed by:

Gabriele Multhoff,
Technical University of
Munich, Germany
Heidge Fukumasu,
University of São Paulo, Brazil

*Correspondence:

Geovanni Dantas Cassali
cassali@icb.ufmg.br

† These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 29 October 2018

Accepted: 14 June 2019

Published: 03 July 2019

Citation:

dos Reis DC, Damasceno KA,
de Campos CB, Veloso ES,
Pêgas GRA, Kraemer LR,
Rodrigues MA, Mattos MS,
Gomes DA, Campos PP, Ferreira E,
Russo RC and Cassali GD (2019)
Versican and Tumor-Associated
Macrophages Promotes Tumor
Progression and Metastasis in Canine
and Murine Models of Breast
Carcinoma. *Front. Oncol.* 9:577.
doi: 10.3389/fonc.2019.00577

¹ Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Laboratory of Pulmonary Immunology and Mechanics, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³ Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, Brazil, ⁴ Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Versican and tumor-associated macrophages (TAMs) are involved in growth and metastases in several cancers. Here, we investigated the potential role of versican, a matrix proteoglycan, and its correlation with TAMs infiltrates in different stages of two different breast cancer models: spontaneous canine mammary gland carcinomas and the murine 4T1 breast cancer model. The stromal versican expression was correlated with TAMs accumulation in tumors with an advanced stage from spontaneous canine mammary carcinoma samples. Versican expression in mice, identified in late stages of tumor progression, was associated to a high number of peri-tumoral infiltrating TAMs. Indeed, TAMs were related to a pro-inflammatory and pro-angiogenic state in the primary tumor. Furthermore, TAMs accumulation was related to versican expression in the lungs and an increased number of pulmonary metastatic nodules with pulmonary mechanical dysfunction, which was due to leukocyte influx in the airways and elevated growth factor levels in the microenvironment. Thus, we suggest that versican and TAMs as attractive targets for breast cancer therapy.

Keywords: breast cancer, angiogenesis, lung metastasis, versican, tumor-associated macrophages

INTRODUCTION

The tumor microenvironment has been increasingly recognized as an important participant of tumor progression (1, 2) and metastasis (3). As a result, there is an escalating interest in studies involving components of the extracellular matrix (ECM) and its interaction with neoplastic, stromal, endothelial and immune cells, as well fibroblasts (4–6). Interaction between ECM and

inflammatory cells, mostly macrophages have been shown to be involved in the progression and development of breast cancer metastasis (7).

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide and the second leading cause of cancer-related deaths in women (8). Generally, localized diseases are largely curable, whereas metastatic or recurrent diseases imply in poor prognosis. Metastatic disease may be found in broad range of organs and tissues, such as the bone, brain, liver and lungs (9). Lung metastasis may affect the pulmonary microenvironment and its function. Indeed, reduced lung function is an important risk factor for lung cancer, increasing the surgical risk of patients with advanced lung cancer, in which the low forced expiratory volume (FEV1) is strongly associated with mortality of non-small cell lung cancer patients (10).

Versican is an extracellular matrix proteoglycan that is highly expressed in early development stages, with low expression remaining in adults, increasing dramatically following tissue inflammation (11, 12) and neoplastic diseases (13). In cancer, versican has been identified as a modulator of cell adhesion, proliferation, apoptosis, angiogenesis, invasion, and metastasis (14–16). Recent studies also have been shown that versican interacts with monocytes/macrophages promoting their activation, migration, and production of growth factors. By activating TLR2:TLR6 complexes from tumor-associated macrophages (TAMs), versican induces the production of pro-inflammatory and pro-tumoral cytokines and chemokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor growth factor- β 1 (TGF- β 1), vascular endothelial growth factor (VEGF), and CC chemokine ligand 2 (CCL2), as well as versican production (17–20).

Tumor-associated macrophages (TAMs) are found in different tumor types (21–23) and are related with poor prognosis (21, 24–26). TAMs closely resemble the M2-polarized macrophages, which promote tumor growth and progression by several mechanisms, including the secretion of pro-tumoral growth factors and inhibitory cytokines. In fact, TAMs also induce angiogenesis, reduce effector functions of tumor-infiltrating lymphocytes, and enhance T regulatory lymphocyte (Treg) expansion (27). The relationship between versican and TAMs in breast cancer development is still poorly understood. Therefore, the aim of this study was to characterize the expression of versican and TAMs in spontaneous primary canine mammary gland carcinomas and in the 4T1 mice model of breast cancer, further investigating their role during primary cancer progression and metastasis development in the context of breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Canine Mammary Tumors Samples

In total, 108 cases of canine mammary tumors were selected from the archives of the Laboratory of Comparative Pathology of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). The samples derived from female dogs of different breeds and ages, which had undergone surgical excision of the mammary gland neoplasm. The neoplasms were categorized according to the World Health

Organization (WHO) classification scheme for canine mammary tumors (28) incorporating updated classification proposals (29). Histological grade was established according to the Nottingham system (30). All tumors were staged from I to V according to Owen (31). All procedures were performed under the guidelines and with the approval of the Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG), protocol 219/2009 and 81/2013.

4T1 Mice Model of Breast Cancer

The 4T1 mouse mammary carcinoma was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, USA), and the 4T1 cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA). Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Female BALB/c mice (16–20 g), with 6–8 week old (specific-pathogen-free) were obtained from the Centro de Bioterismo (CEBIO) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), in Brazil. The mice were housed in a ventilated barrier rack (Alesco Indústria e Comércio Ltda, Monte Mor, SP, Brazil) in a temperature-controlled facility on a 12-h photoperiod. The mice were given food and water *ad libitum*. Mice were subcutaneously inoculated with 2.5×10^6 4T1 cells in the right flank. They were anesthetized with a subcutaneous injection of 8.5 mg/kg of xylazine and 130 mg/kg of ketamine on the 14th, 21st, and 28th day following tumor inoculation, to perform the assessment of respiratory mechanics and blood sample collection. Assessments of respiratory mechanics were also performed in control mice ($n = 8$). Then, under anesthesia, the tumor bearing-mice and control mice were euthanized and bronchoalveolar lavage (BAL) was performed. Tumor and lung samples were collected, weighted, and processed for biochemical and histological analysis. All research was conducted under a protocol approved (number 262/2012) by an Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the UFMG.

Assessment of Respiratory Mechanics

While maintaining spontaneous breathing under anesthesia, the mice were tracheostomized, placed in a body plethysmograph and connected to a computer-controlled ventilator (Forced Pulmonary Maneuver System[®], Buxco Research Systems[®], Wilmington, North Carolina USA) as previously described by Russo et al. (32). The parameters assessed were Forced Vital Capacity (FVC), Functional Residual Capacity (FRC), Residual Volume (RV), Pressure \times Volume curve, Forced Expiratory Volume at 50 ms (FEV50), Forced Expiratory Volume at 100 ms (FEV100), Tiffeneau-Pinelli index (FEV50/FVC), Fast Flow Volume curve, Dynamic Compliance (C_{dyn}), and Lung Resistance (RL).

Bronchoalveolar Lavage (BAL) and Lung Preparation

BAL was performed to obtain leukocytes from the alveolar space. The number of leukocytes was determined by total counts in a Neubauer chamber, with differential counts performed in citospin preparations stained with May-Grunwald-GiemsaLi, as previously described (33). After BAL collection, 5 mL of

saline-phosphate buffer (PBS) was administered in the right ventricle so that the pulmonary blood vessels and capillaries were washed. Afterwards, the left lung (single lobe) was collected for histological analysis and the right lung was collected, weighed, and frozen for further processing and analysis of cytokines, chemokines, and N-Acetyl- β -glucosaminidase (NAG).

Histopathological Analysis

Primary tumors and lungs were excised and fixed in 10% neutral buffered formalin (pH 7.4) for 48 h and embedded in paraffin. One 4 μ m-thick sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined under light microscopy by two pathologists blinded to the experiment. Neoplastic cellular nodules or aggregates distributed throughout the lung parenchyma or alveolar spaces were considered metastatic lesions. Vascular density was performed on primary tumor slides stained with Gomori's trichrome in five fields (20x objective), as previously described (33, 34). Collagen deposition was analyzed with the WCIF ImageJ software (NHI) (<http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/>).

Immunohistochemistry

Versican immunolabeling was performed in canine and murine tumor sections subjected to heat-induced antigen retrieval with chondroitinase ABC (*Proteus vulgaris*; Sigma Chemicals) digestion at 37°C for 90 min with 0.5 U/mL of the enzyme in 0.25 M Tris buffer (pH 8.0) containing 0.18 M sodium chloride and 0.05% bovine serum albumin (BSA). Next, 0.25 M Tris buffer (pH 8.0) containing 0.1 M 6-amino-n-caproic-acid and 5 mM benzamidine hydrochloride was added and the samples were incubated for 30 min to inhibit protease activity. Murine macrophage immunolabeling was performed in tumor sections subjected to antigen retrieval with pepsin (Merck, Billerica, MA, USA) (100 mg pepsin dissolved in 100 ml H₂O and 1 ml HCl 1N) for 30 min at 37°C. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxidase in methanol. Slides were then washed and incubated overnight at 4°C with 12C5 (Cambridge, UK) for versican and F4/80 (BM8, Hycult Biotech, Netherlands) for macrophages, both monoclonal antibodies. A polymer detection system was used for the identification of the secondary antibody (ADVANCE HRP-ready to use, DakoCytomation). Diaminobenzidine (DAB) was used as a chromogen and sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. Negative controls were obtained by substitution of primary antibody by normal serum. Tissue obtained from a newborn mouse brain and the spleen of Balb/c mice were used as positive controls for versican and macrophages, respectively. Canine macrophages immunolabeling was performed as previously described (34).

Murine macrophages stained by F4/80 were counted by selecting 10 hotspot fields at high magnification (400X). Canine macrophages stained by MAC387 were counted in 5 hotspot fields. Versican expression was evaluated in stromal areas adjacent to the neoplasm semi-quantitatively based on the system of score adapted from Skandalis et al. (35), through the overall percentage of the tissue section stained positive (0–100%) and the 4-point signal intensity scale, classified as: 1, negative or very weak staining; 2, weak staining; 3, moderate staining; and

4, strong staining. Versican expression in neoplastic cells was evaluated considering the same score of intensity and percentage only for the 4T1 tumor model.

Tissue Extraction and Determination of N-acetyl- β -D-glucosaminidase Activity and Vascularization

The infiltration of macrophages was quantified by measuring the levels of the lysosomal enzyme N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) present in the lungs, as previously described (36). One hundred milligrams of primary tumors and the right lung were homogenized and centrifuged with 100 mL of the supernatant was collected and incubated for 10 min with p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma). The reaction was stopped with the addition of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Results were expressed as nmol/mg of wet tissue. The vascularization extent in tumor samples was assessed by the amount of hemoglobin (Hb) detected in the tissue using the Drabkin method, as described by Ferreira et al. (37).

Immunofluorescence

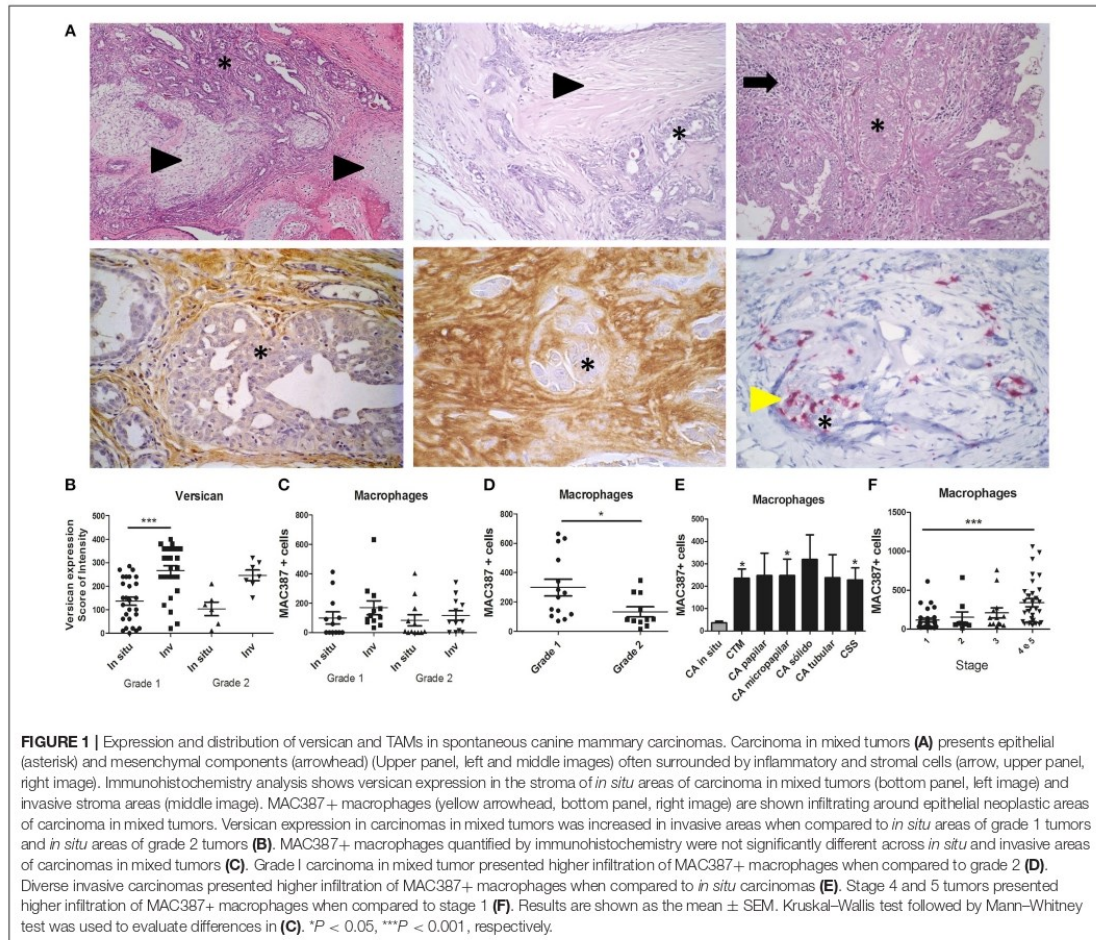
Confocal immunofluorescence was performed as previously described, with minor changes (38). Primary antibodies used for immunofluorescence were FITC-conjugated anti-F4/80 (1:150, clone mAb BM8, FITC conjugated, Hycult Biotech, Uden, The Netherlands) and anti-TGF- β 1 (1:100, polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, USA), with Alexa Fluor 647 (1:1,000, Life Technologies) as the secondary antibody. Nuclei were stained with Hoechst dye 33258 (1 μ g/mL, Life Technologies) before coverslip mounting for immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 5 Live, Carl Zeiss, Jena, Germany) (40x).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Primary tumor and right lung samples were homogenized and centrifuged at 4°C for 10 min at 10,000 g. Then, TNF- α , TGF- β 1, VEGF, and CCL2 levels were quantified in primary tumor supernatants and lung homogenates were quantified for CXCL1, CCL2, VEGF, and TGF- β 1 using the DuoSet ELISA kits (R&D Systems) in accordance to the manufacturer's instructions, as previously described (32). The results were expressed in picograms per milligram of wet tissue.

Statistical Analysis

Data are presented as the mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA, with the differences between groups assessed using the Student-Newman-Keuls *post-hoc* test. Differences in versican expression in the different stages of tumor progression were evaluated by the Kruskal–Wallis test, with the differences between groups assessed using the Mann–Whitney *post-hoc* test. Correlations were analyzed by the Spearman test. Graphs and analysis were performed using the GraphPad Prism 5.0 software. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.



RESULTS

Stromal Versican Expression Correlates With TAM Accumulation in Low-Grade and Advanced Stages of Canine Mammary Carcinomas

We first examined the expression of versican and TAMs infiltration in 108 spontaneous canine mammary neoplasms. Carcinomas in mixed tumor, the most common histological type diagnosed in neoplasm of the mammary gland of dogs (30), were used to evaluate versican expression in *in situ* and invasive areas (**Figure 1A**). Versican expression was observed in the stroma, myxoid matrix, and endothelial cells of blood vessels, inflammatory cells, and fibroblasts. Carcinomas in mixed tumors classified as histological grade 1 presented higher versican expression in invasive areas when compared to *in situ* areas ($P < 0.001$) (**Figure 1B**). TAMs were evaluated in *in situ* and invasive areas of diverse histological types (**Figure 1C**).

Grade 1 tumors presented increased TAMs than grade 2 tumors (**Figure 1D**). TAM was increased in invasive carcinomas throughout all histological types, with statistical significance in carcinomas in mixed tumors, micropapillary carcinomas, tubular carcinomas, and carcinosarcomas, when compared to *in situ* carcinomas (**Figure 1E**). When we categorized these tumors by clinical stage, TAMs infiltration was increased in tumors with advanced clinical stage when compared to early stage tumors (**Figure 1F**).

Stromal Expression of Versican Is Related With Peritumoral TAM Infiltration and Tumor Progression in Primary Mammary Tumors Using the 4T1 Murine Breast Cancer Model

We next examined the expression of versican and TAMs infiltration evaluated in the primary tumor and metastatic lung

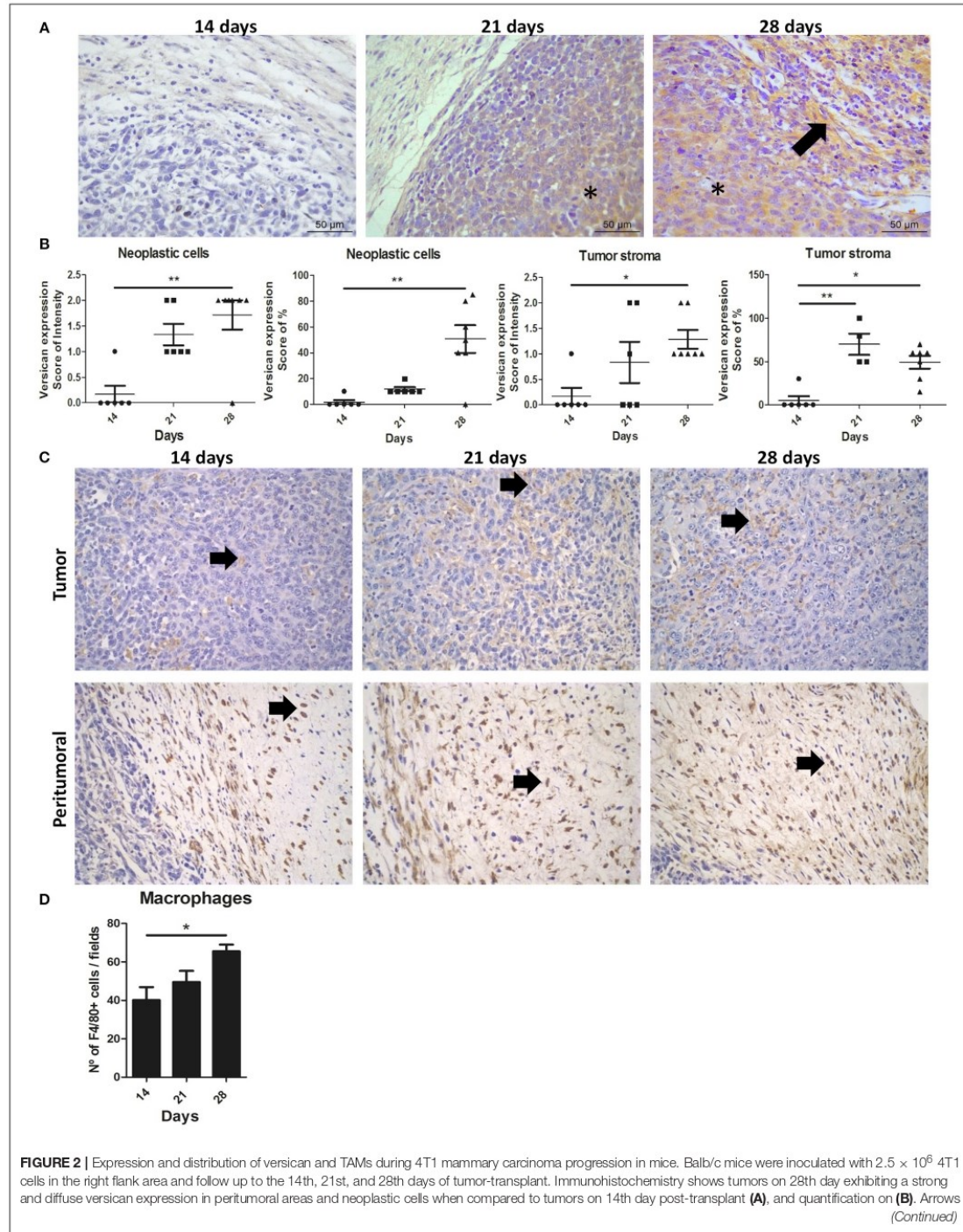


FIGURE 2 | indicate positive staining (brown) in peritumoral areas of the tumor. Asterisks indicate positive staining (brown) in neoplastic cells and tumor stroma. Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test was used to evaluate differences among groups. Upper panel shows F4/80+ macrophages in tumoral areas (C). Bottom panel shows F4/80+ macrophages infiltrated in peritumoral areas (C). Macrophages quantified through expression of F4/80+ increased in 4T1 tumors on day 28, when compared to tumors on day 14 (D). Results are representative of two experiments and are shown as the mean \pm SEM of seven to eight animals in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, respectively.

of the 4T1 murine model of breast cancer to investigate their role during cancer progression and metastasis. Versican expression was stronger in stromal areas on the 28th day when compared with the 14th day ($P < 0.01$) (Figures 2A,B), with an increased percentage of stromal versican staining in tumors on the day 21st ($P < 0.01$) and 28th ($P < 0.05$) when compared with the 14th day. Similarly, in the neoplastic cells, stronger versican staining was found on day 28 when compared to day 14 ($P < 0.01$) (Figures 2A,B).

TAMs infiltration were also predominantly increased and distributed mainly in peritumoral areas on the 28th day when compared with the 14th day ($P < 0.01$) (Figures 2C,D). A moderate positive correlation was observed between the intensity of versican expression in neoplastic cells and TAMs density ($r = 0.7209$, $P = 0.0036$) and a moderate positive correlation with the percentage of versican expression and TAMs ($r = 0.6299$, $P = 0.0158$). No correlation was observed between stromal versican expression and TAMs (Table 1). Taken together, our data in mice and canine mammary tumors suggest an intrinsic association between stromal versican expression and TAMs infiltration with breast cancer progression and invasion.

Inflammation Is Associated With Stromal Versican Expression and Peritumoral Accumulation of TGF- β 1-Expressing TAMs During the 4T1 Tumor Development

We next investigated the contribution of inflammatory mediators in the 4T1 tumor microenvironment and its relationship with versican expression. A progressive increase in the pro-inflammatory cytokine TNF- α , pro-angiogenic protein VEGF, chemokine CCL2, and TGF- β 1 levels were associated with the 4T1 tumor progression, with increases on days 21 and 28 when compared to day 14 (Figure 3A). A moderate to strong positive correlation was found between versican expression intensity in neoplastic cells and VEGF ($r = 0.7600$, $P = 0.0006$), CCL2 ($r = 0.8229$, $P < 0.0001$), TGF- β 1 ($r = 0.5232$, $P = 0.0311$), and TNF- α ($r = 0.5649$, $P = 0.0226$) (Table 1). Versican expression percentage in neoplastic cells was positively associated with TNF- α ($r = 0.6730$, $P = 0.0043$), VEGF ($r = 0.8489$, $P < 0.0001$), and CCL2 ($r = 0.8853$, $P = 0.0001$).

A similar trend was observed between stromal versican expression intensity and TNF- α ($r = 0.5564$, $P = 0.0204$), VEGF ($r = 0.6297$, $P = 0.0067$), CCL2 ($r = 0.6245$, $P = 0.0074$), and TGF- β 1 ($r = 0.6440$, $P = 0.0053$). Stromal versican expression was also positively correlated with VEGF ($r = 0.5668$, $P = 0.0220$), CCL2 ($r = 0.5878$, $P = 0.0166$), and TGF- β 1 ($r = 0.5715$, $P = 0.0165$). Since versican has been previously demonstrated to be up-regulated by TGF- β in cancer scenarios (39, 40), we investigated if macrophages could be the source of secreted TGF- β 1. Thus, we co-stained

TGF- β 1 with a murine macrophage marker, the protein F4/80 (Figure 3B), demonstrating that TGF- β 1 and F4/80+ cells were predominantly localized in the peritumoral areas and, therefore, that macrophages might be an important source of TGF- β 1 in the tumor microenvironment. However, other F4/80 negative cells, morphologically classified as spindle-cells resembling fibroblasts, were also found to express TGF- β 1 (data not shown).

Higher Versican Expression Is Accompanied by Angiogenesis and Tissue Remodeling During the 4T1 Tumor Development

The 28th day was associated with a higher amount of hemoglobin and blood vessels when compared to the 14th and 21st day ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively) (Figures 4A,B). Interestingly, 4T1 tumor progression was also associated with collagen deposition (Figures 4A,C). This tissue remodeling also appeared to be progressively higher on the 28th day of tumor progression (Figure 4C). On day 14, collagen deposition was observed most frequently in peritumoral and necrotic areas and less frequently in the versican-expressing tumor stroma. On the other hand, tumors on day 28 presented higher amount of collagen deposited mainly in the tumor stroma, in addition to peritumoral and necrotic areas (Figure 4A). Versican expression intensity and percentage in neoplastic cells was positively associated with collagen deposition ($r = 0.6619$, $P = 0.0038$ and $r = 0.6857$, $P = 0.0024$, respectively), hemoglobin content ($r = 0.7977$, $P = 0.0002$ and $r = 0.7882$, $P = 0.0003$, respectively), and blood vessels ($r = 0.8184$, $P < 0.0001$ and $r = 0.9352$, $P < 0.0001$, respectively) (Table 1). The stromal versican expression intensity was found correlated with blood vessels ($r = 0.6440$, $P = 0.0053$) and collagen deposition ($r = 0.5984$, $P = 0.0087$), while no correlation was found between stromal versican staining percentage and angiogenesis markers and collagen deposition. These results collectively indicate tissue remodeling through the development of the 4T1 tumor model associated to higher versican expression and progressive deposition of collagen.

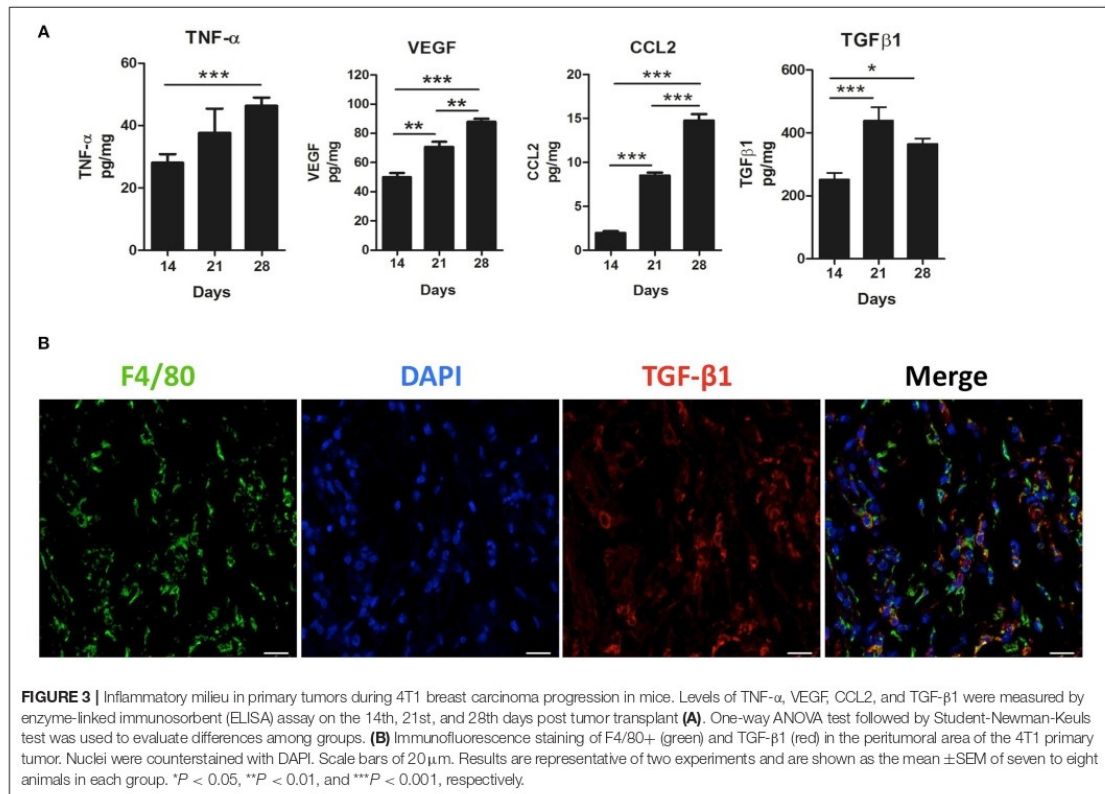
Pulmonary Metastasis Is Positively Correlated With Versican Expression and Macrophage Accumulation During 4T1 Mammary Cancer Progression

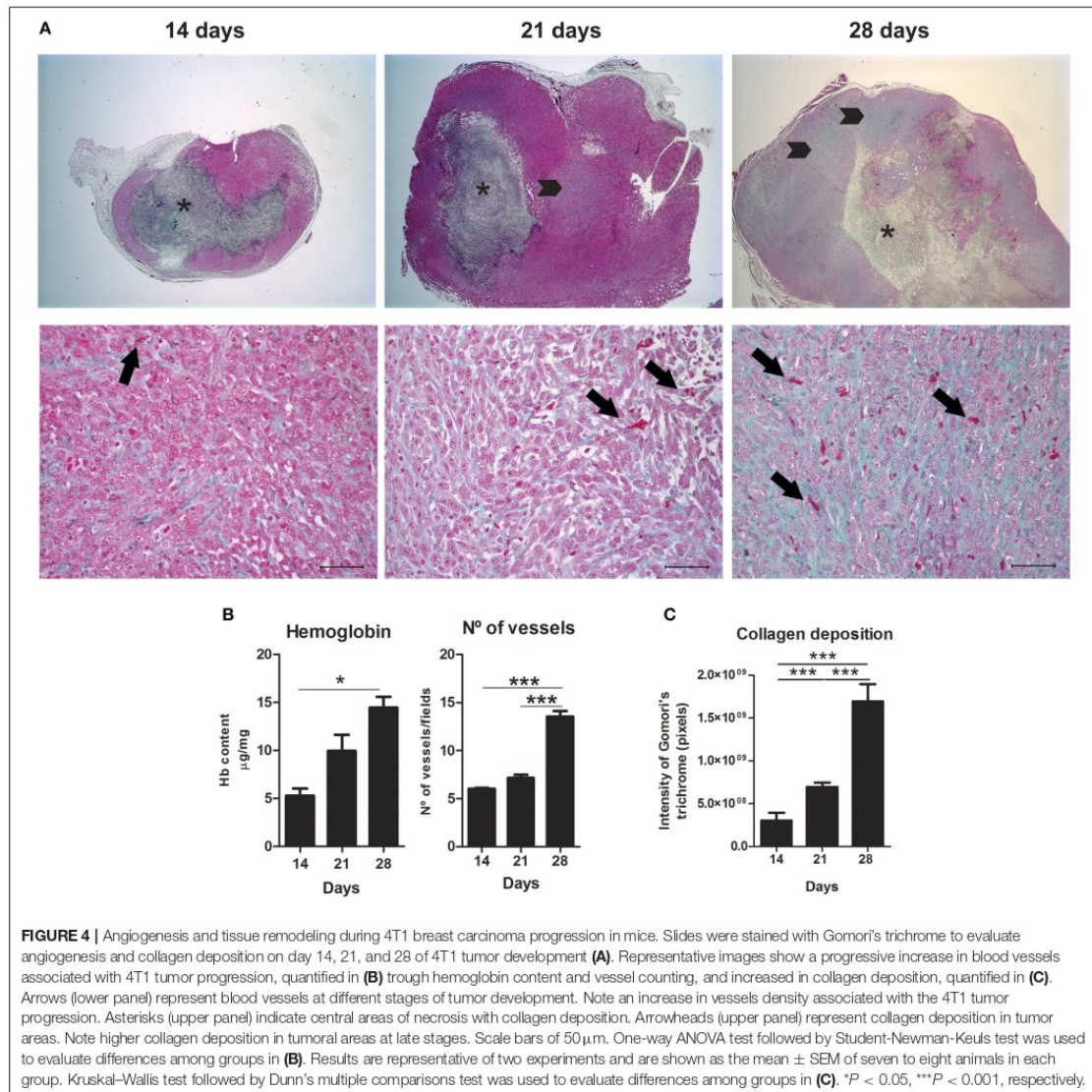
Lung metastasis was correlated with versican expression in the 4T1 primary tumor. As expected, an increasing number of metastatic nodules following tumor development were observed (Figures 5A,B). Lung samples collected on the 28th day-post transplant showed higher numbers of metastatic nodules when compared to the day 14 ($P < 0.001$) and day

TABLE 1 | Spearman's correlation between versican expression and macrophages, cytokines, chemokines, angiogenesis, collagen deposition, and lung metastasis in the 4T1 primary tumor.

	Versican expression in stroma areas				Versican expression in neoplastic cells			
	% Expression		Intensity		% Expression		Intensity	
	R coefficient value	P-value	R coefficient value	P-value	R coefficient value	P-value	R coefficient value	P-value
Macrophages								
F4/80	0.3858	0.1731	0.3204	0.2444	0.6299	0.0158*	0.7209	0.0036**
Cytokines and Chemokines								
TNF- α	0.3314	0.2099	0.5564	0.0204*	0.6730	0.0043**	0.5649	0.0226*
VEGF	0.5668	0.0220*	0.6297	0.0067**	0.8489	<0.0001***	0.7600	0.0006***
CCL2	0.5878	0.0166*	0.6245	0.0074**	0.8853	0.0001***	0.8229	<0.0001***
TGF- β 1	0.5715	0.0165*	0.6440	0.0053**	0.3955	0.1043	0.5232	0.0311*
Angiogenesis and Collagen								
Hemoglobin	0.4604	0.7028	0.3914	0.1202	0.7882	0.0003***	0.7977	0.0002***
N $^{\circ}$ of vessels	0.4811	0.0592	0.6440	0.0053**	0.9352	<0.0001***	0.8184	<0.0001***
Collagen deposition	0.4379	0.0898	0.5984	0.0087**	0.6857	0.0024**	0.6619	0.0038**
Lung Metastasis								
N $^{\circ}$ metastatic nodules	0.4135	0.1114	0.4476	0.0716	0.8495	<0.0001***	0.7888	0.0003***

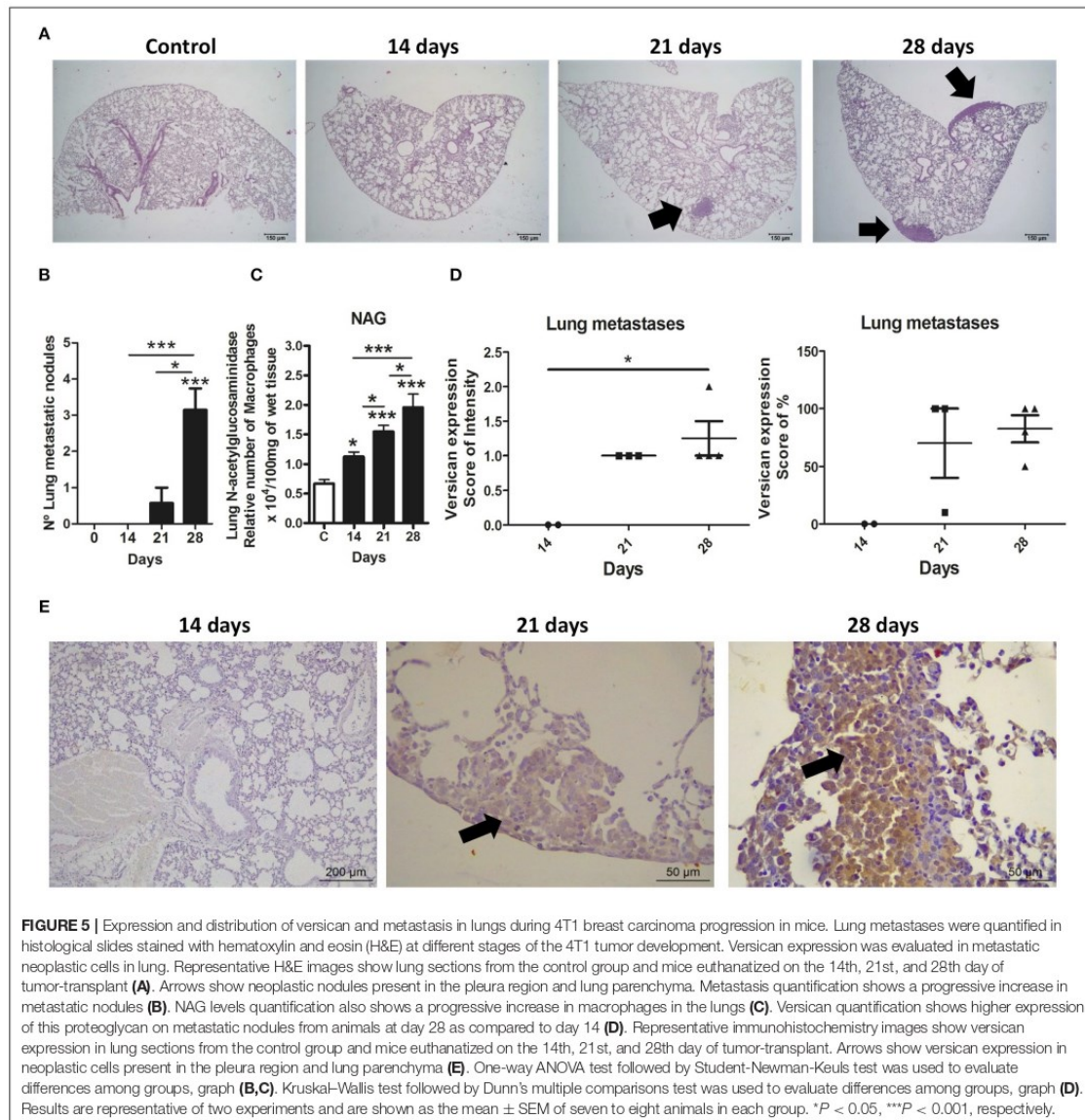
TNF- α , tumor necrosis factor- α ; VEGF, vascular growth factor; CCL2, CC motif chemokine ligand 2; TGF- β 1, tumor growth factor β 1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$, respectively. The bold values mean results that are statistically significant.





21 ($P < 0.05$) (Figures 5A,B). On the 28th day, all mice showed pulmonary metastasis, while only 37.5% (3/8) of day 21 mice presented pulmonary metastasis, and no pulmonary metastatic nodules were found in day 14 mice. Metastases were distributed throughout the lung parenchyma as nodules or small clusters of cells, mainly associated to vascular regions and pleura. Macrophage accumulation was also increased in the lung tissue in a time-dependent manner (Figure 5C). The expression of versican in neoplastic cells from primary tumors was strongly associated with the number of metastatic

nodules in the lung (intensity score: $r = 0.7888$, $P = 0.0003$ and percentage score: $r = 0.8495$, $P < 0.0001$) (Table 1). Versican intensity in metastatic lung nodules was higher at day 28 when compared to day 14, while no difference was found regarding versican percentage (Figures 5D,E). Versican staining percentage in lung metastatic cells had a weak positive correlation with the number of metastatic nodules ($r = 0.7371$, $P = 0.0370$) (Table 2). No correlation was observed between NAG levels and versican expression in lung metastasis (Table 2).



High Versican Expression in Lung Parenchyma Was Associated With Progressive Leukocyte Influx and Pulmonary Dysfunction During 4T1 Mammary Cancer Metastasis

Cytokines and chemokines were measured in lung tissue (Figure 6A). CCL2 and CXCL1 peaks were detectable from day 21, dropping slightly on day 28. VEGF was increased on days

14 and 21, decreasing on day 28. TGF- β 1 was found increased in all tumor-bearing mice when compared to the control animals. Versican staining intensity was correlated with CXCL1 ($r = 0.6840$, $P = 0.0422$) and CCL2 ($r = 0.7438$, $P = 0.0216$) levels in the lung parenchyma (Table 2). No association was observed between versican expression and VEGF or TGF- β 1 (Table 2).

Airway leukocyte influx was evaluated in BAL fluid, which revealed a progressive increase of leukocytes (Figure 6B)

TABLE 2 | Spearman's correlation between versican expression and macrophages, cytokines, chemokines, and leukocytes in the 4T1 pulmonary metastases.

	Versican expression in lung metastases			
	% Expression		Intensity	
	R coefficient value	P-value	R coefficient value	P-value
Macrophages				
NAG	0.2394	0.5350	0.09405	0.8098
Cytokines and Chemokines				
CXCL1	0.1539	0.6926	0.6840	0.0422*
VEGF	-0.2223	0.5654	0.5643	0.1135
CCL2	0.2223	0.5654	0.7438	0.0216*
TGF- β 1	-0.5559	0.1950	-0.3637	0.4226
BAL				
Total cells	0.3676	0.3304	0.3505	0.3550
Eosinophils	0.4873	0.1833	-0.4446	0.2305
Neutrophils	0.3762	0.3184	0.1624	0.6763
Macrophages	0.4959	0.1746	0.5899	0.0945
Lymphocytes	0.2052	0.5964	0.2137	0.5808
Lung Metastasis				
N° metastatic nodules	0.7371	0.0370*	0.2017	0.6319

NAG, N-acetyl- β -D-glucosaminidase; CXCL1, chemokine (C-X-C motif) ligand 1; VEGF, vascular growth factor; CCL2, CC motif chemokine ligand 2; TGF- β 1, tumor growth factor β 1; BAL, bronchoalveolar lavage. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, respectively. The bold values mean results that are statistically significant.

associated to tumor development and metastasis. All inflammatory cell types were increased in BAL at days 14, 21, and 28 when compared to the control. Day 14 was marked by a predominance of macrophage, and neutrophil, eosinophil and lymphocyte influx on days 21 and 28 (Figure 6B). Moreover, total leukocytes peaked on day 28 when compared to day 14 and 21, with a predominance of macrophages and eosinophils during late stages of metastatic progression (Figure 6B). No association was observed between versican expression in metastatic nodules and leukocytes presented in BAL.

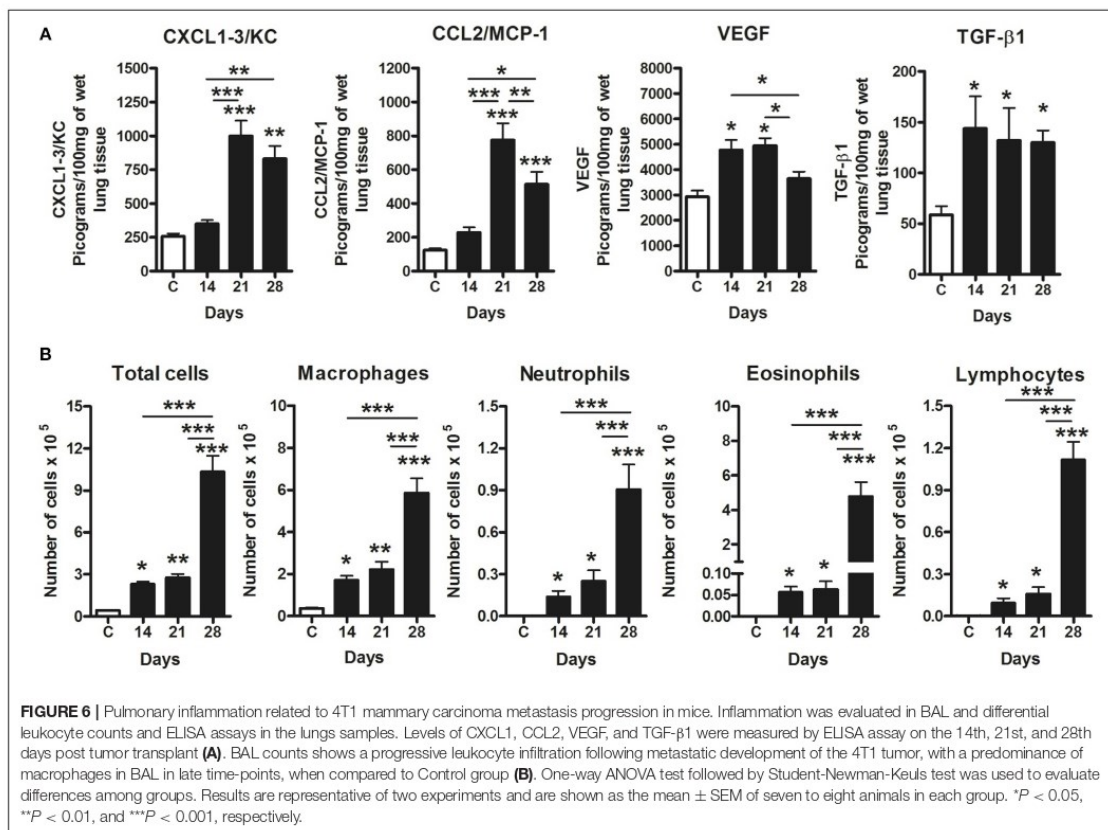
A forced spirometry technique was used to evaluate the physiological changes in lung function caused by the metastatic development and versican accumulation in lung parenchyma during 4T1 breast cancer metastasis. High versican expression in parallel with metastatic progression leads to a progressive decline in pulmonary function, mainly highlighted on day 28, evidenced by volume loss, such as reduction in FVC, FRC, RV (Figure 7A), and the Pressure \times Volume curve (Figure 7B). In addition, the mice presented a time-dependent decline in respiratory airway flow, with a decrease in FEV50 and in FEV100 (Figure 7C), confirmed by the Flow \times Volume curve, when compared to the control animals (Figure 7D). Moreover, the day 28 animals presented a greater restrictive behavior of the respiratory airway flow, evidenced by the Tiffeneau-Pinelli index (Figure 7C). Regarding pulmonary elasticity, through analysis of lung compliance (Cdyn) and resistance (RI), animals transplanted with the 4T1 tumors exhibited a reduction in dynamic compliance, with a significant increase in resistance on day 28 when compared to control animals (Figure 7E).

Collectively, our data suggests that the lost pulmonary function may be a result from the accumulation of pulmonary metastatic nodes on day 28.

DISCUSSION

Versican expression has been linked with poor prognosis and relapse-free survival in cancer patients (15, 41, 42). Interaction among versican, ECM components, and neoplastic cells are recognized as regulators of proliferation and metastatic potential (16, 43, 44). Indeed, immune cells, mostly macrophages, have an important role in ECM remodeling, including regulation of versican levels and, consequently, tumor progression (3, 44). A previous study described the interaction of versican with TAMs, promoting their activation, migration, and production of growth factors (20). However, in the context of breast cancer, the most common cancer in women worldwide and cancer-related deaths in women (7), the role of versican remains unexplored. Here we highlighted the correlation between versican expression, TAMs accumulation and tumor progression using two models of mammary carcinomas: spontaneous mammary carcinoma in dogs and mammary carcinoma implanted in mice. Naturally occurring cancers in canines and humans share many features, including tumor phenotype, genetic markers and molecular targets (45). Thus, studying the cancer development in canines and rodents may provide a valuable perspective, potentially useful for diagnosis and therapeutics in humans.

The tumor microenvironment is an important participant of tumor progression and metastasis (3). TAMs are important in the context of tumor biology, involved in both invasiveness and metastatization (21–23), with M2-polarized macrophages characterized as promoters of angiogenesis, epithelial-mesenchymal transition and tissue remodeling in cancer manifestation (27). We showed that TAMs were predominately localized in the peripheral areas of primary tumors, with their increase associated to stromal versican expression, as observed by Asano et al. (46). M2-polarized macrophages have been showed to produce large quantities of soluble mediators in the tumor microenvironment such as CCL2, VEGF, and TGF- β 1 that interact with neoplastic cells promoting their proliferation and invasion (47–51). However, we found increased levels of CCL2, VEGF, and TGF- β 1 also positively correlating with F4/80+ macrophages, high vascularization and collagen deposition during tumor progression in the 4T1 mouse model. These macrophages are the source of TGF- β 1, as confirmed by microscopy. TAMs can also induce tumor angiogenesis, and have been involved in collagen deposition and linearization of the tumor stroma in more aggressive human breast cancer subtypes (8). Accordingly, we revealed that the 4T1 development evolved in a TAM-derived inflamed milieu and neovascularized tumor tissue, with increased collagen deposition in the tumor microenvironment. Collectively, these findings indicate that the 4T1 tumor progression is related with peritumoral TAM infiltration and may promote the gradual replacement of extracellular matrix and angiogenesis through its cytokines production.

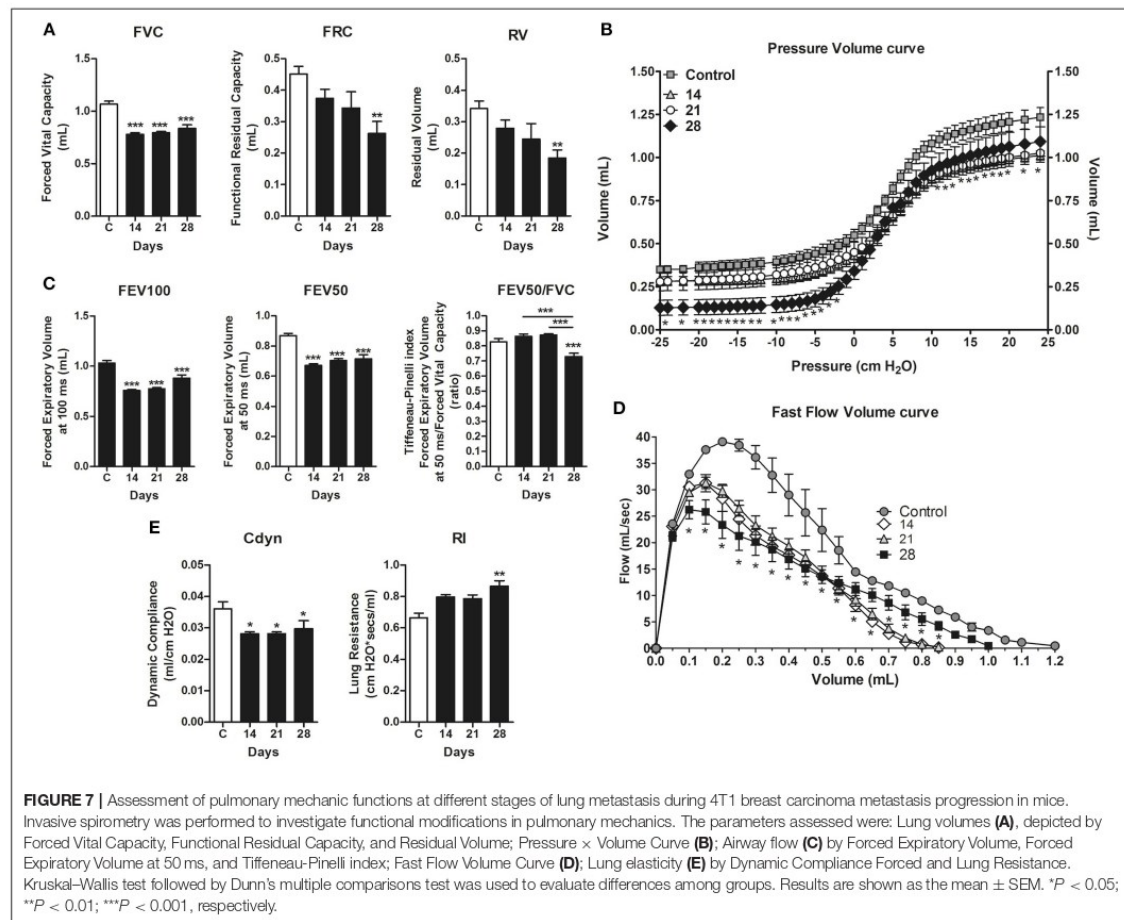


Versican, an extracellular matrix proteoglycan, is also involved in TAM activation through TLRs, inducing the production of pro-inflammatory and pro-tumoral cytokines and chemokines, in addition to versican production (17–20, 50). In fact, these interactions between tissue microenvironment and parenchymal cells are detrimental for the maintenance of cancer progression and invasiveness. In breast cancer, the interaction between stromal versican deposition and neoplastic cells was previously shown as an important step in tumorigenesis (46). However, the authors described low proteoglycan expression in the cells, possibly justified by the secretion of soluble mediators by other cells, leading to an increase in the deposition of versican by fibroblasts during neoplastic extracellular matrix remodeling. Besides fibroblasts, macrophages have also been demonstrated to produce versican in different murine tumor models (46).

Breast cancer metastasizes through lymphatic and blood vessels mainly to lymph nodes, lungs, bones, liver, and brain (52, 53). The onset of metastasis in the 4T1 tumor often occurs after the second week post-transplant (54). In the present study, versican expression was observed in neoplastic cells and peripheral areas in all studied time-points. The metastatic progression of the 4T1 tumor was accompanied by

the up-regulation of versican expression in neoplastic cells of the primary tumor, which was correlated with the number of pulmonary metastatic nodules. In fact, overexpression of versican has been showed to increase growth, proliferation and metastatic potential of a breast cancer murine model (43), while the versican silencing exerted an inhibitory effect on the proliferative and migratory ability of melanoma cells (55). Thus, since versican was differentially expressed in peripheral and tumor areas, we suggest a pro-tumoral role of versican, promoting tumor progression and metastasis of the 4T1 tumor model.

Versican has been shown to interact with myeloid and lymphoid cells in the tumor microenvironment, promoting their adhesion and production of inflammatory cytokines that may trigger the tumor invasion (11, 16, 19, 56, 57). Thus, the proteoglycan versican may interact with leukocytes and neoplastic cells to establish a microenvironment that favors tumor expansion in the context of the 4T1 model. Increased cytokines and chemokines, such as TGF-β1, CCL2, and VEGF, have been shown to predict metastatic disease (50, 51, 53). Furthermore, TGF-β1 has been shown to up-regulate the production of versican in cancer cells and the tumor stroma, resulting in invasiveness and metastasis (39, 40,



49). We found a marked production of CCL2 and CXCL1 in the lung, in parallel with macrophage influx, increased metastatic disease and high versican expression in the lung tissue. These chemokines are related to leukocyte recruitment and angiogenesis, which could contribute toward a pro-metastatic pulmonary microenvironment, directly stimulate the tumor progression and metastasis.

Lung metastasis may affect pulmonary microenvironment and function (10). The progression of the 4T1 breast cancer model resulted in an increased leukocyte influx in the airways, mostly composed by macrophages, also associated to a higher number of metastatic nodules and infiltrating TAMs. Pulmonary mechanical functions were altered during tumor progression. This alteration was evidenced even on day 14, when metastatic nodules were absent, and progressed to more pronounced lung dysfunction on day 28. Our data corroborates that pulmonary versican expression is associated to metastatic nodules, inflammation and alveolar edema, which impacts lung dysfunction, preceding

mortality. Moreover, the number of metastatic nodes in the lung leads to a greater restrictive behavior of the respiratory airway flow in mice. Finally, future studies using cytokines- and versican-knockdown mice and macrophage-depleted mice could better explore the relationship between TAMs and versican in the metastatic development of 4T1 breast cancer mice model.

In conclusion, stromal versican expression was found in primary canine and murine breast cancer models. Increased versican expression correlates with elevated TAMs infiltration in the primary tumor preceding the metastatic progression in mice. Versican expression also correlates with increase metastasis and pulmonary dysfunction, suggesting the involvement of TAMs in regulating important steps during murine 4T1 breast cancer model development through versican signaling. Therefore, versican and TAMs might represent an attractive target for breast cancer therapy.

ETHICS STATEMENT

Canine mammary tumors samples: All procedures were performed under the guidelines and with the approval of the Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG), protocol 219/2009 and 81/2013). Murine 4T1 breast cancer model: All research was conducted under a protocol approved (number 262/2012) by an Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from Federal University of Minas Gerais, Brazil.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GC, RR, and DdR designed the research. DdR performed *in vivo* experiments, histology image analysis, and data analysis. KD performed immunohistochemistry, score, and analyses of versican and macrophages in canine samples. EV and GP maintained the BALB/c mice used in the experiments and performed mouse necropsies. LK, MM, and PC performed BAL, cytokines, and chemokines dosages. RR executed and analyzed forced spirometry data. MR

and DG were responsible by confocal image. DdR, KD, CdC, EF, RR, and GC drafted the work. GC and RR supervised the study and final approval of the version to be published.

FUNDING

This work was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ACKNOWLEDGMENTS

Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais—UFMG/EDITAL PRPq-02/2019. The microscopic data shown in this work was obtained using the microscopes of Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB/UFMG). We are grateful to Prof. Mauro Martins Teixeira for assistance and support during this work.

REFERENCES

- Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* (2012) 196:395–406. doi: 10.1083/jcb.201102147
- Artacho-Córdón A, Artacho-Córdón F, Ríos-Arrabal S, Calvente I, Núñez MI. Tumor microenvironment and breast cancer progression: a complex scenario. *Cancer Biol Ther.* (2012) 13:14–24. doi: 10.4161/cbt.13.1.18869
- Quail D, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* (2013) 19:1423–37. doi: 10.1038/nm.3394
- Damasceno KA, Bertagnoli AC, Estrela-Lima A, Rabelo BS, Campos LC, Ribeiro LGR, et al. Versican expression in myoepithelial cells from carcinomas in canine mixed mammary tumors. *Vet J.* (2014) 200:146–51. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.01.013
- Naba A, Clauser KR, Lamar JM, Carr SA, Hynes RO. Extracellular matrix signatures of human mammary carcinoma identify novel metastasis promoters. *Elife.* (2014) 2014:e01308. doi: 10.7554/eLife.01308
- Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* (2012) 125:5591–6. doi: 10.1242/jcs.116392
- Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, Rota M, Bertuccio P, Malvezzi M, et al. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Ann Oncol.* (2016) 27:926–33. doi: 10.1093/annonc/mdw027
- Acerbi I, Cassereau L, Dean I, Shi Q, Au A, Park C, et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr Biol.* (2015) 7:1120–34. doi: 10.1039/c5ib00040h
- Wu Q, Li J, Zhu S, Wu J, Chen C, Liu Q, et al. Breast cancer subtypes predict the preferential site of distant metastases: a SEER based study. *Oncotarget.* (2017) 8:27990–6. doi: 10.18632/oncotarget.15856
- Lee JH, Song EM, Sim YS, Ryu YJ, Chang JH. Forced expiratory volume in one second as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* (2011) 6:305–9. doi: 10.1097/JTO.0b013e318201884b
- Wight TN, Kinsella MG, Evanko SP, Potter-Perigo S, Merrilees MJ. Versican and the regulation of cell phenotype in disease. *Biochim Biophys Acta.* (2014) 1840:2441–51. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.12.028
- Andersson-Sjöland A, Hallgren O, Rolandsson S, Weitoft M, Tykesson E, Larsson-Callert A-K, et al. Versican in inflammation and tissue remodeling: the impact on lung disorders. *Glycobiology.* (2014) 25:1–9. doi: 10.1093/glycob/cwu120
- Kischel P, Waltregny D, Dumont B, Turtoi A, Greffe Y, Kirsch S, et al. Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. *Int J Cancer.* (2010) 126:640–50. doi: 10.1002/ijc.24812
- Du WW, Yang W, Yee AJ. Roles of versican in cancer biology—tumorigenesis, progression and metastasis. *Histol Histopathol.* (2013) 28:701–13. doi: 10.14670/HH-28.701
- Shen X, Lin W, Xu M, Qi P, Dong L, Zhang Q, et al. Prognostic significance of Versican expression in gastric adenocarcinoma. *Oncogenesis.* (2015) 4:e178. doi: 10.1038/oncsis.2015.36
- Ricciardelli C, Sakko AJ, Ween MP, Russell DL, Horsfall DJ. The biological role and regulation of versican levels in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* (2009) 28:233–45. doi: 10.1007/s10555-009-9182-y
- Chang MY, Chan CK, Braun KR, Green PS, O'Brien KD, Chait A, et al. Monocyte-to-macrophage differentiation: synthesis and secretion of a complex extracellular matrix. *J Biol Chem.* (2012) 287:14122–35. doi: 10.1074/jbc.M111.324988
- Masuda A, Yasuoka H, Satoh T, Okazaki Y, Yamaguchi Y, Kuwana M. Versican is upregulated in circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and amplifies a CCL2-mediated pathogenic loop. *Arthritis Res Ther.* (2013) 15:R74. doi: 10.1186/ar4251
- Wight TN, Kang I, Merrilees MJ. Versican and the control of inflammation. *Matrix Biol.* (2014) 35:152–61. doi: 10.1016/j.matbio.2014.01.015
- Kim S, Takahashi H, Lin W-W, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature.* (2009) 457:102–6. doi: 10.1038/nature07623
- Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol.* (2013) 35:585–600. doi: 10.1007/s00281-013-0367-7
- Cook J, Hagemann T. Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr Opin Pharmacol.* (2013) 13:595–601. doi: 10.1016/j.coph.2013.05.017
- Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C, et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2012) 109:2491–6. doi: 10.1073/pnas.1113744109
- Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett.* (2009) 123:97–102. doi: 10.1016/j.imlet.2009.02.011
- Hembruff SL, Jokar I, Yang L, Cheng N. Loss of transforming growth factor-beta signaling in mammary fibroblasts enhances CCL2 secretion to promote mammary tumor progression through macrophage-dependent and -independent mechanisms. *Neoplasia.* (2010) 12:425–33. doi: 10.1593/neo.10200
- Guo C, Buranych A, Sarkar D, Fisher PB, Wang X-Y. The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. *Vasc Cell.* (2014) 6:2. doi: 10.1186/2045-824X-6-2

27. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* (2010) 22:231–7. doi: 10.1016/j.coi.2010.01.009
28. Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP. *Histological classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat.* Vol. VII. 2nd Series. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology (1999). p. 1–59.
29. Cassali GD, Lavalle GE, Ferreira E, Estrela-Lima A, De Nardi AB, Ghever C, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. *Braz J Vet Pathol.* (2014) 7:38–69.
30. Elston CW, Ellis IO. Assessment of histological grade. In: Elston CW, Ellis IO, editors. *Systemic Pathology: The Breast.* 3rd ed. London: Churchill Livingstone (1998). p. 365–84.
31. Owen LM. *TNM Classification of Tumours in Domestic Animals.* Geneva: World Health Organization (1980), p. 53.
32. Russo RC, Savino B, Mirolo M, Buracchi C, Germano G, Anselmo A, et al. The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2+ and CCR5+ IFN γ -producing γ δ T cells in mice. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* (2018) 314:L1010–25. doi: 10.1152/ajplung.00233.2017
33. Russo RC, Garcia CC, Barcelos LS, Rachid MA, Guabiraba R, Roffê E, et al. Phosphoinositide 3-kinase γ plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Leukoc Biol.* (2011) 89:269–82. doi: 10.1189/jlb.0610346
34. Monteiro LN, Rodrigues MA, Gomes DA, Salgado BS, Cassali GD. Tumor-associated macrophages: relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. *Vet J.* (2018) 234:119–25. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.02.016
35. Skandalis SS, Labropoulou VT, Ravazoula P, Likaki-Karatzas E, Dobra K, Kalofonos HP, et al. Versican but not decorin accumulation is related to malignancy in mammographically detected high density and malignant-appearing microcalcifications in non-palpable breast carcinomas. *BMC Cancer.* (2011) 11:314. doi: 10.1186/1471-2407-11-314
36. Russo RC, Alessandri AL, Garcia CC, Cordeiro BF, Pinho V, Cassali GD, et al. Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2011) 45:72–80. doi: 10.1165/rcmb.2009-0406OC
37. Ferreira MAND, Barcelos LS, Teixeira MM, Bakhle YS, Andrade SP. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). *Life Sci.* (2007) 81:210–7. doi: 10.1016/j.lfs.2007.05.003
38. Gamba CO, Rodrigues MA, Gomes DA, Estrela-Lima A, Ferreira E, Cassali GD. The relationship between E-cadherin and its transcriptional repressors in spontaneously arising canine invasive micropapillary mammary carcinoma. *J Comp Pathol.* (2015) 153:256–65. doi: 10.1016/j.jcpa.2015.08.006
39. Norian JM, Malik M, Parker CY, Joseph D, Leppert PC, Segars JH, et al. Transforming growth factor β 3 regulates the versican variants in the extracellular matrix-rich uterine leiomyomas. *Reprod Sci.* (2009) 16:1153–64. doi: 10.1177/1933719109343310
40. Yeung TL, Leung CS, Wong KK, Samimi G, Thompson MS, Liu J, et al. TGF- β modulates ovarian cancer invasion by upregulating CAF- derived versican in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* (2013) 73:5016–28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0023
41. Ricciardelli C, Brooks JH, Suwiwat S, Sakko AJ, Mayne K, Raymond WA, et al. Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* (2002) 8:1054–60.
42. Pukkila M, Kosunen A, Ropponen K, Virtaniemi J, Kellokoski J, Kumpulainen E, et al. High stromal versican expression predicts unfavourable outcome in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol.* (2006) 60:267–72. doi: 10.1136/jcp.2005.034181
43. Du WW, Fang L, Yang X, Sheng W, Yang BL, Seth A, et al. The role of versican in modulating breast cancer cell self-renewal. *Mol Cancer Res.* (2013) 11:443–55. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0461
44. Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van den Bossche J, Schoupe E, Mommer C, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol.* (2011) 55:861–7. doi: 10.1387/ijdb.113371dl
45. Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer.* (2008) 8:147–56. doi: 10.1038/nrc2273
46. Asano K, Nelson CM, Nandadasa S, Aramaki-Hattori N, Lindner DJ, Alban T, et al. Stromal versican regulates tumor growth by promoting angiogenesis. *Sci Rep.* (2017) 7:1–11. doi: 10.1038/s41598-017-17613-6
47. Oktem G, Sercan O, Guven U, Uslu R, Uysal A, et al. Cancer stem cell differentiation: TGF β 1 and versican may trigger molecules for the organization of tumor spheroids. *Oncol Rep.* (2011) 32:641–9. doi: 10.3892/or.2014.3252
48. Li S, Li F, Cheng T. TGF- β 1 promotes osteosarcoma cell migration and invasion through the miR-143-versican pathway. *Cell Physiol Biochem.* (2014) 34:2169–79. doi: 10.1159/000369660
49. Curran CS, Keely PJ. Breast tumor and stromal cell responses to TGF- β and hypoxia in matrix deposition. *Matrix Biol.* (2013) 32:95–105. doi: 10.1016/j.matbio.2012.11.016
50. Conti I, Rollins BJ. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol.* (2004) 14:149–54. doi: 10.1016/j.semcancer.2003.10.009
51. Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett.* (2008) 267:271–85. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.018
52. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* (2005) 436:518–24. doi: 10.1038/nature03799
53. Rahman M, Mohammed S. Breast cancer metastasis and the lymphatic system (Review). *Oncol Lett.* (2015) 10:1233–9. doi: 10.3892/ol.2015.3486
54. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol.* (2001) Chapter 20:Unit 20.2. doi: 10.1002/0471142735.im2002s39
55. Wang Z, Li ZI, Wang Y, Cao D, Wang X, Jiang M, et al. Versican silencing improves the antitumor efficacy of endostatin by alleviating its induced inflammatory and immunosuppressive changes in the tumor microenvironment. *Oncol Rep.* (2015) 33:2981–91. doi: 10.3892/or.2015.3903
56. Schmitt M. Versican vs. versikine: tolerance vs. attack. *Blood.* (2016) 128:612–3. doi: 10.1182/blood-2016-06-721092
57. Fu Y, Nagy JA, Brown LF, Shih SC, Johnson PY, Chan CK, et al. Proteolytic cleavage of versican and involvement of ADAMTS-1 in VEGF-A/VPF-induced pathological angiogenesis. *J Histochem Cytochem.* (2011) 59:463–73. doi: 10.1369/0022155411401748

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 dos Reis, Damasceno, de Campos, Veloso, Pêgas, Kraemer, Rodrigues, Mattos, Gomes, Campos, Ferreira, Russo and Cassali. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4. Artigo submetido para o periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Anexo 2)

Evaluation of the immunomodulatory activity of thalidomide on tumor-associated macrophages in 4T1 murine metastatic breast cancer model

Avaliação do efeito imunomodulador da talidomida em macrófagos associados a tumores no modelo murino de câncer de mama metastático 4T1

Diego Carlos dos Reis¹, Michele Angela Rodrigues¹, Sophia Gia Brandão Pinto¹, Ana Cândida Araújo e Silva¹, Giovana Vieira Moreira¹, Liliane Cunha Campos¹, Paula Peixoto Campos¹, Sílvia Ligório Fialho², Miriam Teresa Paz Lopes¹, Dawidson Assis Gomes¹, Remo de Castro Russo¹ (, Enio Ferreira^{1*}, Geovanni Dantas Cassali^{1*#}

1 Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte.

2 Pharmaceutical and Biotechnological Development, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte.

*These authors contributed equally for this work.

Corresponding author: Geovanni D. Cassali, Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Antonio Carlos Avenue, 6628, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil. Email: cassalig@icb.ufmg.br

Resumo

Foi avaliado o efeito imunomodulador de diferentes doses de talidomida em macrófagos associados ao tumor (TAMs) em um modelo murino de câncer de mama. Camundongos foram inoculados com células 4T1 na região do flanco esquerdo e tratados com talidomida uma vez ao dia nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg por massa corporal. Os tumores foram medidos, o índice de proliferação celular e a contagem de TAMs foram avaliados nos tumores primários e pulmões com metástases. Além disso, a taxa de metástases pulmonares também foi avaliada. A talidomida na dose de 150 mg/kg diminuiu significativamente o crescimento tumoral, o índice de proliferação celular e a infiltração de TAMs nos tumores primários. Por outro lado, um maior número de TAMs e menor índice de proliferação celular foram observados nos pulmões metastáticos em resposta ao aumento das concentrações de talidomida. Ademais, a talidomida na dose de 150 mg/kg diminuiu significativamente os nódulos metastáticos nos pulmões. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com talidomida diminuiu o crescimento tumoral e as metástases pulmonares em camundongos associado com diferentes efeitos na infiltração de TAMs nesses locais.

Palavras-chave: câncer de mama, imunomodulação, talidomida, inflamação, macrófagos associados ao tumor

Abstract

Herein we evaluated the immunomodulatory effect of thalidomide (Thal) at different doses on tumor-associated macrophages (TAMs) in a mouse model of human breast cancer. Mice were inoculated with 4T1 cells in the left flank and treated with Thal once a day at concentrations of (50, 100, and 150 mg/kg body weight from the 5th day until 28th day of tumor inoculation. The tumors were sized, proliferation index, and TAMs count were evaluated in primary tumors and metastatic lungs. In addition, the metastasis rate was also evaluated in the lungs. Thal at 150 mg/kg significantly decreased tumor growth, proliferation index, and TAMs infiltration in primary tumors. Conversely, a higher number of TAMs and lower proliferation index were observed in metastatic lungs in response to increasing Thal concentrations. Furthermore, Thal at 150 mg/kg significantly decreased the metastatic nodules in the lungs. Our findings demonstrated that Thal treatment considerably decreased the primary tumor and lung metastasis in mice associated with different effects on TAM infiltration in these sites.

Keywords: breast cancer, immunomodulation, thalidomide, inflammation, tumor-associated macrophages

Introduction

The tumor microenvironment is composed of different cell types, including stromal and inflammatory cells (Qualil and Joyce, 2013). Solid tumors are commonly infiltrated with innate immune cells, including tumor-associated macrophages (TAMs), which represent the major inflammatory component of the stroma of many tumors (Ruffell *et al.*, 2012; Chevier *et al.*, 2017; Mei *et al.*, 2016). TAMs may either block or facilitate tumor growth, depending on their activation status. M1-like TAMs are recognized as anti-tumoral macrophages, whereas M2-like TAMs are shown to have pro-tumoral activities (Allavena *et al.*, 2008; Laoui *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2014). In human breast carcinomas, M2-like TAMs density correlates with poor prognosis (Pollard, 2008; Lindsten *et al.*, 2017), and macrophages depletion has been shown to delay tumor progression (Laoui *et al.*, 2011).

Thal, originally a morning sickness drug and later shown to have teratogenic effects, was in recent years shown to exhibit immunomodulatory and anti-angiogenic effects in inflammatory and neoplastic diseases (Moos *et al.*, 2003; Eleutherakis-Papaiakovou *et al.*, 2004). One of its mechanisms of immunomodulation has been linked to the protein Cereblon, which in turn, is the primary target of Thal teratogenicity (Ito *et al.*, 2010). In multiple myeloma, this protein is required for response to immunomodulatory drugs, and its decreased expression has been correlated with resistance to therapy (Zhu *et al.*, 2011). In contrast, cereblon-deficient mice presented the immunomodulatory effect of Thal, even in the absence of cereblon (Millrine *et al.*, 2016).

Herein, we used the murine mammary carcinoma 4T1 to evaluate the effect of different doses of Thal in TAMs infiltration and metastatic tumor growth. The 4T1 tumor is a highly metastatic cell line which when transplanted to the mammary gland, can spontaneously metastasize from the primary tumor to multiple distant sites, including lymph nodes, liver, lung, brain, and bone (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001). Interestingly, previous studies have shown that an increased myeloid cell infiltration follows 4T1 tumor development into the primary tumor and its metastasis (DuPré *et al.*, 2007; Dos Reis *et al.*, 2019), making it a useful model to study the role of TAMs in breast carcinogenesis.

Methods

Breast cancer mouse cell line 4T1 was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, USA). 4T1 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Hyclone, Logan, UT) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (Invitrogen) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Thirty-two six-week-old female BALB/c mice were acquired from the Animal Facility–Institute of Biological Science–Federal University of Minas Gerais; Belo Horizonte–Brazil. Mice were divided into four groups (n=8) and kept in polycarbonate cages and had free access to mouse chow (Quimtia, Paraná, Brazil) and water *ad libitum*. Mice were housed under standard laboratory conditions at 25°C in a 12-hr light: dark cycle. The research protocol was approved by the Federal University of Minas Gerais Ethics Committee on Animal Use under protocol number 262/2012.

Mice were subcutaneously inoculated with 2.5×10^6 4T1 cells in the left flank area. Treatment started five days of tumor inoculation and continued for 23 days. Thal (kindly provided by Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brazil) was diluted in saline 0.9% and 0.25% Tween (Dako, Carpinteria, USA) at final concentrations of 50, 100, and 150 mg/kg body weight day and it was daily administered by gavage. The control group received vehicle (saline 0.9% + Tween20 0.25%) using the same regimen. Tumor-bearing mice were weighed, and the primary tumor measured with a caliper every other day. Tumor volume was calculated using the formula: tumor volume (mm³) = (length x width)²/2. On a twenty-ninth day, mice were euthanized by anesthetic overdose (sodium pentobarbital 50 mg/kg, intraperitoneal injection i.p.). Blood was collected for biochemical evaluation of urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and gamma-glutamyl transferase (GGT) and complete blood count (CBC). Primary tumor and lung were collected, weighed, and sampled for histopathological, biochemical, and cytokine analysis. Blood smears were obtained and stained with May-Grunwald-Giemsa (Sigma-Aldrich) for differential leukocyte evaluation through an optical microscope Olympus BX50 (Japan), 40x objective.

Primary tumor and right lung samples from 4T1 tumor-bearing mice were weighed and homogenized to perform the ELISA, as previously described (Dos Reis *et al.*, 2019).

The cytokine TNF- α and chemokine CCL2 were quantified using DuoSet ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). For histopathological, histomorphometry, and lung metastasis evaluation, primary tumor and left lung fragments were fixed in 10% buffered formalin for 48 h, embedded in paraffin, and processed for light microscopic evaluation of hematoxylin and eosin (H&E) stained slides. For metastasis assessment, neoplastic cellular nodules disseminated throughout the lung parenchyma or alveolar spaces were considered metastatic lesions (Dos Reis *et al.*, 2019). Metastasis quantification was performed by counting the total of metastatic nodules in one section from left lung (single lobe) in an Olympus microscope (BX-40), using the 10x and 40x objectives. The inflammatory infiltrates in the primary tumor were systematically classified based on the distribution (as focal: the presence of 1-3 inflammatory foci; multifocal: the presence of more than three inflammatory foci; and diffuse: the presence of inflammatory cells evenly distributed in the tumor section) and intensity (discrete +, moderate ++ or intense +++), as described by Estrela-Lima *et al.*, (2010). Cell profiles were classified into mononuclear, polymorphonuclear, and mixed inflammatory cell patterns. For histomorphometry analysis, the percentages of the tumor, necrosis, inflammation (inflammatory cells, hemorrhage, and edema), and normal tissue areas were calculated in 15 histologic fields using a graticule scale of 25 dots. Histological images were obtained from the capture system using a SPOT 3.4.5 Basic[®] camera adapted to an Olympus microscope (BX-40) and the images were analyzed using Corel Draw[®] software version 7.468.

Immunohistochemistry assay was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue (4 μ m) of primary tumors and lungs deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohol. Antigen retrieval was achieved by water bath boiling for 20 minutes in citrate buffer pH 6 (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) at 98°C. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxidase in methanol. For blocking of non-specific binding Biotin blocking system (Dako) was used. Primary antibodies (CDC47, 1:300, clone 47DC141, Neomarkers, Fremont, CA or iNOS2, 1:300, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Europe) were incubated for 1 h and secondary anti-rabbit HRP antibody (Advance HRP enzyme, Dako) for 30 min at room temperature. Slides were stained with diaminobenzidine (DAB) chromogen (Dako) and counterstained with hematoxylin. CDC47 expression index was obtained by estimating the percentage of positive cells in 500 tumor cells (Souza *et al.*, 2012).

iNOS2 was analyzed with the ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Ten images at 40x magnification were obtained from the capture system with a SPOT 3.4.5 Basic[®] micro-camera adapted to an Olympus light microscope (BX-40).

Immunofluorescence and confocal microscopy were also performed in the primary tumor and lung FFPE fragments, as previously described, with minor changes (Dos Reis *et al.*, 2019). Primary antibodies used were F4/80 (1:150, clone mAb BM8, Hycult Biotech, Uden, The Netherlands) and conjugated anti-CD11b-PE (1:100, clone M1/70, BD Biosciences, USA) to label macrophages. The secondary antibody used was Goat Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor[®] 488 (1:1000, Life Technologies). Nuclei were stained with Hoechst dye 33258 (1 µg/mL, Life Technologies) before coverslip mounting for immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 5 Live, Carl Zeiss, Jena, Germany) using an oil 40x 1.3 NA objective lens. Statistical analyses were performed using the Graph Pad Prism v.5 software (San Diego, CA). The Kruskal Wallis test followed by Dunn's *posthoc* test was used to assess whether there were differences on tissue inflammation among control and Thal treated groups. The one-way ANOVA test followed by the Student-Newman-Keuls *post-hoc* test was used to assess whether there are the differences in parametric data. The values were considered significant when $P < 0.05$.

Results

The oral administration of Thal (50, 100, 150 mg/kg) on 4T1 tumor-bearing mice did not presented side effects in biochemical serum indices for urea, creatinine, AST, and GGT as compared to the control group (Table 1). High ALT levels were observed on group treated with 100 mg/kg of Thal as compared to the control group ($P < 0.01$) (Table 1). For hematological indices, a decrease in total leukocytes was observed in the groups treated with 100 mg/kg and 150 mg/kg of Thal ($P < 0.05$) as compared to the control group (Table 2). Thal at a dose of 150 mg/kg significantly inhibited tumor growth as compared to the control group ($P < 0.05$) (Figure 1A). Histological analyses revealed a diffuse inflammatory infiltrate distributed predominately in peripheral areas of primary tumors, which was greater in Thal treated groups (Figure 1B). The intratumoral inflammatory infiltrate in most tumors was weak, consisting of mononuclear cells and often associated with necrosis areas (not shown); except from tumors treated with 150 mg/kg of Thal, which showed greater infiltration of

mononuclear cells ($P < 0.05$) (Figure 1B). The histomorphometry analysis corroborated these results, showing high inflammation areas in tumors treated with 100 mg/kg ($P < 0.01$) and 150 mg/kg ($P < 0.001$) of Thal (Figure 1C). Additionally, tumors treated with 150 mg/kg of Thal presented a smaller percentage of necrotic areas ($P < 0.05$) (Figure 1C). Furthermore, Thal treatment reduced neoplastic areas with significant differences in the groups treated with 50 and 100 mg/kg compared with the control group ($P < 0.05$) (Figure 1C).

Table 1: Thalidomide effects in the serum of 4T1 tumor-bearing.

	Control	Thal 50	Thal 100	Thal 150
Urea (mg/dl)	74.6 ± 46.3	106.5 ± 54.6	82.7 ± 39.9	91.9 ± 25.6
Creatinine (mg/dL)	1.9 ± 1.2	2.7 ± 0.6	2.4 ± 0.6	2.7 ± 0.6
AST (U/L)	199.1 ± 64.54	241.5 ± 40.04	250.6 ± 28.48	254.1 ± 45.11
ALT (U/L)	56.3 ± 13.6	77.0 ± 12.02	98.7 ± 32.85**	84.1 ± 24.03
GGT (U/L)	1.3 ± 0.5	1.7 ± 0.5	1.9 ± 0.07	2.0 ± 0.8

AST: Aspartate Aminotransferase, ALT: Alanine Aminotransferase, GGT: Gamma-glutamyltransferase. The results relate to the average ± standard deviation. ** $P < 0.01$.

Table 2: Thalidomide effects in the hematological index of 4T1 tumor-bearing.

	Control	Thal 50	Thal 100	Thal 150
Erythrocytes (/mm ³)	8.14 ± 1.623	7.77 ± 2.30	8.654 ± 0.46	9.353 ± 0.47
Hemoglobin (g/dl)	13.24 ± 2.56	12.76 ± 3.43	13.96 ± 0.81	14.89 ± 1.21
Hematocrit (%)	42.89 ± 12.03	40.04 ± 13.62	47.56 ± 4.85	50.59 ± 3.83
MCV (fl)	49.60 ± 6.40.	49.16 ± 5.35	54.23 ± 4.10	53.11 ± 2.94
White Blood Cells (/mm ³)	8.374 ± 1.24	7.781 ± 1.20	6.741 ± 0.84*	6.574 ± 0.81*
Lymphocytes (%)	6.9 ± 3.5	8.6 ± 4.6	10.3 ± 2.9	11.4 ± 5.8
Neutrophil granulocytes (%)	85.9 ± 1.5	84.6 ± 3.9	81.4 ± 5.6	81.1 ± 6.9
Monocytes (%)	1.6 ± 0.5	1.6 ± 1.1	2.3 ± 1.2	2.3 ± 1.0
Band neutrophil (%)	1.9 ± 1.3	2.6 ± 0.9	3.1 ± 1.9	2.6 ± 1.3
Eosinophil granulocytes (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Basophil granulocytes (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Ring cell (%)	2.7 ± 1.4	2.6 ± 1.7	2.3 ± 2.3	2.6 ± 1.3
Blasts (%)	0.3 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.4 ± 1.1	0.0 ± 0.0
Platelets (/mm ³)	745.000 ± 212.2	658.500 ± 198.9	736.400 ± 178.3	519.600 ± 214.8

MCV: mean corpuscular volume. The results relate to average ± standard deviation (* $P < 0.05$).

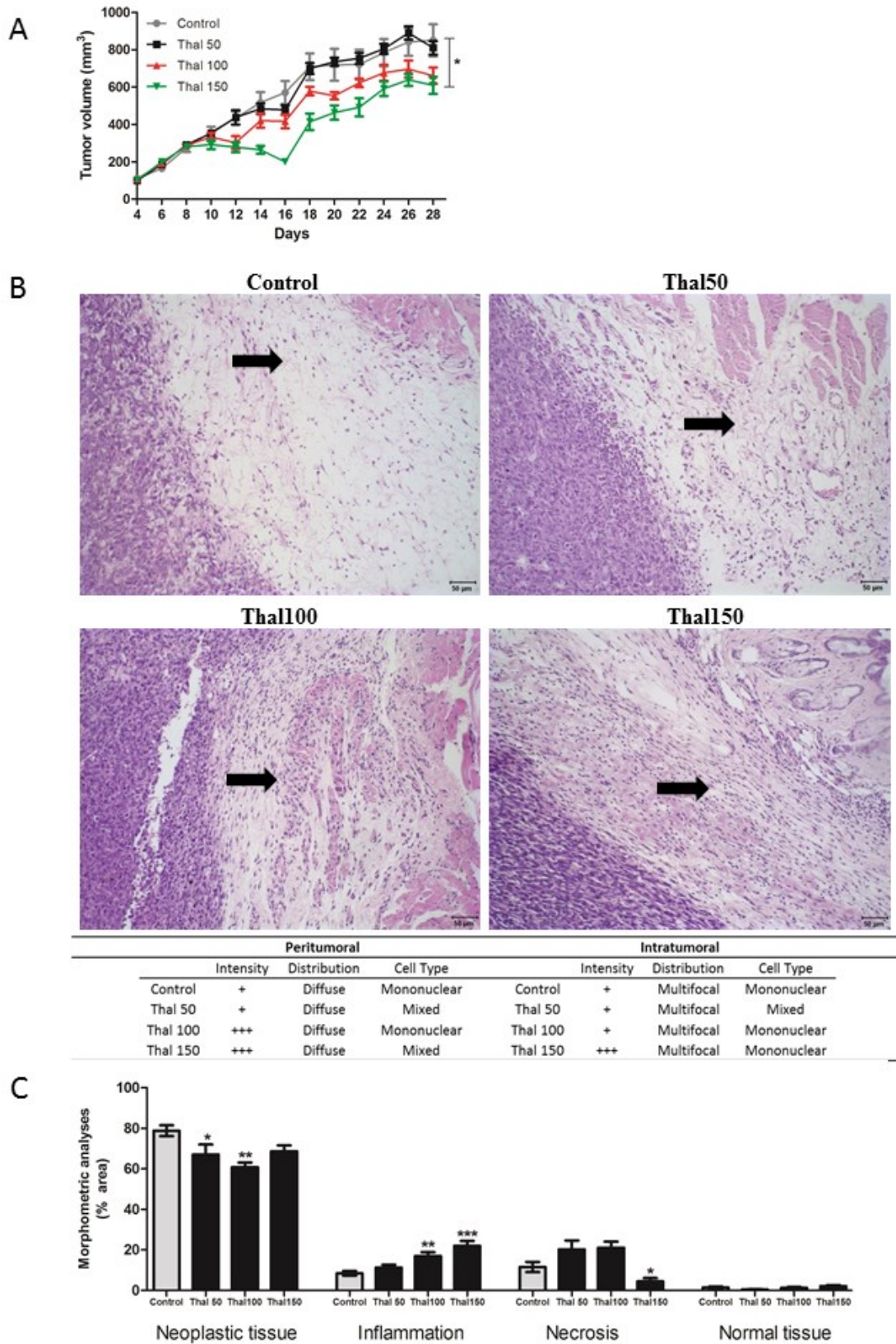


Figure 1: Thalidomide decreased 4T1 tumor growth associated with increased tumor inflammatory infiltration. A) Mice were subcutaneously inoculated with 2.5×10^6 4T1 cells in the left flank. Thal was administrated at doses of 50, 100, and 150 mg/Kg body weight (n = 24)

for 24 consecutive days. The control group received the vehicle in the same regime (n = 8). Thal significantly inhibited tumor growth at a dose of 150 mg/kg. B) Tissue inflammation was evaluated in peripheral and intratumoral areas from 4T1 tumor sections stained with H&E. Inflammation was systematically classified based on distribution and intensity, as described in the methodology. Thal administration at dose 150 mg/kg significantly increases inflammation in peripheral and intratumoral areas of the 4T1 tumor. Representative H&E images of primary tumor peripheral areas. C) Morphometric analysis was performed to obtain the percentages of the tumor, necrosis, inflammation (inflammatory cells, hemorrhage, and edema), and normal tissue areas. Thal administration decreases tumor areas associated with increased inflammation. One-way ANOVA test followed by the Student-Newman-Keuls *post-hoc* test was used to evaluate differences in (B) and (D). Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s *post-hoc* test was used to evaluate differences in (C). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, respectively.

To confirm the anti-tumor effect of Thal in the primary tumor and lung metastasis of murine mammary carcinoma 4T1, we assessed the proliferation index of tumor cells by CDC47 expression. Mice treated with 100 mg/kg and 150 mg/kg of Thal presented a lower neoplastic proliferation index in primary tumors than mice from the control group ($P < 0.05$) (Figure 2 A-E). In the lung, Thal treatment reduced proliferation index of metastatic nodules at dose of 50 mg/kg ($P < 0.05$), 100 mg/kg ($P < 0.05$) and 150 mg/kg ($P < 0.01$) (Figure 2 F-J). Besides, the histological analysis also revealed a reduction in the number of metastatic lung nodules from 150 mg/kg Thal-treated group as compared to control ($P < 0.05$) (Figure 2 K).

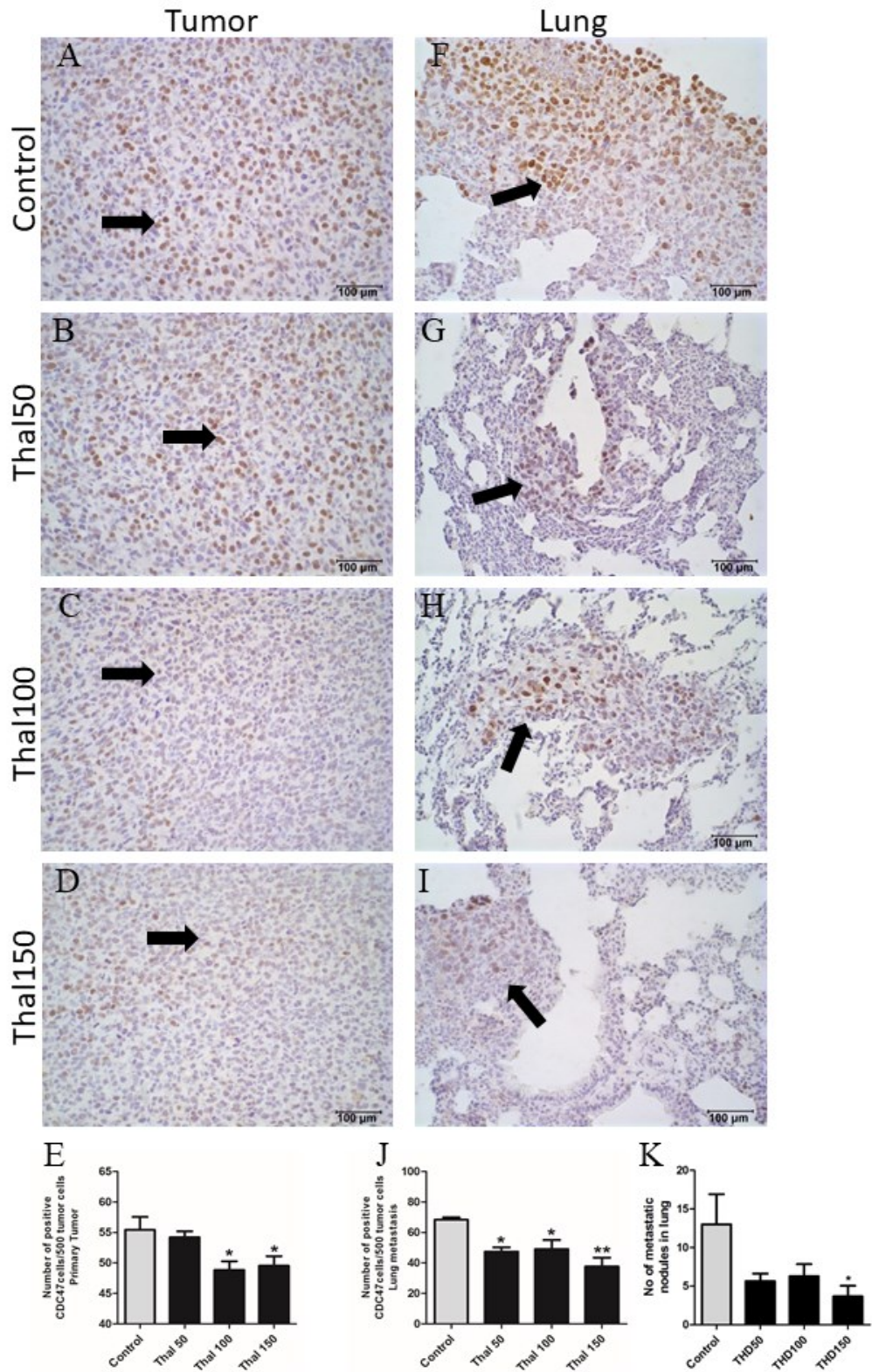


Figure 2: Thalidomide reduces the neoplastic proliferation of primary tumor and lung metastases of the 4T1 tumor. A-D) Representative images of tumor cross-sections stained with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) by immunohistochemistry. E) Proliferative index quantification

shows a decrease in neoplastic proliferation in primary tumor after Thal administration at doses of 100 and 150 mg/kg per body weight as compared to control. F-I) Representative images of lung metastases cross-sections stained with DAB by immunohistochemistry. J) Proliferative index quantification shows a decrease in neoplastic proliferation in lung metastasis after Thal administration at doses of 50, 100, and 150 mg/kg per body weight as compared to control (n = 32). K) Metastasis quantification shows a decrease in metastatic nodules after Thal administration at doses 150 mg/kg per body weight as compared to control. Results are shown as the mean \pm SEM. One-way ANOVA test followed by the Student-Newman-Keuls post-hoc test to evaluate differences in E, J, K. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Next, we measured the levels of CCL2 and TNF- α in the primary tumor and lungs of 4T1 tumor-bearing mice. We observed a reduction of CCL2 levels only in mice treated with 50 mg/kg of Thal ($P < 0.05$) (Figure 3A), while no significant changes were observed in TNF- α levels (Figure 3B). In the lung, CCL2 levels increased progressively in all treated groups ($P < 0.01$) (Figure 3C). Higher TNF- α levels were found after 100 mg/kg ($P < 0.05$) and 150 mg/kg ($P < 0.01$) of Thal as compared to control group (Figure 3D).

To assess the immunomodulatory effect of Thal on TAMs, confocal analyses were carried out. Two macrophages populations were identified based on the cell-surface expression of the F4/80 marker combined with CD11b marker, F4/80+CD11b⁻ cells and F4/80+CD11b⁺ cells. (Figure 3E-G). The F4/80+CD11b⁻ macrophages was found increased in absolute numbers in tumors from the control group and it decreased after Thal treatment ($P < 0.05$), while no differences were found on F4/80+CD11b⁺ macrophages among control and treated groups (Figure 3E). In the lungs, the F4/80+CD11b⁻ macrophages increased progressively after 50, 100, and 150 mg/kg of Thal administration (0.05, 0.01, 0.001, respectively) (Figure 3F). Furthermore, differences in the distribution and macrophage morphology were visualized in control and treated groups. After Thal administration, TAMs were distributed as multifocal aggregates, while in the control group these cells showed isolated and diffusely distributed in the lung parenchyma (data not shown).

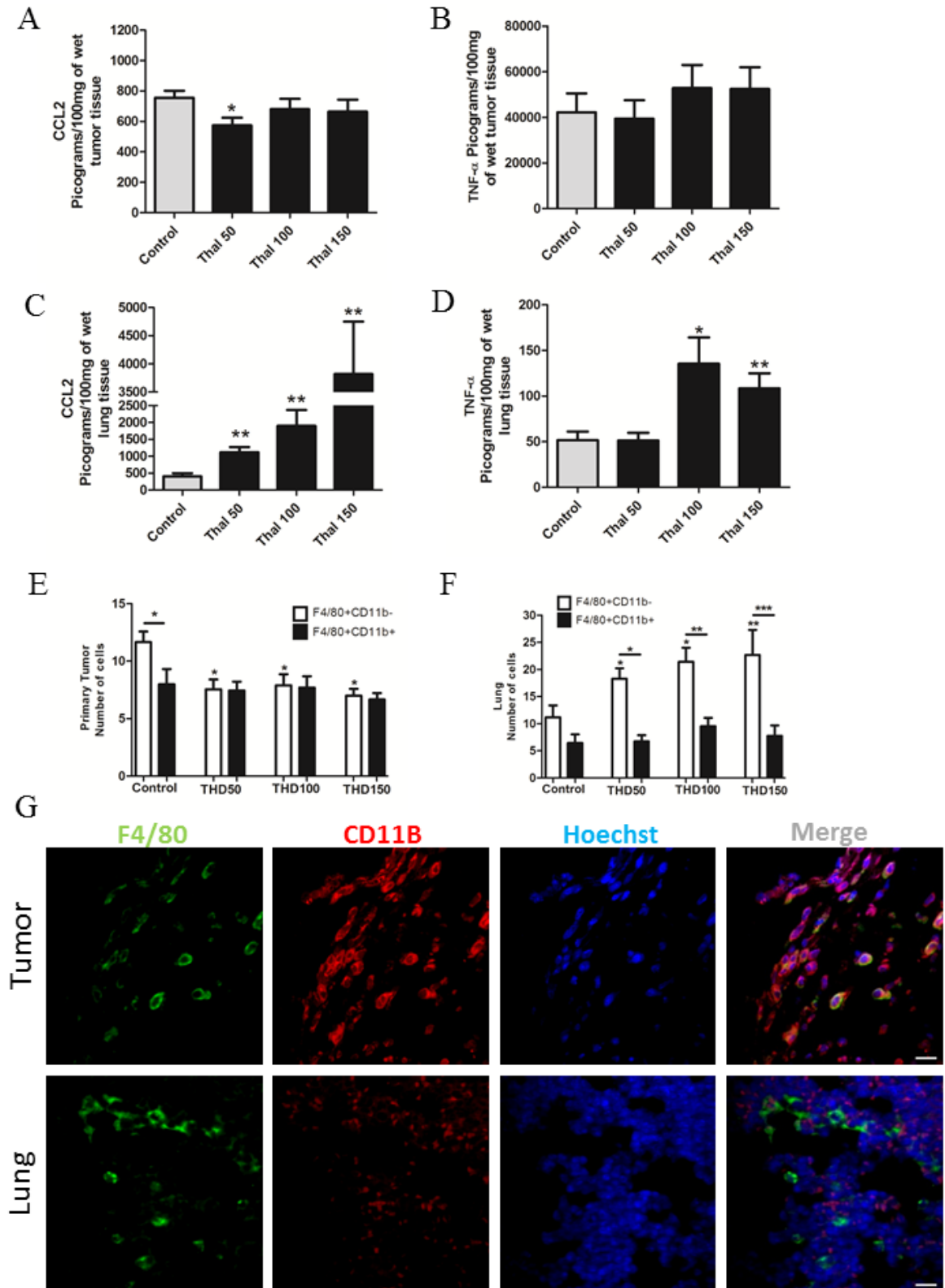


Figure 3: Thalidomide effects on TAMs infiltration in the 4T1 primary tumor and lungs. A-D) Effect of Thal administration at doses of 50, 100, and 150 mg/kg per body weight or vehicle (control group) in CCL2 and TNF- α levels, respectively. E) TAMs quantification shows a decrease in TAMs infiltration in primary tumor after Thal administration at a dose of 50, 100,

and 150 mg/kg per body weight. F) TAMs quantification shows a progressive increase in TAMs infiltration in metastatic lungs after Thal administration at a dose of 50, 100, and 150 mg/kg per body weight. (G) Representative confocal images show the effect of vehicle or Thal administration at different doses in TAMs recruitment in the primary tumor (upper panel) and lung (bottom panel). Bars represent 20 μ M. Results are shown as the mean \pm SEM. One-way ANOVA test followed by the Student-Newman-Keuls post-hoc test to evaluate differences in A-F. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

How these results suggested an immunomodulatory effect of Thal possibly inducing an M1-like TAMs phenotype, we also performed an iNOS single staining, a murine M1 polarization marker (Laoui *et al.*, 2011). The iNOS expression was found in the cytoplasm of endothelial cells and leukocytes infiltrated in the primary tumor (Figure 4 A-D). In the lung, the iNOS expression was more restricted to inflammatory cells presented in blood vessels and the vicinity of them, while the lung parenchyma presented a weak to none iNOS expression (Figure 4 G, H). However, inflammatory cells infiltrated in the metastatic nodules showed a positive iNOS expression. (Figure 4 F, I). The quantification analyses revealed higher iNOS expression in tumors treated with 100 and 150 mg/kg of Thal as compared to the control group ($P < 0.001$) (Figure 4 E). In contrast, in the lung, the iNOS expression showed higher from all treated groups as compared to control ($P < 0.001$) (Figure 4 J).

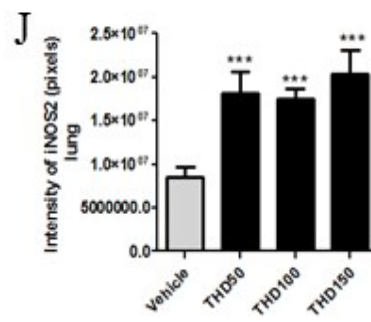
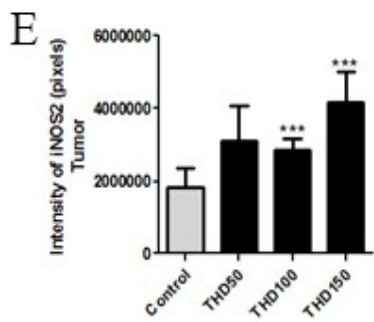
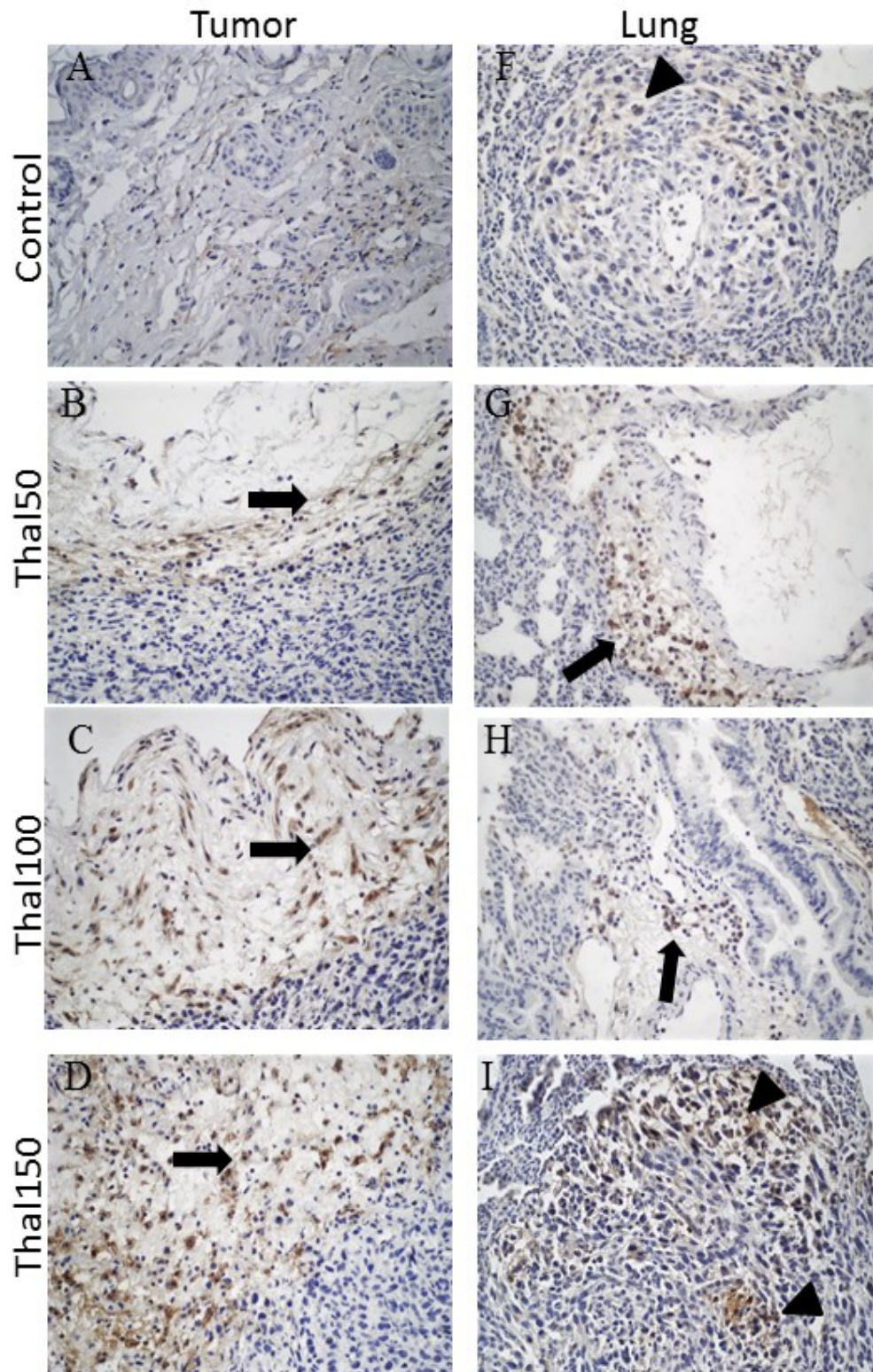


Figure 4: Thalidomide treatment increases tissue inducible nitric oxide synthase enzyme (iNOS) expression in primary tumors and lungs of the 4T1 tumor-bearing mice. A-D) Representative images of tumor cross-sections stained with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) by immunohistochemistry. Arrows show stained inflammatory cells presented in peripheral areas of primary tumors. E) Higher iNOS expression presented in the primary tumors from animals treated with 100 and 150 mg/kg of Thal as compared to control animals. F-I) Representative images of lung cross-sections stained with DAB by immunohistochemistry. Arrowheads show stained inflammatory cells infiltrated in lung metastasis nodules. Arrows show stained inflammatory cells presented in the vicinity of blood vessels. J) Higher iNOS expression presented in the lung tissue of tumor-bearing mice treated with 50, 100 and 150 mg/kg of Thal as compared to control. (n = 32). Results are shown as the mean \pm SEM. One-way ANOVA test followed by the Student-Newman-Keuls post-hoc test to evaluate differences in A-F. * P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001.

Discussion

Our previous reports have demonstrated that Thal used as a monotherapy or combined therapy displays anti-tumor activity in murine (Souza *et al.*, 2012, 2014; Reis *et al.*, 2014) and canine mammary tumor models (Campos *et al.*, 2017, 2018). In this work, we attempted to understand the potential immunomodulatory effect of this drug on TAMs using a murine metastatic breast cancer model. Our findings demonstrated that prolonged administration of Thal exhibited an immunomodulatory and an anti-tumor action in the primary tumor and lung metastases of 4T1 tumor-bearing mice. While higher Thal doses induced inflammation in the primary tumor and metastatic lungs, marked differences were found in TAMs infiltration between these two sites. In the lung, higher doses of Thal were associated with accumulation of F4/80+CD11b-macrophages, whereas in the primary tumor, these cells showed decreased abundance after Thal therapy.

Thalidomide therapy in human medicine has been associated with certain side effects, including peripheral neuropathy, thrombotic events, constipation, and drowsiness, particularly when used in high doses (Eleutherakis-Papaiakovou *et al.*, 2004). In this study, the laboratory parameters did not show significant side effects after Thal administration. At the higher dose, Thal reduced the tumor growth and neoplastic proliferation of the 4T1 primary tumors and their lung metastasis. Considering the

growth curve, the efficacy of Thal at dose 150 mg/kg appeared to be higher at day 16 than the difference decreases until the end of treatment. However, these animals still presented a smaller number of metastatic lung nodules after Thal therapy. Our group also reported similar data in spontaneous canine mammary tumors, showing hindered lung metastasis progression after Thal therapy (Campos *et al.*, 2017).

Thal has been used in cancer treatment, mostly due to its anti-angiogenic potential (Stewart, 2014). However, the Thal immunomodulatory effect has also been shown as an important mechanism of tumor inhibition in mouse cancer models (Kawamata *et al.*, 2006) and human cancer therapy (Stewart, 2014). In the current study, we have only focused on the assessment of tumor proliferation and characterization of TAMs infiltration in response to different doses of Thal. Histological analyses revealed the anti-tumor effect of Thal was accompanied by an increase in the inflammatory cells in the tumor microenvironment from the primary and secondary metastatic sites. Mononuclear cells appeared to be predominantly increased in the primary tumor after high doses of Thal. Additionally, confocal microscopy revealed that these mononuclear cells consisted of a low abundance of TAMs. These findings corroborated by previous studies suggesting an immunomodulatory effect of Thal on different mononuclear immune cell populations (Kawamata *et al.*, 2006).

Metastasis is a major contributor to deaths from solid tumors (Gupta and Massagué, 2006). Breast cancer may metastasize to the lymph nodes and distant organs, being the lung one of the preferential sites for breast cancer metastases (Rahman and Mohammed, 2015). Our work shows that Thal reduced lung metastasis associated with increased macrophages infiltration and was observed more significantly in the higher dose of Thal (e.g., 150 mg/kg). In the lungs of 4T1 tumor-bearing mice, TAMs showed two distinctly phenotypes: F4/80+CD11b⁻ and F4/80+CD11b⁺ cells. These two populations have been shown to present different functions in inflammatory (Ariel and Serhan, 2012) and neoplastic diseases in mice (Qian *et al.*, 2012). The first phenotype described as F4/80+CD11b⁻ macrophages showed progressively increased in the lung after Thal administration.

On the other hand, the F4/80+CD11b⁺ macrophage population did not change after Thal therapy. The lung tissue of tumor-bearing mice also presented with greater CCL2 and TNF- α levels, and iNOS2 expression after higher doses of Thal. TAMs in contact

with interferon- γ (IFN- γ), and of other proinflammatory agents such as TNF- α and bacterial lipopolysaccharide (LPS) polarize to an M1-like phenotype. This classical activation results in improved anti-tumor capacity and enhanced secretion of proinflammatory cytokines, such as TNF- α , interleukin-12 (IL-12) e oxide nitric (NO), to further strengthen the cell-mediated adaptive immunity. In contrast, alternatively activated macrophages or M2-like macrophages are polarized by IL-4 and IL-13 and other stimuli such as glucocorticoid hormones and immune complexes (Allavena *et al.*, 2008; Laoui *et al.*, 2011). Opposite to M1-like activation, these macrophages are associated with immunosuppressive and pro-tumoral capacities. A previous study has demonstrated that Thal can act switching the M2 to M1 phenotype of murine macrophages in asthma disease model (Lee *et al.*, 2015). Thus, taken together, our results suggest that Thal could induce the activation of TAMs to the anti-tumoral phenotype in 4T1 tumor-bearing mice. To better elicit these findings, the phenotyping of TAMs by flow cytometer would consist of a great approach. However, how the Thal treatment used as a single agent presented modest inhibition on metastatic development of 4T1 tumor, we think future studies combining Thal and a chemotherapy drug could represent a better strategy.

Conclusion

In conclusion, our study demonstrated that Thal treatment enhanced the TAMs infiltration in lung metastases and decreased it in the primary tumor of 4T1 tumor-bearing mice. These effects were associated with a decrease in neoplastic proliferation and metastatic lung nodules.

Acknowledgments and funding

This work was supported in part by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (No. 457386/2014-2) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The microscopic data shown in this work were obtained using the microscopes of “Centro de Aquisição e Processamento de Imagens” (CAPI -ICB/UFMG).

References

Allavena, P.; Sica, A.; Garlanda, C. et al. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol. Rev.*, v.222, p.155-61, 2008.

Ariel, A.; Serhan, C.N. New lives given by cell death: Macrophage differentiation following their encounter with apoptotic leukocytes during the resolution of inflammation. *Front. Immunol.*, v.3, n.4, p.1–6, 2012.

Campos, C.B.; Lavalle, G.E.; Ligório, S. F. et al. Thalidomide treatment in a canine mammary gland carcinosarcoma presenting pulmonary metastasis. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, v.5, n.3, p.120–126, 2017.

Campos, C.B.; Lavalle, G.E.; Monteiro, L.N. et al. Adjuvant thalidomide and metronomic chemotherapy for the treatment of canine malignant mammary gland neoplasms. *In Vivo*, v.32, n.6, p.1659-1666. 2018.

Chevrier, S.; Levine, J.H.; Zanotelli, V.R.T. et al. An immune atlas of clear cell renal cell carcinoma. *Cell*, v.169, p.736–749, 2017.

Dos Reis, D.C.; Damasceno, K.A.; Campos, C.B. et al. Versican and tumor-associated macrophages promotes tumor progression and metastasis in canine and murine models of breast carcinoma. *Front Oncol.*, v.9, n.577, 1-14, 2019.

DuPré, S.A.; Redelman, D.; Hunter, K.W. The mouse mammary carcinoma 4T1: Characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int. J. Exp. Pathol.*, v.88, n.5, p.351–360, 2007.

Eleutherakis-Papaiakovou, V.; Bamias, A.; Dimopoulos. M.A. Thalidomide in cancer medicine. *Ann. Oncol.*, v.15, n.8, p.1151-60, 2004.

Estrela-Lima, M.S.; Araujo, J.M; Costa-Neto, A. et al. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*, v.10, n.256, p.1-14, 2010.

Gupta, G.P.; Massagué, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, v.127, n.4, p.679–695, 2006.

Ito, T.; Ando, H.; Suzuki, T. et al. T Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*, v.327, n.5971, p.1345-50, 2010.

Kawamata, D.; Ito, T.; Odani, T. et al. Thalidomide suppresses melanoma growth by activating natural killer cells in mice. *Oncol. Rep.*, v.16, n.6, p.1231–1236, 2006.

Laoui, D.; Movahedi, K.; Van Overmeire, E. et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int. J. Dev. Biol.*, v.55, n.7-9, p.861-7, 2011.

Lee, H.S.; Kwon, H.S.; Park, D.E. et al. Thalidomide inhibits alternative activation of macrophages in vivo and in vitro a potential mechanism of anti-asthmatic effect of thalidomide. *PLoS One*, v.10, n.4, p.1–15, 2015.

Lindsten, T.; Hedbrant, A.; Ramberg, A. et al. Effect of macrophages on breast cancer cell proliferation, and on expression of hormone receptors, uPAR and HER-2. *Int. J. Oncol.*, v.51, n.1, p104-114, 2017.

Mei, J.; Xiao, Z.; Guo, C. et al. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: A systemic review and meta-analysis. *Oncotarget*, v.7, n.23, p.34217-28, 2016.

Millrine, D.; Haruhiko, M.; Tei, M. et al. Immunomodulatory drugs inhibit TLR4 induced type-1 interferon production independently of Cereblon via suppression of the TRIF/IRF3 pathway. *Int. Immunol.*, v.28, n.6, p.307-15, 2016.

Pulaski, B.A.; Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.*, v.20, unit.20.2., 2001.

Murray, P.J.; Allen, J.E.; Biswas, S.K. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, v.41, n.1, p.14-20, 2014.

Pollard, J.W. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J. Leukoc. Biol.*, v.84, n.3, p.623-30, 2008.

Qian, B.Z.; Li, J.; Zhang, H. et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, v.475, n.7355, p.222–5, 2011.

Quail, D.; Joyce J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.*, v.19, p.1423–1437, 2013.

Rahman, M.; Mohammed, S. Breast cancer metastasis and the lymphatic system. *Oncol. Lett.*, v.10, n.3, p.1233–1239, 2015.

Reis, D.C.; Souza, C.M.; Campos, L.C. et al. Thalidomide promotes leukocytosis in mice inoculated with 4T1 mammary carcinoma. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, v.50, n.1, p64–66, 2014.

Ruffell, B.; Au, A.; Rugo, H.S. et al. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.109, n.8, p.2796-801, 2012.

Souza, C.M.; Carvalho, L.F.; Vieira, T.S. et al. Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice. *Biomed. Pharmacother.*, v.66, n.7, p.491–498, 2012.

Souza, C.M.; Silva, A.C.A.; Ferracioli, C.J. et al. Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model. *Biomed. Pharmacother.*, v.68, n.1, p.51–57, 2014.

Stewart, A.K. How Thalidomide Works Against Cancer. *Science*, v.343, n.6168, p.256–257, 2014.

Von Moos, R.; Stolz, R.; Cerny, T. et al. Thalidomide: From tragedy to promise. *Swiss Med Wkly*, v.133, n.5-6, p.77-87, 2003.

Zhu, Y.X.; Braggio, E.; Shi, C.X. et al. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood*, v.118, n.18, p.4771-9, 2011.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os modelos animais em oncologia mamária representam uma ferramenta importante em estudos envolvendo o microambiente tumoral e os componentes do sistema imune. Devido à alta complexidade de eventos que acompanha o desenvolvimento das neoplasias, sobretudo aqueles relacionados ao sistema imune, os estudos em camundongos utilizando tumores transplantáveis são amplamente justificáveis. Apesar de haver diferenças importantes já descritas entre os componentes do sistema imune de camundongo e humano (MESTAS; HUGHES, 2018; SHAY *et al.*, 2013), a facilidade de reprodução, o baixo custo de manutenção e a facilidade na manipulação do material genético ainda representam fatores importantes para o uso desses animais (TAO; REESE, 2017). Além dos modelos murinos, no Laboratório de Patologia Comprada, as neoplasias mamárias espontâneas da cadela têm sido utilizadas também como modelo de estudo de carcinogênese mamária. Esse modelo tem como vantagem as lesões espontâneas mamárias que compartilham assinaturas genéticas semelhantes ao encontrado no câncer de mama da mulher. Ademais, o tempo de vida mais curto desses animais em comparação aos humanos, propicia o estudo de tumores mamários, uma vez que as lesões aparecerem após alguns anos, diferente do câncer na mulher que é mais frequente após a quinta década de vida (UVA *et al.*, 2009; CASSALI *et al.*, 2011).

O carcinoma mamário murino 4T1 é uma linhagem isogênica transplantável para camundongos BALB/c e que quando inoculada na região da mama ou flanco origina metástases para linfonodo, pulmão, ossos e cérebro; mesmos órgãos alvos de metástases do câncer de mama humano de estadiamento avançado (IV) (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001). O desenvolvimento do tumor 4T1 acompanha mudanças sistêmicas e locais que resultam em acúmulo de células inflamatórias, predominantemente da linhagem mieloide, no tumor primário e nos órgãos sítios de metástases. É reconhecido que as células 4T1 expressam em nível de transcrito de mRNA e de proteína diversas quimiocinas, tais como CCL2, CCL5 e CXCL1 (DUPRÉ; REDELMAN; HUNTER, 2007). Conseqüentemente, o recrutamento das linhagens mieloides para o microambiente tumoral, sobretudo de TAMs, pode ser entendido como uma etapa importante para a progressão e disseminação desse tumor. De fato, vários trabalhos corroboram com essa hipótese (LU; KANG, 2009; QIAN *et al.*, 2011), inclusive em câncer de mama humano (SORIA *et al.*, 2008; RUFFELL *et al.*, 2012). A

expressão de CCL2 e CCL5 no câncer de mama humano é observada em carcinoma ductal *in situ* e carcinoma invasor, mas não no epitélio mamário normal (SORIA *et al.*, 2008). Adicionalmente, TAMs representam os leucócitos mais abundantes em tumores de mama (RUFFELL *et al.*, 2012), sendo eles responsáveis pela neovascularização, evento essencial para a progressão e invasão dos tumores sólidos (CHANMEE *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2006; SCHNEIDER; MILLER, 2005). Os macrófagos são células importantes para o desenvolvimento normal do tecido glandular mamário (COUSSENS; POLLARD, 2011), portanto é de se esperar que em doenças inflamatórias e neoplásicas da mama o papel dessas células aconteça de maneira central.

O presente trabalho demonstrou que os macrófagos infiltrados no tumor primário do carcinoma mamário 4T1 se correlacionam com a disseminação de metástases pulmonares nesse modelo. A remodelação tecidual observada com aumento dos mediadores inflamatórios e angiogênese tumoral, aumento do proteoglicano de matriz versican e em estágios tardios à deposição de colágeno, sugerem a participação ativa de TAMs orquestrando e/ou participando nas modificações encontradas no microambiente tumoral do tumor 4T1. A disseminação metastática para o pulmão corrobora esses achados e sugere a inflamação como um facilitador da invasão do tumor 4T1 para os sítios secundários. Os TAMs novamente mostraram-se componente abundante no parênquima pulmonar e nas vias aéreas, aumentando progressivamente acompanhando o número de nódulos metastáticos, os níveis de mediadores inflamatórios e as alterações encontradas nos parâmetros de função pulmonar. Nos carcinomas mamários espontâneos da cadela, TAMs foram encontrados em maior número nos carcinomas invasores quando comparados aos carcinomas *in situ*. Tumores de baixo grau e de estádios avançados apresentaram também maior infiltração dessas células no microambiente tumoral. Em relação à expressão de versican, as áreas invasoras de tumores classificados como grau 1 apresentaram maior expressão desse proteoglicano. Em conjunto, os dados encontrados nesses dois modelos experimentais reforçam a participação de TAMs e de versican na progressão tumoral do câncer de mama.

O proteoglicano de matriz versican foi avaliado em associação com os TAMs no intuito de compreendermos como as modificações de componentes da matriz extracelular e infiltração dessas células estariam associadas com o desenvolvimento metastático do tumor 4T1 e sua participação nos tumores espontâneos caninos. O versican é uma molécula expressa frequentemente em células tumorais e no estroma das neoplasias

(BOCKSTAL *et al.*, 2014; WIGHT; KANG; MERRILEES, 2014b), a interação de macrófagos com versican leva à ativação dessas células via TLR2, TLR4 e CD14. Macrófagos ativados por versican secretam altos níveis de TNF- α que agem como potentes indutores de metástases em modelo experimental de carcinoma de pulmão (KIM *et al.*, 2009). Os TAMs secretam MMPs que digerem os componentes da matriz extracelular facilitando assim a invasão das células neoplásicas (SZABO; SINGH, 2005). A degradação de versican presente na parede de vasos por essas enzimas resulta em aumento da angiogênese tumoral e conseqüentemente maior taxa de invasão (ASANO *et al.*, 2017). As células neoplásicas de câncer de mama também são capazes de induzir a ativação e diferenciação de TAMs pró-tumorais através da secreção de versican. Uma vez ativadas essas células, produzem altos níveis de MMPs (SZABO; SINGH, 2005). Dessa forma, a interação entre TAMs, versican e as próprias células neoplásicas resultam em diferentes eventos que culminam na invasão tumoral e metástases. Embora não tenhamos realizado a imunomarcagem dessas enzimas no microambiente do tumor 4T1, acreditamos que possa haver fortemente uma relação entre TAMs e a remodelação da matriz extracelular observada ao longo do desenvolvimento do tumor 4T1. Nossos dados da expressão de versican, deposição de colágeno e a presença das citocinas TGF- β 1 e TNF- α e quimioquina CCL2 em diferentes tempos reforçam essa hipótese. Nesse sentido, estudos futuros envolvendo o silenciamento de versican ou das enzimas MMP, bem como a eliminação de macrófagos podem comprovar tais hipóteses.

No segundo experimento tínhamos como objetivo avaliar o papel imunomodulador da talidomida, utilizando diferentes doses (50, 100 e 150 mg/kg), na polarização de TAMs. Os resultados obtidos demonstraram que a talidomida quando administrada em doses elevadas como monoterapia no período de 24 dias, principalmente na dose de 150 mg/kg, reduziu significativamente o crescimento tumoral, proliferação celular no tumor primário e metástases pulmonares e reduziu o número de nódulos metastáticos no pulmão de animais inoculados com o tumor 4T1. Esses eventos foram associados com um aumento significativo da inflamação tecidual em ambos os sítios avaliados. Todavia, em relação à população de TAMs, diferenças significativas foram encontradas no microambiente primário e metastático do carcinoma mamário murino 4T1 após o tratamento com talidomida. No tumor primário, níveis reduzidos de TAMs foram observados enquanto no pulmão o aumento dessas células deu-se de forma dose-

dependente. Ainda no pulmão, o aumento no número de TAMs foi acompanhado de aumento dos níveis de CCL2 e TNF- α . A avaliação da enzima iNOS foi realizada para a complementação desses resultados. Em camundongos, iNOS é reconhecido como um marcador de ativação de TAMs M1 (GOSWAMI *et al.*, 2016), mas sua expressão não está restrita somente a esse perfil celular, sendo também encontrada em vesículas citoplasmáticas de um grande número de células, tais como neutrófilos e células endoteliais (BOGDAN, 2015; PAUTZ *et al.*, 2010). Nossos resultados revelaram aumento significativo da expressão tecidual de iNOS2 no tumor primário e pulmão após o tratamento com talidomida, evidenciando assim que a expressão dessa enzima não está relacionada somente a infiltração de macrófagos. Dessa forma também corrobora com o status de maior inflamação observado no tumor primário e pulmão após o tratamento com a talidomida. A talidomida é um fármaco da classe de imunomoduladores que pode apresentar múltiplos efeitos no contexto de câncer e inflamação (VON MOOS *et al.*, 2003). Dados prévios publicados por nosso grupo utilizando o carcinoma mamário murino 4T1 e a administração de 150 mg/kg de talidomida, por 7 dias, demonstraram uma redução do crescimento tumoral associado a redução da inflamação e angiogênese tumoral (SOUZA *et al.*, 2012); esse mesmo protocolo experimental revelou também um aumento de leucócitos no sangue periférico dos animais tratados com talidomida (REIS *et al.*, 2014). Diferentemente dos dados apresentados no presente trabalho, o protocolo descrito por Souza e colaboradores (2012) revelou efeitos antitumorais associados a propriedades anti-inflamatórias. Podemos sugerir, portanto, que o período de tratamento pode revelar diferenças importantes no efeito imunomodulador desse fármaco ou as modificações relacionadas a diferentes estágios do desenvolvimento tumoral podem também contribuir para os efeitos imunomoduladores encontrados no presente trabalho. Nessa linha de raciocínio, ao comparar as curvas de crescimento de ambos os experimentos, podemos observar que o padrão de crescimento após o tratamento com talidomida na dose de 150 mg/kg até os 12 dias de inoculação é equivalente. Após esse período, observamos no presente trabalho que o tumor primário tem uma redução decrescente até o 16º dia de inoculação tumoral e, após esse período, o tumor retoma o crescimento, ainda um pouco mais lento quando comparado ao grupo controle.

As metástases do tumor 4T1 ocorrem a partir da segunda semana de inoculação, sendo encontrada primeiramente em linfonodos e em estágios mais tardios, como observado

no primeiro experimento no pulmão (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001; DUPRÉ; REDELMAN; HUNTER, 2007; TAO *et al.*, 2008). As modificações no número de macrófagos infiltrados no pulmão de ambos os experimentos revelam dados importantes acerca do efeito imunomodulador da talidomida. Ao considerarmos os níveis de CCL2, importante quimiotático no recrutamento de macrófagos, no dia 28 do primeiro experimento e no grupo veículo do experimento com talidomida (também com 28 dias de inoculação), os níveis de CCL2 encontram-se equivalentes no tumor primário. No entanto, o tratamento com a talidomida na dose de 150 mg/kg elevou esses valores quase 10 vezes no pulmão. Esse aumento dos níveis de CCL2 mostrou-se acompanhado de maior infiltração de macrófagos possivelmente do tipo M1, devido os níveis elevados de TNF- α , maior expressão tecidual de iNOS2 e redução da proliferação celular neoplásica. Esses dados, portanto, suportam a hipótese de um papel antagonista de CCL2 e TNF- α nos animais tratados com talidomida, agora relacionados, possivelmente, a um efeito antitumoral (CHU, 2013; WANG; LIN, 2008).

Por fim, os experimentos realizados sugerem um papel central dos macrófagos no câncer de mama e a talidomida como uma possível estratégia terapêutica na polarização de macrófagos antitumorais. Contudo, nós reconhecemos que a citometria de fluxo seria uma ferramenta valiosa para melhor caracterizar e compreender os efeitos desse fármaco em macrófagos, diante as dificuldades encontradas em nosso trabalho sugerimos a utilização dessa técnica em estudos futuros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAVENA, P. *et al.* Pathways connecting inflammation and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, v. 18, n. 1, p. 3–10, 2008a.

ALLAVENA, P. *et al.* The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunological Reviews*, v. 222, n. 1, p. 155–161, 2008b.

ARLAUCKAS, S. P. *et al.* In vivo imaging reveals a tumor-associated macrophage-mediated resistance pathway in anti-PD-1 therapy. *Science Translational Medicine*, v. 9, n. 389, p. eaal3604, 2017.

ARTACHO-CORDÓN, A. *et al.* Tumor microenvironment and breast cancer progression: a complex scenario. *Cancer biology & therapy*, v. 13, n. 1, p. 14-24, 2012.

ASANO, K. *et al.* Stromal versican regulates tumor growth by promoting angiogenesis. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

BAJGAIN, P. *et al.* CAR T cell therapy for breast cancer: Harnessing the tumor milieu to drive T cell activation. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, v. 6, n. 1, 2018.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet*, v. 357, n. 9255, p. 539–545, 2001.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 125, n. 23, p. 5591–5596, 2012.

BARTLETT, J. B.; DREDGE, K.; DALGLEISH, A. G. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 4, p. 314–322, 2004.

BELO, A V *et al.* Differential effects of thalidomide on angiogenesis and tumor growth in mice. *Inflammation*, v. 25, n. 2, p. 91–6, 2001.

BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: Functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in Immunopathology*, n. 35, v.5, p.585-600, 2013.

BOCKSTAL, M. VAN *et al.* Differential regulation of extracellular matrix protein expression in carcinoma-associated fibroblasts by TGF- β 1 regulates cancer cell spreading but not adhesion. *Oncoscience*, v. 1, n. 10, p. 634–48, 2014.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends in Immunology*, v. 36, n. 3, p. 161–178, 2015.

BRAY, F. *et al.* Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, p. 394–424, 2018.

BROWN, J. R. *et al.* Multiplexed quantitative analysis of CD3, CD8, and CD20 predicts response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 20, n. 23, p. 5995–6005, 2014.

- CAMPELO, S. R. *et al.* Effects of immunomodulatory drugs on TNF- α and IL-12 production by purified epidermal langerhans cells and peritoneal macrophages. *BMC Research Notes*, v. 4, n. 1, p. 24, 2011.
- CAMPOS, C. B. *et al.* Absence of significant adverse events following thalidomide administration in bitches diagnosed with mammary gland carcinomas. *Veterinary Record*, v. 179, n. 20, p. 514, 2016.
- CAMPOS, C. B. *et al.* Thalidomide treatment in a canine mammary gland carcinosarcoma presenting pulmonary metastasis. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, v. 5, n. 1, p. 120–126, 2017.
- CANNARILE, M. A. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *Journal of ImmunoTherapy of Cancer*, v. 5, n. 53, p. 1–13, 2017.
- CARVAJAL-HAUSDORF, D. E. *et al.* Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. *Laboratory Investigation*, v. 95, n. 4, p. 385–396, 2014.
- CASSALI, G. D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 4, n. 2, p. 153–180, 2011.
- CHAMBERLAIN, P. P. *et al.* Structure of the human Cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 21, n. 8, p. 1–8, 2014.
- CHANMEE, T. *et al.* Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers*, v. 6, n. 3, p. 1670–1690, 2014.
- CHU, W.-M. Tumor necrosis factor. *Cancer Letters*, v. 328, n. 2, p. 222–225, 2013.
- CONTI, I.; ROLLINS, B. J. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, v. 14, n. 3, p. 149–154, 2004.
- COUSSENS, L. M.; POLLARD, J. W. Leukocytes in mammary development and cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 3, n. 3, p. 1–22, 2011.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 2002.
- D'AMATO, R. J. *et al.* Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, n. 9, p. 4082–4085, 1994.
- DAMASCENO, K. A. *et al.* Versican expression in myoepithelial cells from carcinomas in canine mixed mammary tumors. *Veterinary Journal*, v. 200, n. 1, p. 146–151, 2014.
- DARB-ESFAHANI, S. *et al.* Morphology and tumor-infiltrating lymphocytes in high-stage, high-grade serous ovarian carcinoma correlated with long-term survival. *Histopathology*, 2018.
- DAVIES, F. E. *et al.* Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural

- killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, v. 98, n. 1, p. 210–216, 2001.
- DUA, I.; TAN, A. R. Immunotherapy for triple-negative breast cancer: a focus on immune checkpoint inhibitors. *The American Journal of Hematology/Oncology*, v. 13, n. 5, p. 20–27, 2017.
- DUPRÉ, S. A.; REDELMAN, D.; HUNTER, K. W. The mouse mammary carcinoma 4T1: Characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 88, n. 5, p. 351–360, 2007.
- EBCTCG, *et al.* Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*, v. 378, n. 9793, p. 771–784, 2011.
- EIRO, N.; VIZOSO, F. J. Inflammation and cancer. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, v. 4, n. 3, p. 62–72, 2012.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, v. 19, p. 403–410, 1991.
- EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, v. 41, n. 1, p. 21–35, 2014.
- FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, v. 9, n. 6, p. 669–76, 2003.
- FERRARA, N.; ALITALO, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature Medicine*, v. 5, n. 12, p. 1359–64, 1999.
- FERREIRA, M. A N. D. *et al.* Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). *British Journal of Pharmacology*, v. 141, n. 7, p. 1185–92, 2004.
- FISHER, B. F. *et al.* Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total for the treatment of invasive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 16, p. 1233–1241, 2002.
- FU, Y. *et al.* Proteolytic cleavage of versican and involvement of ADAMTS-1 in VEGF-A/VPF-induced pathological angiogenesis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 59, n. 5, p. 463–473, 2011.
- FUJITA, J. *et al.* Thalidomide and its analogues inhibit lipopolysaccharide-mediated induction of cyclooxygenase-2. *Clinical Cancer Research*, v. 7, n. 11, p. 3349–3355, 2001.
- GOSWAMI, K. K. *et al.* Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. *Cellular Immunology*, v. 316, n. April, p. 1–10, 2016.
- GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and colorectal cancer: Colitis-associated neoplasia. *Seminars in Immunopathology*, v. 35, n. 2, p. 229–244, 2013.
- GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and

- cancer. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.
- GROSSO, J. F.; JURE-KUNKEL, M. N. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immunity*, v. 13, n. 5, 2013.
- GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer metastasis: Building a framework. *Cell*, v. 127, n. 4, p. 679–695, 2006.
- HAMILTON, J. A.; COOK, A. D.; TAK, P. P. Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 16, n. 1, p. 53–70, 2017.
- HASHIM, D. *et al.* The global decrease in cancer mortality: Trends and disparities. *Annals of Oncology*, v. 27, n. 5, p. 926–933, 2016.
- HAUSEN, H. ZUR. Infections causing human cancer. Chapter 3: Tumors linked to infections: Some general aspects. Weinheim: Wiley-VCH, p. 27–40, 2006a.
- HAUSEN, H. ZUR. Infections causing human cancer. Chapter 5: Papillomavirus infections: A major cause of human cancers. Weinheim: Wiley-VCH, p. 145–243, 2006b.
- HAUSEN, H. ZUR. Infections causing human cancer. Chapter 11: Parasites and human cancers. Weinheim: Wiley-VCH, p. 468–484, 2006c.
- HERNANDEZ, M. D. O. *et al.* Thalidomide modulates *Mycobacterium leprae*-induced NF- κ B pathway and lower cytokine response. *European Journal of Pharmacology*, v. 670, n. 1, p. 272–279, 2011.
- IARC Handbooks of Cancer Prevention: Breast Cancer Screening: v. 15. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2016.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA., 2018. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br>. Acesso em: 17 de julho de 2018.
- ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. 514, 2014.
- ITO, T. *et al.* Id of primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*, v. 327, n. 5971, p. 1345–1350, 2010.
- JEMAL, A. *et al.* Global Cancer Statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.
- ZHANG, J.; PATEL, L.; PIENTA, K. J. Targeting chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) as an example of translation of cancer molecular biology to the clinic. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, v. 95, p. 31–53, 2010.
- KAWAMATA, A. *et al.* Thalidomide suppresses melanoma growth by activating natural killer cells in mice. *Oncology Reports*, v. 16, n. 6, p. 1231–1236, 2006.
- KEIFER, J. A. *et al.* Inhibition of NF- κ B activity by thalidomide through suppression of I κ B kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 25, p. 22382–22387, 2001.

- KHALIL, D. N. *et al.* The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, v. 13, p. 273–290, 2016.
- KIM, S. *et al.* Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*, v. 457, n. 7225, p. 102–106, 2009.
- KIM, T.; GIULIANO, A. E.; LYMAN, G. H. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma. *Cancer*, v. 106, n. 1, p. 4–16, 2006.
- KISCHEL, P. *et al.* Versican overexpression in human breast cancer lesions: Known and new isoforms for stromal tumor targeting. *International Journal of Cancer*, v. 126, n. 3, p. 640–650, 2010.
- KOCH, R. *Infections Causing Human Cancer. Chapter 2: The quest for causality.* Weinheim: Wiley-VCH, p. 17–26, 2006.
- KRONKE, J. *et al.* Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del (5q) MDS. *Nature*, v. 523, N. 7559, P. 183-188, 2015.
- KUMAR, V. *et al.* Cancer-associated fibroblasts neutralize the anti-tumor effect of CSF1 receptor blockade by inducing PMN-MDSC infiltration of tumors. *Cancer Cell*, v. 32, n. 5, p. 654- 668.e5, 2017.
- KUMAR, V.; CHHIBBER, S. Anti-inflammatory effect of thalidomide alone or in combination with augmentin in *Klebsiella pneumoniae B5055* induced acute lung infection in BALB/c mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 592, n. 1–3, p. 146–150, 2008.
- KUMAR, V.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Thalidomide treatment modulates macrophage pro-inflammatory function and cytokine levels in *Klebsiella pneumoniae B5055* induced pneumonia in BALB/c mice. *International Immunopharmacology*, v. 10, n. 7, p. 777–783, 2010.
- LAKHANI, S. R. *et al.* *World Health Organization Classification of Tumours of the Breast.* 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2012.
- LEE, H. S. *et al.* Thalidomide inhibits alternative activation of macrophages in vivo and in vitro a potential mechanism of anti-asthmatic effect of thalidomide. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, p. 1–15, 2015.
- LEE, J. S. *et al.* Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Medicine*, v. 97, n. 32, p. 1–8, 2018.
- LENZ, W.; KNAPP, K. Thalidomide embryopathy. *Archives of Environmental Health*, v. 5, n. 2, p. 14–19, 1962.
- LI, H.; FAN, X.; HOUGHTON, J. Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 101, n. 4, p. 805–815, 2007.
- LI, M. *et al.* A role for CCL2 in both tumor progression and immunosurveillance. *Oncoimmunology*, v. 2, n. February 2015, p. e25474, 2013.
- LIN, Y. *et al.* Selective ablation of tumor-associated macrophages suppresses metastasis

- and angiogenesis. *Cancer Science*, v. 104, n. 9, p. 1217–1225, 2013.
- LINDE, N. *et al.* Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 21, 2018.
- LOPEZ-GIRONA, A. *et al.* Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia*, v. 26, n. 11, p. 2326–35, 2012.
- LU, X.; KANG, Y. Chemokine (C-C Motif) ligand 2 engages CCR2+ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 42, p. 29087–29096, 2009.
- LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology*, v. 196, n. 4, p. 395–406, 2012.
- BOGLIOLO, Luigi; BRASILEIRO FILHO, Geraldo. *Patologia*. 8. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2012.
- LUO, J. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 210, n. 1, p. 157–172, 2013.
- LUO, Y. *et al.* Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, v. 116, n. 8, p. 2132–2141, 2006.
- MANTOVANI, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.
- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, v. 88, n. 4, p. 937–941, 2015.
- MAO, Y. *et al.* Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 32, n. 1–2, p. 303–315, 2013.
- MCBRIDE, W. G. the Teratogenic Action of Drugs. *The Medical journal of Australia*, v. 2, p. 689–692, 1963.
- MEI, J. *et al.* Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: A systemic review and meta-analysis. *Oncotarget*, v. 2, n. 23, 2016.
- MESTAS, J.; HUGHES, C. C. W. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *The Journal of Immunology*, v. 172, p. 2731–2738, 2018.
- MILLRINE, D. *et al.* Immunomodulatory drugs inhibit TLR4 induced type-1 interferon production independently of Cereblon via suppression of the TRIF/IRF3 pathway. *International Immunology*, n. 28, v. 6, 307-15, 2016a.
- MILLRINE, D. *et al.* Rabex-5 is a lenalidomide target molecule that negatively regulates TLR-induced type 1 IFN production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 38, p. 10625–10630, 2016b.
- MIN, Y. *et al.* Cereblon negatively regulates TLR4 signaling through the attenuation of

- ubiquitination of TRAF6. *Cell Death and Disease*, v. 7, n. 7, p. e2313, 2016.
- MITSIADES, N. *et al.* Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells : therapeutic implications. *Blood*, v. 99, n. 12, p. 4525–4531, 2002.
- MOJARAD, E. N.; ESAFAHANI, A. T.; ZALI, M. R. Intratumoral infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in colorectal cancer patients: Independent of oncogenetic features. *Journal of Cellular Physiology*, p. 1–10, 2018.
- MOREIRA, B. A. L. *et al.* Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α by enhancing mrna degradation. *Journal of Experimental Medicine*, v. 177, n. June, p. 6–11, 1993.
- MULDER, W. J. M. Therapeutic targeting of trained immunity. *Nature Reviews Drug Discovery*, n. 18, v. 7, p. 553–566, 2019.
- MURRAY, P. J. *et al.* Perspective macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.
- NABA, A. *et al.* Extracellular matrix signatures of human mammary carcinoma identify novel metastasis promoters. *eLife*, v. 2014, n. 3, p. 1–23, 2014.
- NAIR, S.; DHODAPKAR, M. V. Natural killer T cells in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. 1178, 2017.
- NATRAJAN, R. *et al.* Microenvironmental heterogeneity parallels breast cancer progression: a histology-genomic integration analysis. *PLoS Medicine*, v. 13, n. 2, p. 1–19, 2016.
- NAU, K. C.; LEWIS, W. D. Multiple myeloma: Diagnosis and treatment. *American Family Physician*, v. 78, n. 7, 2008.
- PALUCKA, A. K.; COUSSENS, L. M. The basis of oncoimmunology. *Cell*, v. 164, n. 6, p. 1233–1247, 2016.
- PARKIN, D. M. *et al.* Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 55, p. 74–108, 2005.
- PARKIN, D. M.; STJERNSWARD, J.; MUIR, C. S. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 62, n. 2, p. 163–182, 1984.
- PAUTZ, A. *et al.* Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, v. 23, n. 2, p. 75–93, 2010.
- PEREZ-GRACIA, J. L. *et al.* Strategies to design clinical studies to identify predictive biomarkers in cancer research. *Cancer Treatment Reviews*, v. 53, p. 79–97, 2017.
- PRICEMAN, S. J. *et al.* *Cancer Immunotherapy*. Chapter 26. JAK/STAT signaling in myeloid cells: targets for cancer immunotherapy, 2th Ed., 2013.
- PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Current Protocols in Immunology*, Chapter 20, p. Unit 20.2, 2001.

QIAN, B.-Z. *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, v. 475, n. 7355, p. 222–5, 2011.

QUAIL, D.; JOYCE, J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013.

REHMAN, J. A. *et al.* Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer. *Modern Pathology*, v. 30, n. 3, p. 340–349, 2017.

REIS, D. C. *et al.* Thalidomide promotes leukocytosis in mice inoculated with 4T1 mammary carcinoma. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 50, n. 1, p. 64–66, 2014.

RUFFELL, B. *et al.* Leukocyte composition of human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 8, p. 2796–801, 2012.

SABADO, R. L.; BALAN, S.; BHARDWAJ, N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Research*, v. 27, n. 1, p. 74–95, 2017.

SCHALPER, K. A. *et al.* Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 107, n. 3, p. 1–9, 2015.

SCHALPER, K. A. *et al.* Differential expression and significance of PD-L1, IDO-1, and B7-H4 in human lung cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 23, n. 2, p. 370–378, 2017.

SCHNEIDER, B. P.; MILLER, K. D. Angiogenesis of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 8, p. 1782–1790, 2005.

SHAY, T. *et al.* Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 8, p. 2946–2951, 2013.

SHIELS, M. S. *et al.* Circulating inflammation markers and prospective risk for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 105, n. 24, p. 1871–1880, 2013.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 3, p. 787–795, 1 mar. 2012.

SORIA, G. *et al.* Concomitant expression of the chemokines RANTES and MCP-1 in human breast cancer: A basis for tumor-promoting interactions. *Cytokine*, v. 44, n. 1, p. 191–200, 2008.

SORIA, G.; BEN-BARUCH, A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Letters*, v. 267, n. 2, p. 271–285, 2008.

SOUZA, C. M. *et al.* Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 66, n. 7, p. 491–498, 2012.

SOUZA, C. M. *et al.* Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model. *Biomedicine &*

Pharmacotherapy, v. 68, n. 1, p. 51–57, 2014.

SPILLER, K. L. *et al.* Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization. *Experimental Cell Research*, v. 347, n. 1, p. 1–13, 2016.

STEWART B. W. AND KLEIHUES P. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report. IARC Press., 2003.

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods Akulapalli. *Journal of Cancer Science and Therapy*, v. 1, n. 2, p. 1–4, 2009.

SUGIMOTO, Y. *et al.* Differential cell division history between neutrophils and macrophages in their development from granulocyte-macrophage progenitors. *British Journal of Haematology*, v. 135, n. 5, p. 725–731, 2006.

SZABO, K. A; SINGH, G. Modulation of monocyte matrix metalloproteinase-2 by breast adenocarcinoma cells. *Breast Cancer Research*, v. 7, n. 5, p. R661–R668, 2005.

TANG, X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Letters*, v. 332, n. 1, p. 3–10, 2013.

TAO, K. *et al.* Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*, v. 8, p. 228, 2008.

TAO, L.; REESE, T. A. Making mouse models that reflect human immune responses. *Trends in Immunology*, v. 38, n. 3, p. 181–193, 2017.

TERABE, M.; BERZOFSKY, J. A. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*, v. 16, n. 2, p. 157–162, 2004.

TERABE, M.; BERZOFSKY, J. A. NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends in Immunology*, v. 28, n. 11, p. 491–496, 2007.

TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, v. 347, n. 6217, p. 78–81, 2015.

UVA, P. *et al.* Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*, v. 10, p. 135, 2009.

VERHEUL, H. M. *et al.* Combination oral antiangiogenic therapy with thalidomide and sulindac inhibits tumour growth in rabbits. *British Journal of Cancer*, v. 79, n. 1, p. 114–8, 1999.

VESELY, M. D. *et al.* Natural innate and adaptive. *Annual Review of Immunology*, v. 29, p. 235–271, 2011.

VON DINCKLAGE, J. J.; BALL, D.; SILVESTRI, G. A. A review of clinical practice guidelines for lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, v. 5, n. SUPPL.5, p. S607–S622 2013.

VON MOOS, R. *et al.* Thalidomide: From tragedy to promise. *Swiss Medical Weekly*, v. 133, n. 5–6, p. 77–87, 2003.

- VONDERHEIDE, R. H.; DOMCHEK, S. M.; CLARK, A. S. Immunotherapy for breast cancer : what are we missing?. *Clinical Cancer Research*, v. 23, n. 11, p. 2640–2646, 2017.
- WANG, X.; LIN, Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sinica*, v. 29, n. 11, p. 1275–1288, 2008.
- WEI, W. Z.; MORRIS, G. P.; KONG, Y. C. Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 53, n. 2, p. 73– 8. Epub 2003 Nov 11., 2004.
- WEST, H. J. Highlights of recent studies of metastatic non-small cell lung cancer. *JAMA Oncology*, v. 98104, p. 9–10, 2016.
- WIGHT, T. N.; KANG, I.; MERRILEES, M. J. Versican and the control of inflammation. *Matrix Biology*, v. 35, p. 152–161, 2014a.
- YANO, S. *et al.* Current status and perspective of angiogenesis and antivasular therapeutic strategy: Non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, v. 11, n. 2, p. 73–81, 2006.
- YEO, B.; TURNER, N. C.; JONES, A. An update on the medical management of breast cancer Early breast cancer. *British Medical Journal*, v. 348, p. 1–7, 2014.
- YEUNG, T. L. *et al.* TGF- β modulates ovarian cancer invasion by upregulating CAF-derived versican in the tumor microenvironment. *Cancer Research*, v. 73, n. 16, p. 5016–5028, 2013.
- ZAYNAGETDINOV, R. *et al.* Interleukin-5 facilitates lung metastasis by modulating the immune microenvironment. *Cancer Research*, v. 75, n. 8, p. 1624–1634, 2015.
- ZHANG, B. *et al.* M2-Polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Clinics*, v. 66, n. 11, p. 1879–1886, 2011.
- ZHAO, X. *et al.* Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget*, v. 8, n. 18, p. 30576–30586, 2017.
- ZHU, Y. *et al.* CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Research*, v. 74, n. 18, p. 5057–5069, 2014.
- ZHU, Y. X. *et al.* Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood*, v. 118, n. 18, p. 4771–4779, 2011.

7. APÊNDICES

APÊNDICE A: Projeto Doutorado Sanduíche:

Análise da via de CSF1R em câncer de pulmão

7.1. INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão constitui a primeira causa de mortalidade e morbidade por câncer em todo o mundo (JEMAL *et al.*, 2011; HASHIM *et al.*, 2016; IARC, 2016). Portanto, o tratamento do câncer de pulmão permanece ainda um desafio, principalmente na doença de estágio avançado (VON DINCKLAGE; BALL; SILVESTRI, 2013). Em estágios precoces o tratamento cirúrgico tem sido utilizado como estratégia terapêutica eficaz, entretanto, para estágios avançados, a quimioterapia e/ou radioterapia é empregada como tratamento de escolha (VON DINCKLAGE; BALL; SILVESTRI, 2013; WEST, 2016). Recentemente, a imunoterapia tem surgido como uma estratégia terapêutica promissora (GROSSO; JURE-KUNKEL, 2013; PRICEMAN *et al.*, 2013). Nesse sentido, estudos direcionados a componentes do microambiente tumoral tem contribuído com o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento do câncer de pulmão (LI; FAN; HOUGHTON, 2007; PRICEMAN *et al.*, 2013).

Dentre os componentes do microambiente tumoral, os macrófagos associados a tumores (TAMs) têm sido relacionados para ter um papel importante na progressão, invasão e metastatização em diferentes tipos de câncer (ALLAVENA *et al.*, 2008b; JIANZHANG; PATEL; PIENTA, 2010; QIAN *et al.*, 2011; BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013, 2014; MAO *et al.*, 2013; ITALIANI; BORASCHI, 2014; GOSWAMI, 2016; MEI *et al.*, 2016), bem como são mostrados para estarem à resistência ao tratamento quimioterápico em diversas neoplasias (MANTOVANI; ALLAVENA, 2015). No câncer de pulmão, o papel de TAMs ainda é controverso, contudo, a localização e o status de polarização dessas células parecem ser fator importante associado à evolução clínica dessa doença (MEI *et al.*, 2016).

O receptor para fator de crescimento estimulador de colônia 1 (CSF1R) tem papel importante na diferenciação e sobrevivência de células fagocíticas mononucleares, em

especial os macrófagos (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014; KUMAR *et al.*, 2017). CSF1R pertence à família de receptores tirosina cinase do tipo III que se liga ao fator estimulador de colônia 1 (CSF1) e a interleucina 34 (IL-34), resultando na homodimerização do receptor e subsequente ativação da cascata de sinalização (LUO *et al.*, 2013; HAMILTON; COOK; TAK, 2017). Como a presença de células CSF1R+ está associada com pior prognóstico em vários tipos de câncer (CANNARILE *et al.*, 2017), a terapia anti-CSF1R em TAMs representa uma estratégia atrativa para eliminar ou polarizar essas células (ZHU *et al.*, 2014) em câncer de pulmão.

Biomarcadores têm sido historicamente conhecidos como analitos medidos no sangue e soro para determinar eventos sistêmicos, entretanto a identificação de biomoléculas nos tecidos pode ter mais valor do que aquelas circulantes, pois os biomarcadores teciduais são acompanhados de informações espaciais, bem como de estágios funcionais relacionados a uma determinada localização. Nesse sentido, a possibilidade de se avaliar a presença de várias células em diferentes estágios funcionais no microambiente tumoral representa uma estratégia importante em estudos envolvendo novas terapias antineoplásicas (CARVAJAL-HAUSDORF *et al.*, 2014). Portanto o objetivo desse trabalho foi avaliar a via de CSF1R no câncer de pulmão através da técnica de *quantitative immunofluorescence (QIF)* (PEREZ-GRACIA *et al.*, 2017; REHMAN *et al.*, 2017; SCHALPER *et al.*, 2015).

7.2. METODOLOGIA

Pacientes, grupos e *Tissue Microarrays*

Fragmentos de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, oriundos de coleções de carcinomas de pulmão de todos os tipos histológicos representados por *Tissue Microarrays* (TMA) do Departamento de Patologia da Universidade de Yale foram incluídos nesse estudo. As informações clínico-patológicas dos pacientes foram coletadas a partir de registros clínicos e relatórios de patologia. Todos os tecidos foram utilizados a partir do termo de consentimento de pesquisa pelo paciente e aprovação pelo *Yale Human Investigation Committee*.

Multiplexed quantitative immunofluorescence (QIF)

Os cortes de TMA foram desparafinizados e submetidos à recuperação antigênica utilizando tampão de EDTA pH = 8,0 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) em calor úmido

pressurizado (PT module, Lab Vision) durante 20 minutos a 97 °C (BROWN *et al.*, 2014; SCHALPER *et al.*, 2015). As lâminas foram então incubadas com duplo bloqueio de peroxidase endógena (Dako S2003#, Carpinteria, CA) durante 10 minutos à temperatura ambiente e subsequentemente foram incubadas com uma solução contendo 0,3% de albumina de soro de bovino em solução Tween a 0,05% durante 30 minutos. A coloração para pancitoqueratina, CSF1R, CSF1 e IL-34 foi realizada utilizando um protocolo sequencial de imunofluorescência multiplex com anticorpos primários específicos do isotipo para detectar células tumorais epiteliais, CSF1R e seus ligantes. Os núcleos foram marcados usando 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI). Anticorpos secundários e reagentes fluorescentes foram utilizados conforme a especificidade de cada anticorpo primário e conjugado com fluorocromos (Alexa 546, FITC, PE, Cy5), que quando excitados emitiram comprimentos de ondas diferentes para obtenção das múltiplas marcações. Tecidos inteiros frescos de amígdalas humanas morfológicamente normais foram incluídos em cada bateria de marcação como controle positivo e para avaliar a reprodutibilidade entre experimentos.

Análise da fluorescência

A quantificação do sinal fluorescente foi realizada usando um método que permite a medição objetiva e sensível de alvos dentro de compartimentos de tecido definidos pelo usuário (AQUA, Genoptix Inc, Carlsbad, CA) (BROWN *et al.*, 2014; SCHALPER *et al.*, 2015, 2017). Resumidamente, a pontuação de QIF para cada canal de fluorescência em áreas tumorais e/ou estroma é calculada dividindo-se a intensidade de pixel de cada marcador pela área do compartimento desejado definido pela positividade para citoqueratina (por exemplo, o compartimento tumoral), falta de positividade a citoqueratina (por exemplo, o compartimento estromal), ou as células DAPI-positivas (por exemplo, tecido tumoral total, incluindo o estroma). Pontuações serão normalizadas para o tempo de exposição e a profundidade de bits em que as imagens forem capturadas, permitindo pontuações coletadas em diferentes tempos de exposição a serem comparadas. As lâminas coradas foram visualmente examinadas e casos com artefatos de coloração foram excluídos.

Ensaio de inibição de CSF1R

Para a validação dos anticorpos CSF1R, CSF1 e IL-34 as linhagens celulares Bewo (ATCC), HHstec (Science Cell) e NTERA-2 (ATCC) foram cultivadas em meios de cultura específico como indicado por cada fornecedor, F-12K, HHstec médium e DMEM, respectivamente, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. $2,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas nos seus respectivos meios de cultura em placas de 6 poços e após 24 horas os meios foram trocados para o meio de transfeção (Opti-MEM® Medium) (Anexo 4). Após três horas em meio Opti-MEM® as células foram transfectadas com siRNA (Silencer® Pre-Designed (Non-Invetoried) siRNA, Lyfe Techonologies) em combinação com Lipofectamine®RNAiMAX. Após 24 horas o meio de transfecção contendo siRNA-Lipofectamine foi aspirado e adicionado meio de cultura normal e as células foram deixadas por mais 24 h em estufa a 37% a 5% CO₂. Em seguida as células foram lavadas e raspadas mecanicamente, o extrato obtido foi quantificado pelo método de Bradford e submetido à eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad, USA).

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizada a pontuação máxima de cada marcador obtido de todas as marcações disponíveis de cada caso. Os sinais de *QIF* entre os compartimentos analisados utilizando as funções de regressão e correlação linear e serão expressas como coeficientes de regressão/correlações. As características dos pacientes serão comparadas pelo teste t de *Student* para variáveis contínuas e teste de *qui-quadrado* para variáveis categóricas. Funções de sobrevida global serão comparadas usando a estimativa de Kaplan-Meier, e a significância estatística será determinada pelo teste de *log-rank*. As análises uni e multivariadas serão realizadas pelo método de regressão de COX para idade, tamanho do tumor, tabagismo, estadiamento clínico e subtipo histológico. Para ajustar as correlações entre os marcadores, três modelos multivariados independentes serão gerados. Pressupostos da proporcionalidade pelos modelos de Cox serão confirmados através da geração de curvas de estimativa de *Kaplan-Meier* para variáveis dicotomizadas e observando há intersecção entre as curvas. Valores de *P* menores que 0,05 serão considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas serão

realizadas utilizando Software Pro JMP (versão 9.0.0 de 2010, SAS Institute Inc, Cary, NC) e GraphPad Prism v6.0 para Windows (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA).

7.3. Resultados Parciais e Discussão

Titulação e validação do protocolo de *QIF singleplex* para o anticorpo CSF1R.

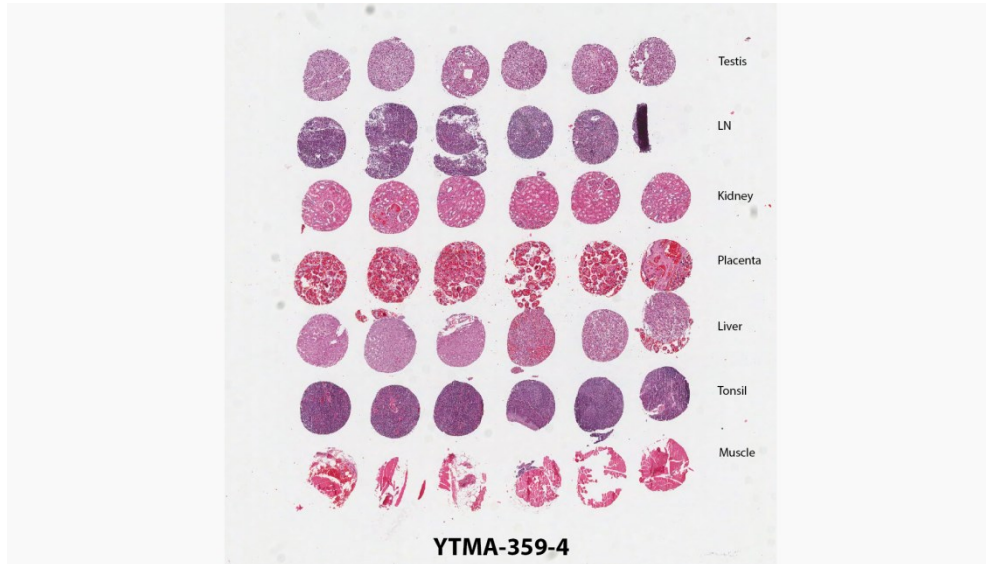
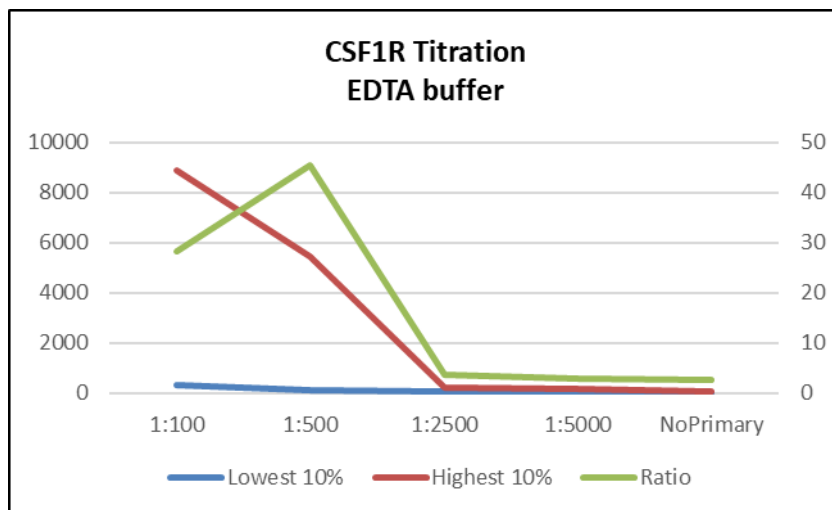


Figura 1: Mapa do TMA controle utilizado para as análises de *QIF*.

- ✓ **CSF1R (Abnova, clone SP211) - YTMA-359**
Singleplex: CSF1R e citoqueratina (CK)
Buffer: EDTA
Canal para CSF1R (Cy5)
Amostras normalizadas pela expressão de DAPI no núcleo.

Titulação: As lâminas foram escaneadas em microscópio de fluorescência através do *software* AquaAquisition e analisadas no software AquaAnalyses. O resultado encontrado representa um score quantitativo para cada *spot* de *TMA*. Em seguida para a representação gráfica da titulação foram definidos um *cut off* dos 10% scores baixos e 10% de escores altos encontrados. É possível observar que os melhores *dynamic range* são obtidos nas diluições de 1/100 e 1/500. A análise posterior das imagens demonstrou que a diluição mais concentrada (1/100) apresenta mais *background* e marcação inespecífica. Portanto a diluição escolhida foi de 1/500.



Distribuição das diluições que apresentaram o melhor *dynamic range*.

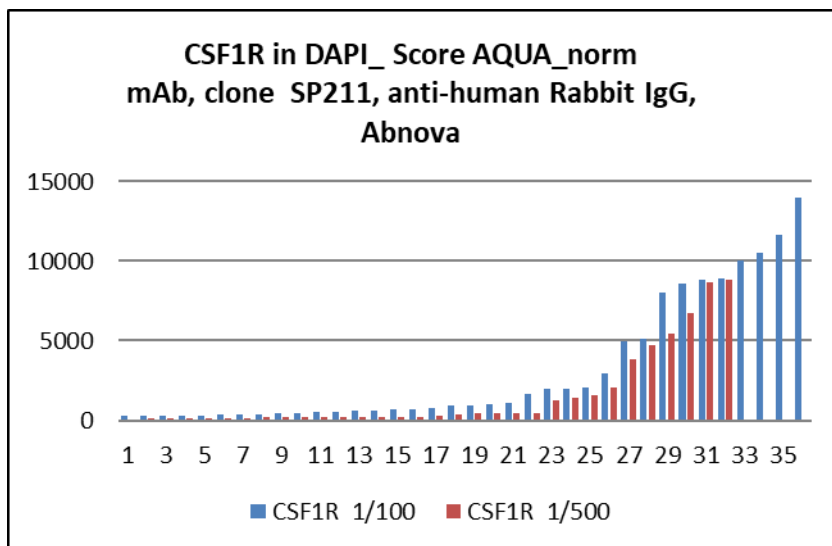
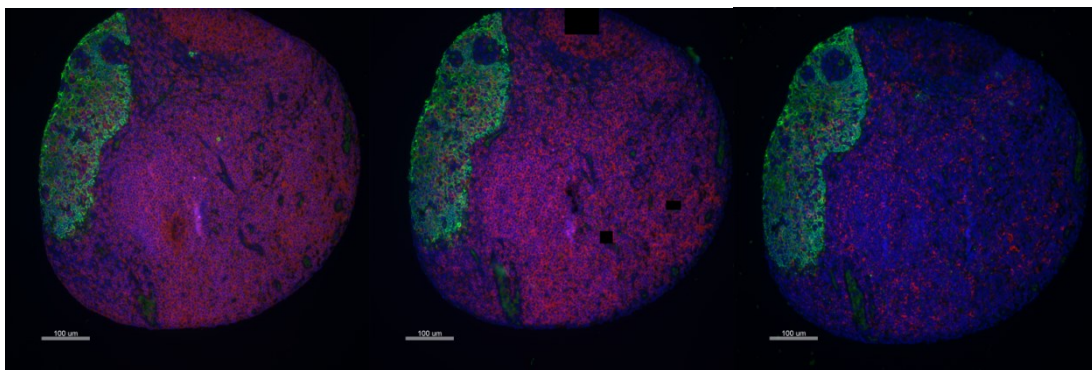


Figura 2: Titulação do anticorpo anti-CSF1R (clone SP211, Abnova).

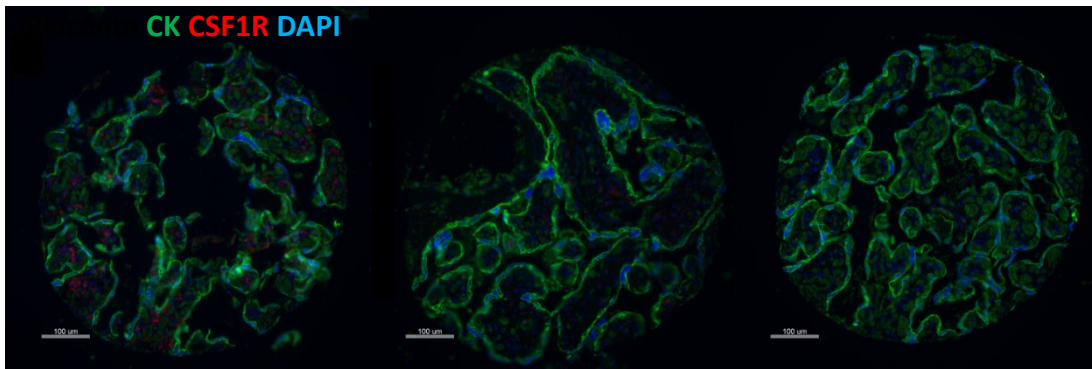
Tonsila CK CSF1R DAPI



1/100
SPOT 36: SCORE: 13960,04

1/500
SPOT 36: SCORE: 3857,13

1/2500
SPOT 36: SCORE: 990,0109

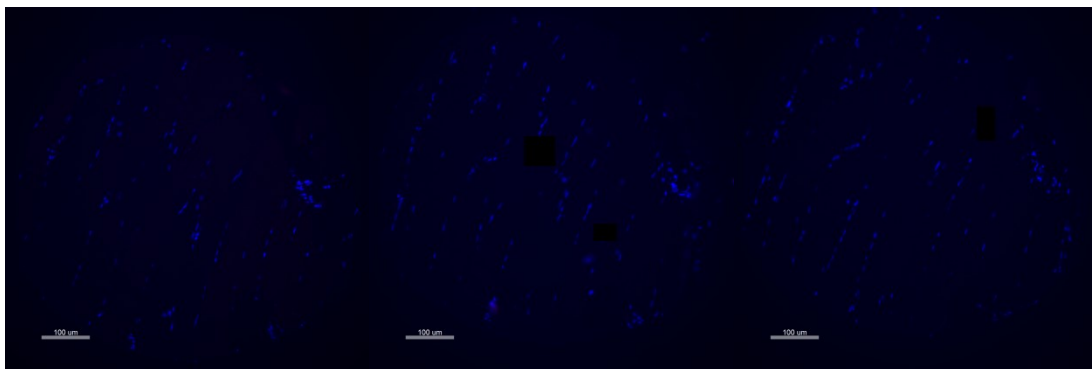


1/100
SPOT 20: SCORE: 1029,056

1/500
SPOT 24: SCORE: 216,1846

1/2500
SPOT 20: SCORE: 108,8498

Músculo CK CSF1R DAPI



1/100
SPOT 38: SCORE: 356.6316

1/500
SPOT 38: SCORE: 446.7324

1/2500
SPOT 38: SCORE: 67.08443

Figura 3: *Quantitative Immunofluorescence analyses* para CSF1R. Imagens representativas de *spots* avaliados. Os tecidos tonsila e placenta apresentam maiores expressão de CSF1R, enquanto músculo não apresenta expressão para esse marcador.

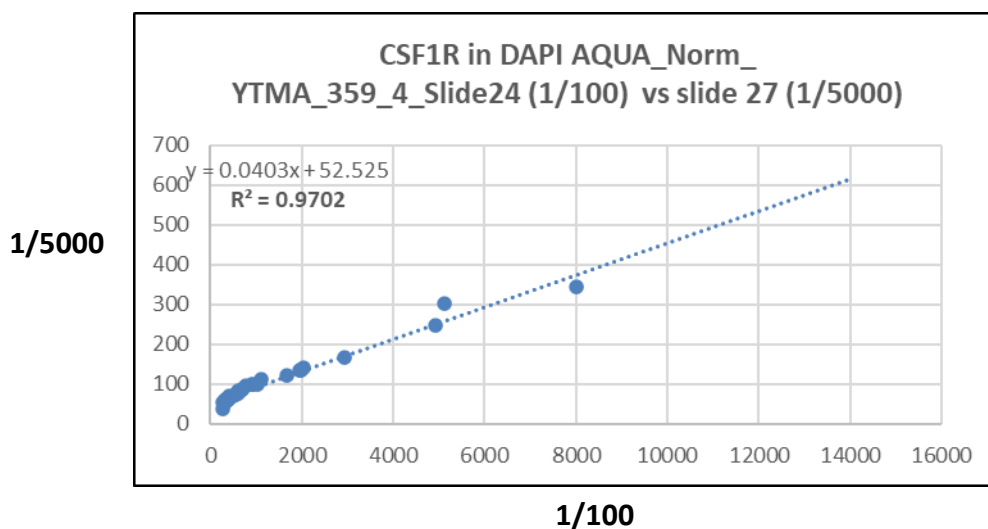
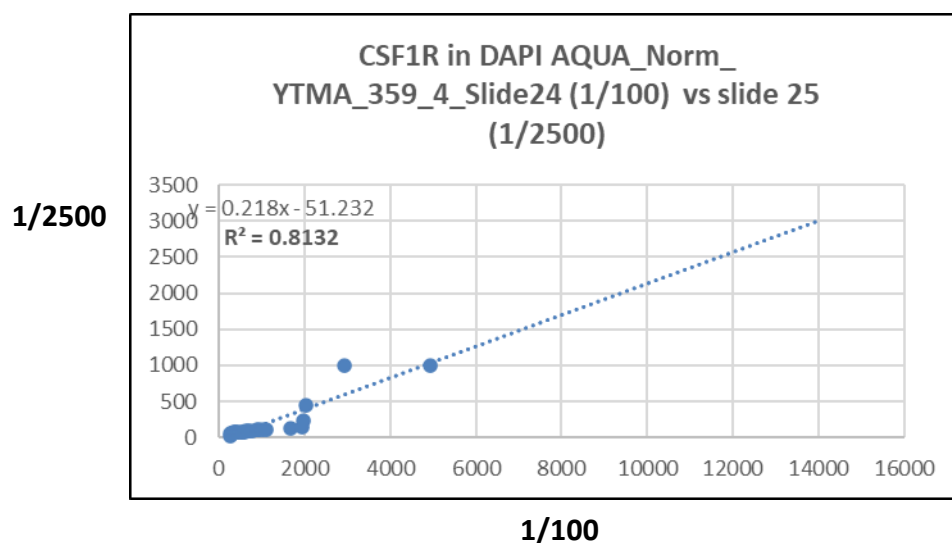
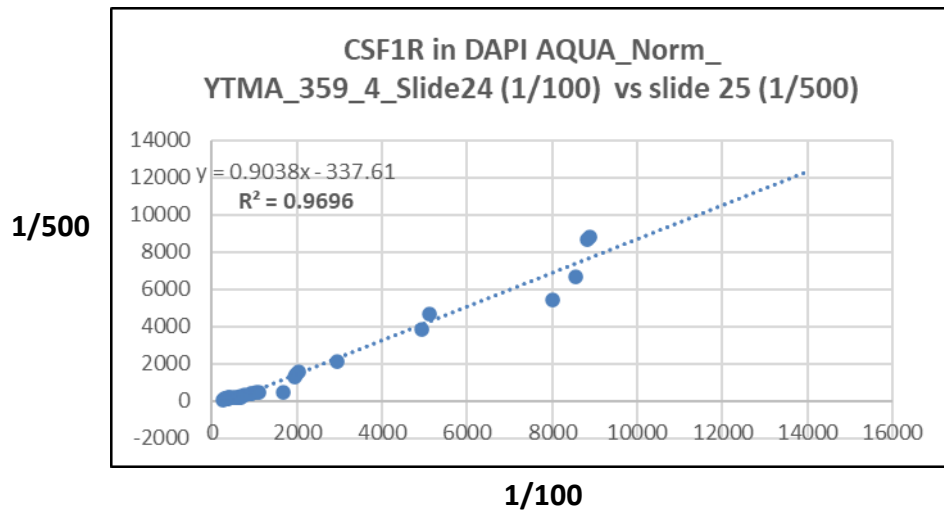


Figura 4: Análise de regressão linear. Coeficientes próximos a 1 representam excelente reprodutibilidade, melhor performance do anticorpo entre as diluições avaliadas e menor variação da expressão do marcador no tecido que está sendo avaliado.

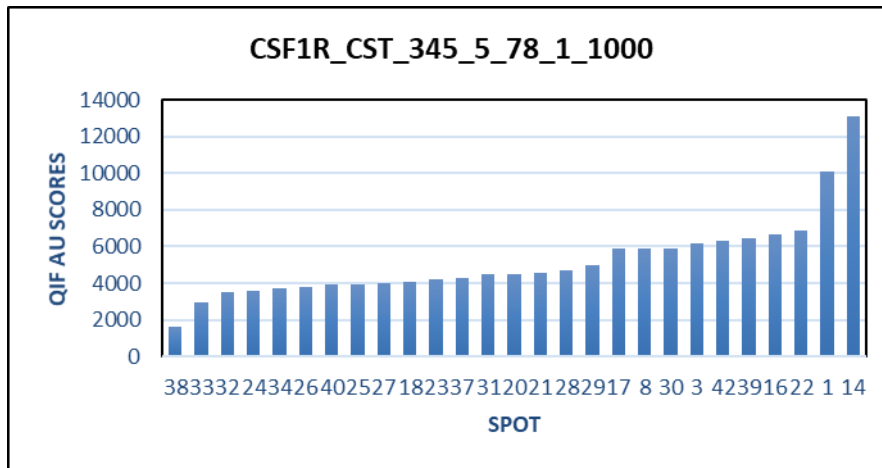
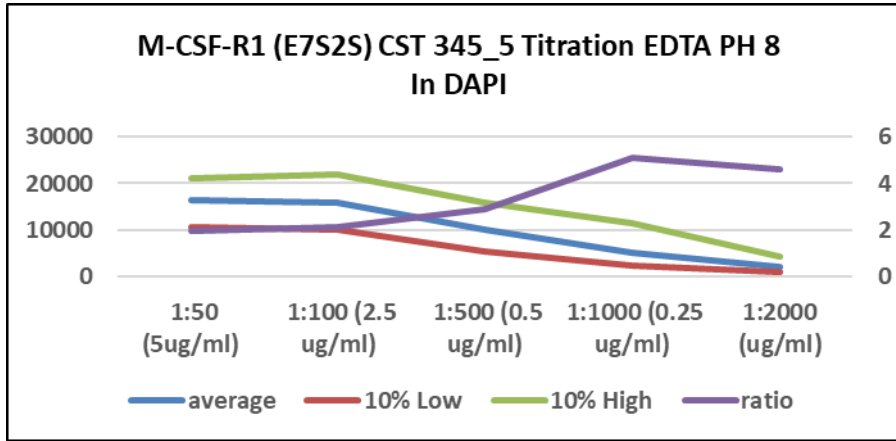
✓ **CSF1R (Cell Signaling Technology, clone E7S2S) Tonsil array 345_5**

Singleplex: CSF1R e citoqueratina (CK)

Buffer: EDTA pH 8,0 Recuperação em calor úmido pressurizado

Canal para CSF1R (Cy5)

Amostras normalizadas pela expressão de DAPI no núcleo.



U937 CONTROL

U937 + IL-10 10ng/mL

U937 + IL-10 25ng/mL

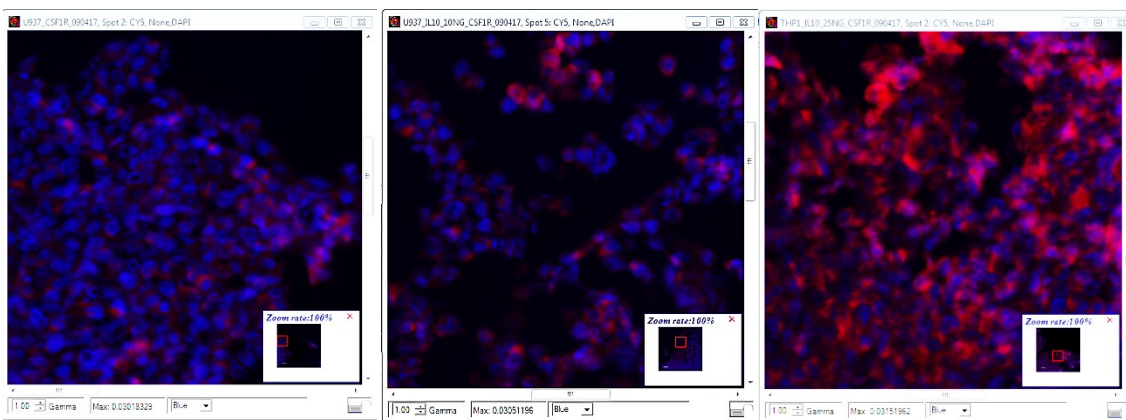


Figura 5: Titulação de CSF1R. A linhagem celular U937 foi estimulada com IL-10 a 10ng/ml ou 25ng/ml para aumentar a expressão de CSF1R. A expressão de CSF1R foi detectada por QIF.

✓ **Validação e otimização de protocolo para CSF1R.**

- Foram titulados três anticorpos para a proteína CSF1R, os dois primeiros apresentados anteriormente: CSF1R (Rabbit, Abnova, clone SP211) e M-CSFR (Rabbit, Cell Signaling Technology, clone E7S2S) e um terceiro também da empresa Cell Signaling Technology com o clone D309X, Rabbit anti-CSF1R. Os anticorpos da CST não recebiam indicação para uso em material parafinado, enquanto o anticorpo de clone SP211 da empresa Abnova era indicado. O anticorpo de clone D309X não apresentou qualquer marcação em nenhuma das diluições de 1/100, 1500, 1/1000, 1:2500 e 1:5000, portanto, não foi incluído para as demais análises e seus resultados não foram apresentados.

- Analisando os desempenhos dos anticorpos de clone SP211 e o E7S2S, podemos observar que o primeiro anticorpo na sua diluição ótima de 1/500 obteve score máximo na faixa de 9.000 unidades arbitrárias enquanto o anticorpo E7S2S na diluição ótima de 1/1000 foi encontrado score máximo na faixa de 14.000. Ambos os anticorpos apresentaram marcação nos órgãos que expressam CSF1R, tais como placenta, tonsila, testículo e fígado, enquanto músculo, controle negativo para CSF1R apresentou-se negativo. Como foi realizada a titulação dos anticorpos em diferentes TMA, não foi possível analisa-los comparativamente. Para isso foram feitas novas análises usando dois diferentes TMA, no intuito de avaliar também a reprodutibilidade do ensaio.

✓ **CSF1R (Cell Signaling Tecnology, clone E7S2S) e CSF1R (Abnova, clone SP211)**

TMA utilizados: 359-4 (mapa apresentado anteriormente) e 372 (controle para células mielóides).

Singleplex: CSF1R (CST ou Abnova) e citoqueratina (CK)

Buffer: EDTA pH 8,0 Recuperação em calor úmido pressurizado.

Canal para CSF1R (Cy5)

Amostras normalizadas pela expressão de DAPI no núcleo.

Table 1: Mapa do TMA – 372, composto por tecidos e diferentes linhagens celulares.

Pulmão	Bexiga	Tonsila	Baço	Linfonodo	HL60	KG1			Músculo	Fígado	Placenta	KG1
Pulmão	Bexiga	Tonsila	Baço	Linfonodo	HL60	KG1			Músculo	Fígado	Placenta	Jurkat
Pulmão	Bexiga	Tonsila	Baço	Linfonodo	HL60	KG1			Músculo	Fígado	Placenta	Ramos
							HPB					
Pulmão	Bexiga	Tonsila	Baço	Linfonodo	RT4	KG1	ALL	U937	Músculo	Fígado	Placenta	THP-1
							HPB					
Pulmão	Bexiga	Tonsila	Baço	Linfonodo	RT4	KG1	ALL	U937	Músculo	Fígado	Placenta	U937
							HPB					
Pulmão	Bexiga	Tonsila	Baço	Linfonodo	RT4	KG1	ALL	U937	Músculo	Fígado	Placenta	HL60

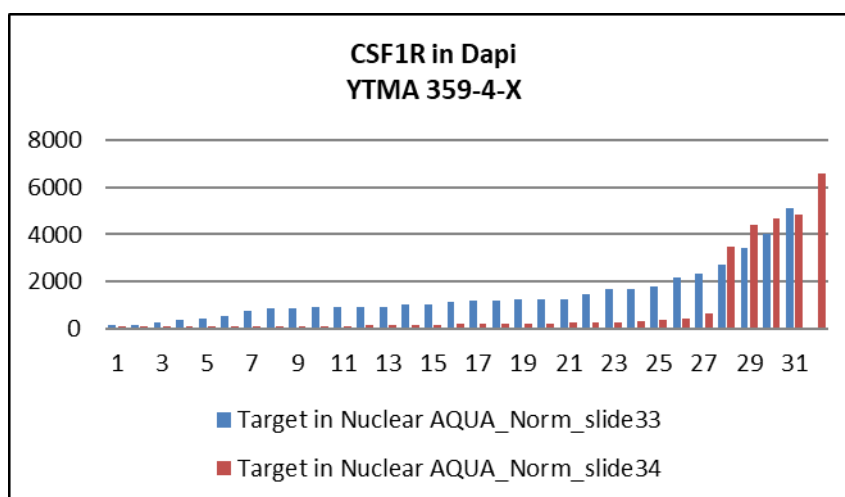
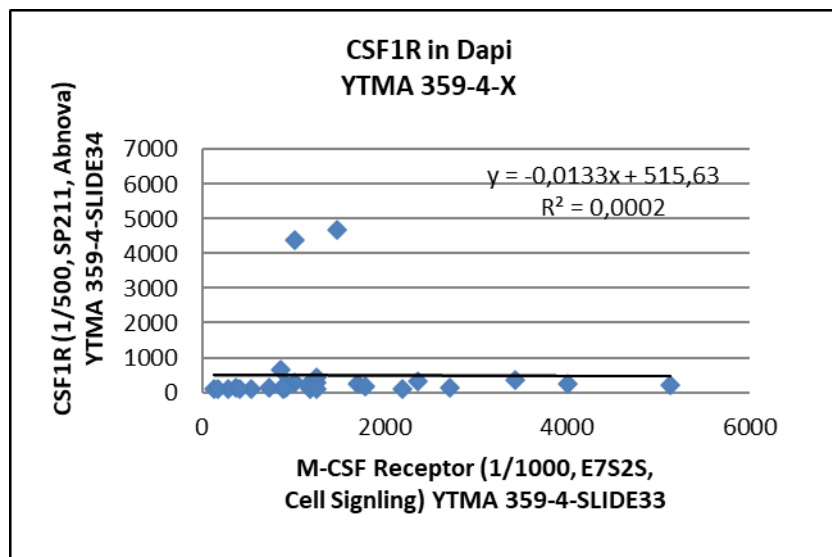


Figura 6: Análise de regressão linear e distribuição entre os anticorpos anti-CSF1R (1/500, clone SP211, Abnova) e anti-CSF1R/M-CSF (1/1000, E7S2S, Cell Signaling Technology).

O resultado obtido na análise de regressão ($R^2 = 0,0002$) dos *scores* de QIF utilizando slides consecutivos do TMA-359 demonstra que não houve nenhum grau de comparação entre os dois anticorpos utilizados para a proteína CSF1R. Era esperado que os diferentes anticorpos pudessem apresentar padrões razoavelmente variados de expressão para a proteína alvo, uma vez que é sabido que a afinidade dos anticorpos pode variar a depender da sequência de aminoácidos dos peptídeos utilizados para a produção de cada anticorpo, o que pode resultar em uma maior ou menor avidéz de ligação entre a proteína alvo e seu anticorpo, também, as diluições ótimas para cada anticorpo diferiram numa razão de 1:2. No entanto, o coeficiente de regressão encontrado levantou a possibilidade de um desses anticorpos estar apresentando marcação inespecífica, lote contaminado ou erro na fabricação do anticorpo.

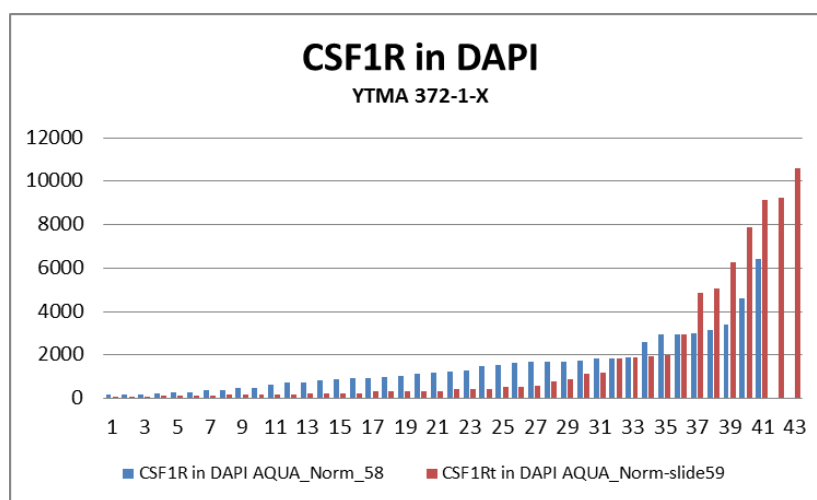
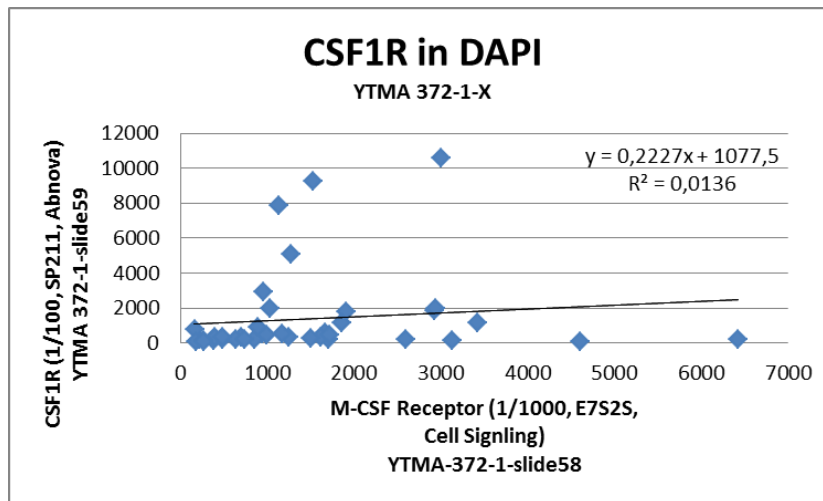


Figura 7: Análise de regressão linear e distribuição entre os anticorpos anti-CSF1R (1/100, clone SP211, Abnova) e anti-CSF1R/M-CSF (1/1000, E7S2S, Cell Signaling Technology).

Nessa segunda análise, realizada na mesma bateria do que a anterior e utilizando o TMA-372, composto por diferentes tecidos e linhagens celulares, podemos observar também através do coeficiente de regressão ($R^2 = 0,0136$) que não houve nenhum grau de comparação entre os anticorpos avaliados. Em conjunto, esses dados demonstram que: (1) os anticorpos avaliados não produziram nenhum grau de reprodutibilidade e comparabilidade na expressão de CSF1R, (2) as diferenças na expressão da proteína alvo que poderia ser encontrada entre um corte serial e o seu consecutivo de um dado TMA não refletem os resultados encontrados, uma vez que foram utilizados dois TMAs diferentes e os resultados obtidos refletem a mesma discrepância entre os anticorpos avaliados. (3) No TMA-372 a presença de linhagens celulares mielóide, como por exemplo, a THP-1 (células de leucemia monocítica aguda, portanto, positiva para CSF1R), revelou expressão positiva de CSF1R apenas para o anticorpo da CST (clone E7S2S), enquanto o anticorpo da Abnova (clone SP211) apresentou-se negativo. (4) Os *spots* referentes a tecidos continuam sendo positivos para ambos os anticorpos, mas apresentaram padrões diferentes de marcações para os mesmos.

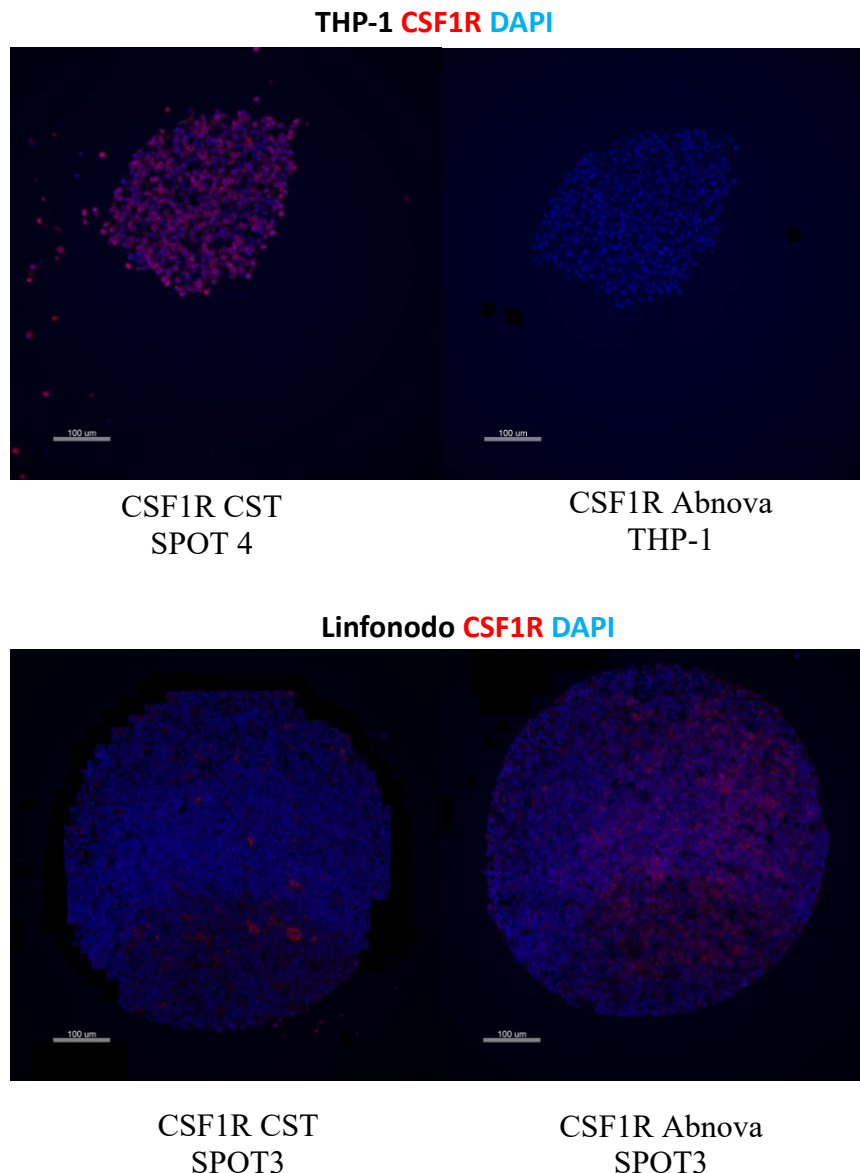


Figura 8: *Quantitative Immunofluorescence analyses* para CSF1R. Imagens representativas de *spots* avaliados. Imagens representativas evidenciando marcação positiva de CSF1R para THP-1 apenas para o anticorpo da CST. No linfonodo o anticorpo da empresa Abnova apresenta marcação difusa e um número elevado de células, enquanto o anticorpo da CST apresenta marcação mais discreta.

- ✓ **CSF1R (Cell Signaling Technology, clone D309X)**
- TMA utilizados: 359-4 (mapa apresentado anteriormente)
- Singleplex: CSF1R e citoqueratina (CK)
- Buffer: EDTA pH 8,0 Recuperação em calor úmido pressurizado.
- Canal para CSF1R (Cy5)
- Amostras normalizadas pela expressão de DAPI no núcleo.

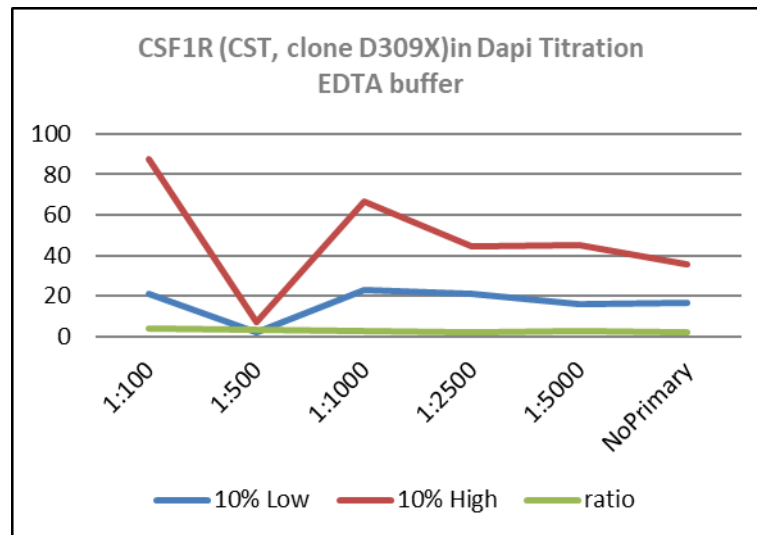


Figura 9: Titulação do anticorpo anti-CSF1R (clone D309X, Cell Signaling Technology).

Na tentativa de verificar as discrepâncias encontradas na expressão de CSF1R entre os anticorpos avaliados um terceiro anticorpo foi titulado. No entanto, o mesmo não apresentou marcação quando utilizado em material parafinado.

✓ Western Blotting

Extrato proteico foi obtido de duas linhagens celulares (Bewo e THP-1) para análise da expressão de CSF1R pelos anticorpos testados para *QIF*. Bewo é uma linhagem celular humana de coriocarcinoma que apresenta os maiores níveis de expressão de RNA mensageiro (118,6 *Transcripts Per Kilobase Million* (TPM) para CSF1R, seguida na terceira posição pela TPH-1 (11.2 TPM), que é uma linhagem humana de leucemia monocítica aguda, dentre 64 diferentes linhagens celulares avaliadas e disponíveis (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000182578-CSF1R/cell>). Análise da expressão proteica de CSF1R foi avaliada utilizando os três anticorpos citados anteriormente.

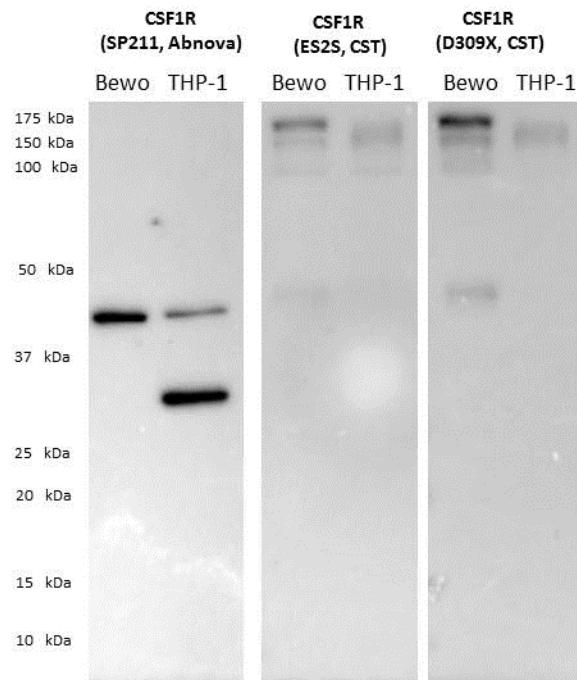


Figura 10: Western blotting das linhagens celulares Bewo e THP-1. Os três anticorpos com seus respectivos clones e marcas foram utilizados na mesma diluição de 1/1000. Anticorpo secundário anti-Rabbit HRP foi utilizado na diluição de 1/2000.

Os resultados obtidos demonstram que o anticorpo anti-CSF1R da empresa Abnova detectou na linhagem celular Bewo uma proteína de aproximadamente 45 κ Da e na linhagem THP-1 duas bandas de aproximadamente 30 e 45 κ Da. Ambos os anticorpos da CST de diferentes clones detectaram na linhagem Bewo três diferentes bandas entre 100 e 175 κ Da, enquanto na linhagem THP-1 os mesmos anticorpos apresentaram expressão um pouco variada nessa mesma faixa de peso molecular. O anticorpo de clone D3O9X também apresentou uma expressão fraca na faixa de aproximadamente 45 κ Da.

A proteína CSF1R consiste de 972 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 108 κ Da, que devido a modificações pós-translacionais que incluem fosforilação, glicosilação e aquisição de N-oligossacarídeos, tem seu peso molecular aumentado. Durante o transporte intracelular da proteína para a membrana plasmática, a adição de N-oligossacarídeos aumenta o peso molecular da proteína CSF1R expressa na membrana para 150 κ Da. Diante dos achados, podemos concluir que os anticorpos de clone E7S2S e D3O9X, ambos da empresa CST, detectaram fragmentos proteicos nas faixas de pesos moleculares esperados para a proteína CSF1R, enquanto o anticorpo anti-CSF1R de clone SP211 demonstrou expressão da proteína alvo em uma faixa completamente diferente. Para confirmação dos achados descritos foi realizado o silenciamento gênico de CSF1R e avaliação do seu transcrito proteico. .

✓ **Silenciamento de CSF1R em na linhagem de células Bewo através de siRNA.**

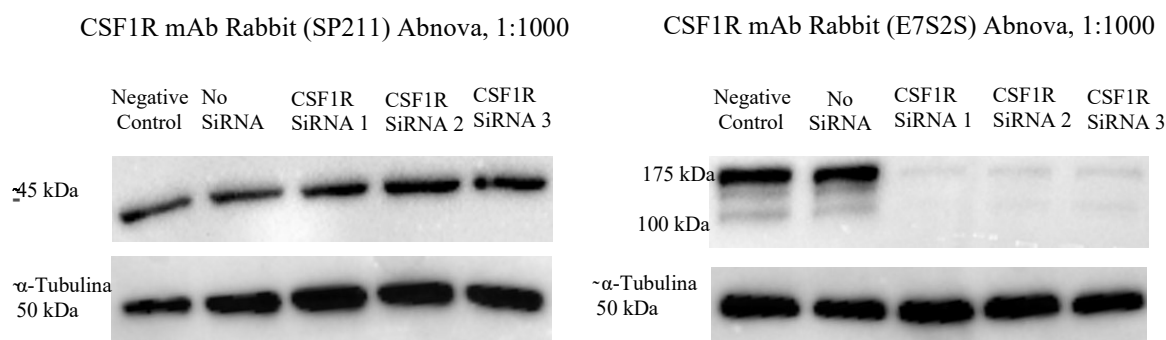


Figura 11: Silenciamento de CSF1R. 2×10^5 células da linhagem Bewo foram plaqueadas em placas de 6 poços. A transfecção foi realizada utilizando três diferentes siRNA na concentração 35pmol em combinação com Lipofectamine 2000TM.

A transfecção de siRNA para as células Bewo foi realizada e a expressão da proteína detectada através dos anticorpos anti-CSF1R de clones SP211 e E7S2S. No primeiro anticorpo podemos observar, assim como o *western blotting* anterior, a expressão de uma banda proteica única de aproximadamente 45 kDa em todas as amostras, não sendo observado portanto em nenhum dos três siRNA utilizados o silenciamento de CSF1R. Em contrapartida, o anticorpo de clone E7S2S apresentou nas amostras controle negativo e sem siRNA a mesma expressão esperada de CSF1R do *western blotting* anterior e os três siRNA utilizados apresentaram quantidades expressivas de silenciamento da proteína alvo. O anticorpo de clone D3O9X não foi utilizado, pois o mesmo não apresentou marcação no ensaio de *QIF*, assim não seria utilizado em ensaios posteriores. Em conjunto esses dados demonstram que o anticorpo fabricado pela empresa Abnova de clone SP211 para a proteína CSF1R não corresponde à proteína alvo em questão, enquanto o segundo anticorpo apresentou os achados esperados de expressão e silenciamento da proteína. Esses resultados justificam as discrepâncias encontradas nas análises de *QIF* quando não foi observada uma correspondência nos *scores* e na expressão da proteína alvo nas amostras avaliadas.

Titulação e validação do protocolo de QIF *singplex* para o anticorpo:IL-34.

- ✓ **IL-34 (Novus Bio, clone 1D12)** **YTMA_359_4_5**
Singleplex: IL-34 e citoqueratina (CK)
Buffer: EDTA pH 8,0 em calor úmido pressurizado
Canal para IL-34 (Cy5)
Amostras normalizadas pela expressão de DAPI no núcleo.

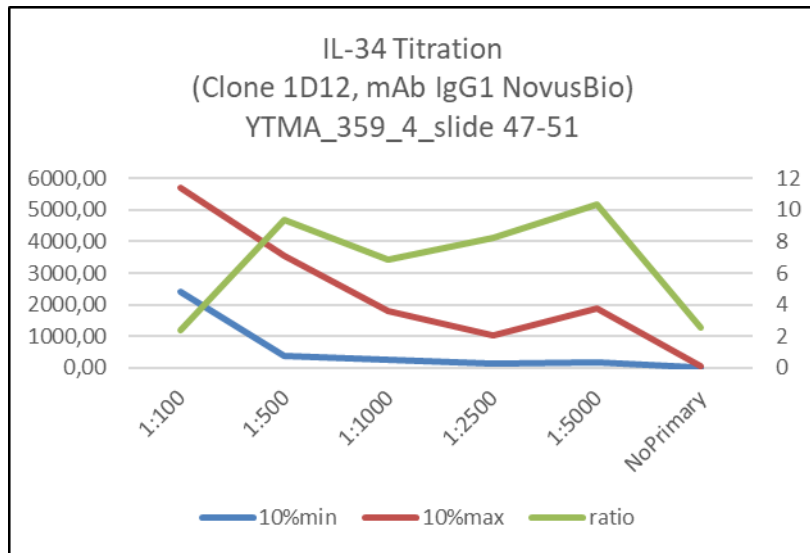
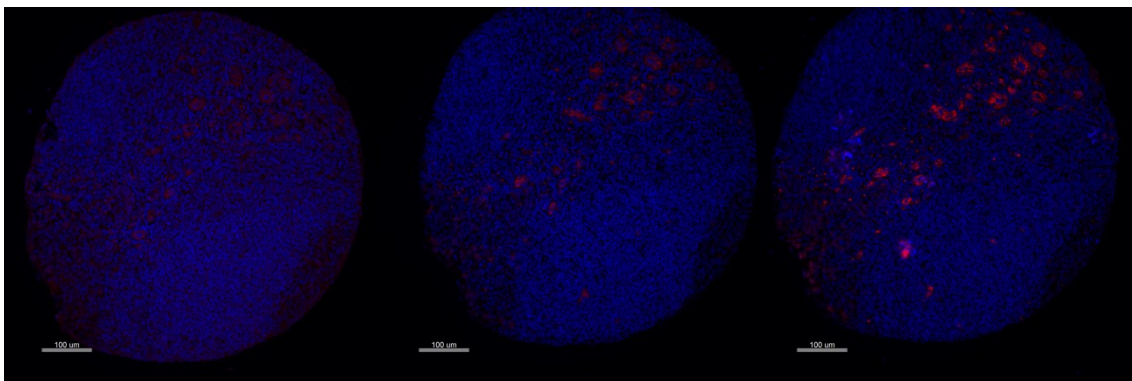


Figura12: Titulação de IL-34.

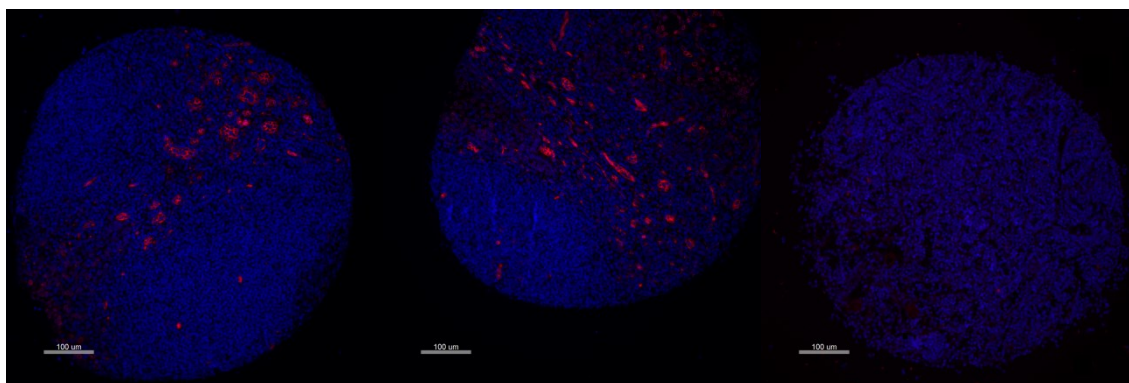
Tonsila **IL-34** **DAPI**



Score: 3968.751
1/100

Score: 581.4111
1/500

Score: 266.8331
1/1000



Score: 171.6044
1/2500

Score: 211.8673
1/5000

Score: sem score
Controle neg

Figura 13: *Quantitative Immunofluorescence analyses* para IL-34. Imagens representativas de *spots* avaliados para cada diluição. IL-34 apresenta expressão em células endoteliais e algumas células inflamatórias.

Considerando os valores obtidos de *scores* de *QIF* e as análises de regressão realizadas, a diluição de 1/500 apresentou melhores *scores* com marcação específica sem a obtenção de tanto *background* quando comparado às demais diluições. Infelizmente não foi possível realizar a validação do anticorpo através de silenciamento de IL-34 na linhagem NTERA-2. Todavia, a realização de protocolo multiplex utilizando CSF1R/IL-34/CK/DAPI demonstrou promissores resultados. O anticorpo escolhido para CSF1 não mostrou bons resultados em material parafinado, assim novos anticorpos devem ser testados.

7.4. Conclusão parcial

A validação criteriosa de anticorpos através de diferentes técnicas em estudos de pesquisas ou mesmo para a clínica mostra-se rigorosamente aconselhável, sobretudo, quando se utilizada material parafinado. Podemos observar que os resultados obtidos pela marcação do anticorpo anti-CSF1R (clone SP211, Abnova), indicado para material parafinado, mostraram-se inespecíficos. Inicialmente a interpretação dos resultados com esse anticorpo nos levava a crer corretos, uma vez que o padrão de marcação observada nos órgãos e células correspondia com a literatura, no entanto, quando confrontamos esses dados com um segundo anticorpo anti-M-CSF (clone E7S2S, Cell Signaling Technology) eles mostraram-se discordantes. A análise posterior de *western blotting* e silenciamento de CSF1R nos revelou que o primeiro anticorpo testado não identificava a proteína alvo sugerida pela empresa. O segundo anticorpo testado, mesmo não sugerido pela empresa para uso em material parafinado, mostrou-se com bom desempenho para a técnica de *QIF* e mais importante com a identificação correta da proteína alvo. Ainda, cabe ressaltar que o terceiro anticorpo testado, também não indicado para material parafinado, embora tenha mostrado marcação específica para CSF1R na técnica de *western blotting* teve desempenho negativo em material parafinado, sendo então descartado devido ao propósito do estudo. Estudos futuros

serão realizados com a validação das demais proteínas alvos, protocolos de *multiplex quantitative immunofluorescence* e a avaliação da via de CSF1R em câncer de pulmão.

7.5. Referências Bibliográficas

ALLAVENA, P. et al. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunological Reviews*, v. 222, n. 1, p. 155–161, 2008b.

BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: Functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in Immunopathology*, v. 35, n. 5, p. 585-600, 2013.

BROWN, J. R. *et al.* Multiplexed quantitative analysis of CD3, CD8, and CD20 predicts response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 20, n. 23, p. 5995–6005, 2014.

CANNARILE, M. A. et al. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *Journal of Immunotherapy of Cancer*, v. 5, n. 53, p. 1–13, 2017.

CARVAJAL-HAUSDORF, D. E. et al. Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. *Laboratory Investigation*, v. 95, n. 4, p. 385–396, 2014.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*, v. 41, n. 1, p. 21–35, 2014.

GOSWAMI, K. K. et al. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. *Cellular Immunology*, v. 316, n. April, p. 1–10, 2016.

GROSSO, J. F.; JURE-KUNKEL, M. N. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer immunity*, v. 13, p. 5, 2013.

GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, v. 127, n. 4, p. 679–695, 2006.

HAMILTON, J. A.; COOK, A. D.; TAK, P. P. Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 16, n. 1, p. 53–70, 2017.

HASHIM, D. *et al.* The global decrease in cancer mortality: Trends and disparities. *Annals of Oncology*, v. 27, n. 5, p. 926–933, 2016.

IARC Handbooks of Cancer Prevention: Breast Cancer Screening: v. 15. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2016.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. OCT, p. 1–22, 2014.

JEMAL, A. *et al.* Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

- KUMAR, V. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Neutralize the Anti-tumor Effect of CSF1 Receptor Blockade by Inducing PMN-MDSC Infiltration of Tumors. *Cancer Cell*, v. 32, n. 5, p. 654- 668.e5, 2017.
- LI, H.; FAN, X.; HOUGHTON, J. Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 101, n. 4, p. 805–815, 2007.
- LUO, J. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 210, n. 1, p. 157–172, 2013.
- MANTOVANI, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.
- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, v. 88, n. 4, p. 937–941, 2015.
- MAO, Y. *et al.* Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 32, n. 1–2, p. 303–315, 2013.
- MEI, J. *et al.* Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: A systemic review and meta-analysis. *Oncotarget*, v. 2, n. 23, 2016.
- PEREZ-GRACIA, J. L. *et al.* Strategies to design clinical studies to identify predictive biomarkers in cancer research. *Cancer Treatment Reviews*, v. 53, p. 79–97, 2017.
- PRICEMAN, S. J. *et al.* *Cancer Immunotherapy*. Chapter 26. JAK/STAT signaling in myeloid cells: targets for cancer immunotherapy, 2th Ed., 2013.
- REHMAN, J. A. *et al.* Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer. *Modern Pathology*, v. 30, n. 3, p. 340-349, 2017.
- SCHALPER, K. A. *et al.* Differential expression and significance of PD-L1, IDO-1, and B7-H4 in human lung cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 23, n. 2, p. 370–378, 2017.
- SCHALPER, K. A. *et al.* Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 107, n. 3, p. 1–9, 2015.
- VON DINCKLAGE, J. J.; BALL, D.; SILVESTRI, G. A. A review of clinical practice guidelines for lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, v. 5, n. SUPPL.5, 2013.
- WEST, H. J. Highlights of Recent Studies of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA oncology*, v. 98104, p. 9–10, 2016.
- ZHANG, J.; PATEL, L.; PIENTA, K. J. Targeting chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) as an example of translation of cancer molecular biology to the clinic. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, v. 95, p. 31–53, 2010.

APÊNDICE B:

Produção Científica no período de fevereiro de 2014 a dezembro de 2018

Experiência profissional

1. Professor temporário na Fundação Comunitária de Ensino Superior de Itabira (FUNCESI) das turmas de Biomedicina e Enfermagem, lecionando as disciplinas de Anatomia Patológica, Biofísica, Biologia Molecular e Análise Molecular no período de 2014-2015.
2. Doutorado Sanduíche no setor de Patologia da Faculdade de Medicina, da Universidade de Yale, Estados Unidos, no período de outubro de 2017 a abril de 2018.

TRABALHOS RELACIONADOS À TESE

Resumos publicados em anais de eventos

1. MIRANDA, F. F.; **REIS, D. C.**; DAMASCENO, K. A.; SOUZA, C. M.; CAMPOS, P. P.; CASSALI, G.D. Avaliação de versican e infiltrado inflamatório em carcinoma mamário murino 4T1 In: III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, ENAPAVE 2015, 2015, Belo Horizonte. Anais do III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, ENAPAVE 2015, 2015.
3. SANTOS, M. O.; **REIS, D. C.**; VELOSO, E. S.; SILVA, P. L. L.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Efeito de diferentes doses de talidomida no crescimento tumoral e proliferação neoplásica do tumor primário e metástases pulmonares do carcinoma mamário murino 4T1 In: III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, ENAPAVE 2015, 2015, Belo Horizonte. Anais do III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, ENAPAVE 2015, 2015.
4. **REIS, D. C.**; CAMPOS, P. P.; RODRIGUES, M. A.; LOPES, M. T. P.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Efeito do tratamento prolongado com diferentes doses de talidomida no infiltrado inflamatório de macrófagos no tumor primário e metástases pulmonares do carcinoma mamário murino 4T1 In: III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, ENAPAVE 2015, 2015, Belo Horizonte. Anais do III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, ENAPAVE 2015, 2015.
5. SILVA, P. L. L.; **REIS, D. C.**; VELOSO, E. S.; SANTOS, M. O.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Tratamento com talidomida diminui o crescimento tumoral e aumenta a resposta inflamatória no carcinoma mamário murino 4T1 In: III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, ENAPAVE 2015, 2015, Belo Horizonte. Anais do III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, ENAPAVE 2015, 2015.

Resumos enviados para apresentação em eventos

1. Gabriela Pêgas, **Diego Reis**, Geovanni Cassali. Thalidomide-induced CCL2 and M-like macrophages inhibit lung metastasis in 4T1 murine breast model. *World Toxicology Pathology Congress*. Local: International Difussion Center of the University of São Paulo, São Paulo, 2018.

2. Santos, M. O.; **Reis, D. C.**; Costa, A. C. V.; Rocha, L. K.; Gaspar, V. S. L.; Russo, R. C.; Ferreira, E.; Cassali, G. D. Influência da depleção de eosinófilos na Progressão tumoral de um modelo murino metastático de câncer de mama. Semana de Conhecimento UFMG, Local: UFMG, Belo Horizonte, 2016.

3. Costa, A. C. V.; **Reis, D. C.**; Damasceno, K. A.; Campos, C. B.; Mattos, M. S.; Campos, P. P.; Russo, R. C.; Ferreira, E.; Cassali, G. D. Avaliação da expressão de versican e do infiltrado de macrófagos associados a tumores no desenvolvimento de um modelo murino metastático de câncer de mama. Semana de Conhecimento UFMG, Local: UFMG, Belo Horizonte, 2016.

Apresentação oral de trabalho em eventos científicos

1. **Reis, D. C.**; Santos, M. O.; Costa, A. C. V.; Rocha, L. K.; Gaspar, V. S. L.; Russo, R. C.; Ferreira, E.; Cassali, G. D. Influência da depleção de eosinófilos na progressão tumoral de um modelo murino metastático de câncer de mama. V Encontro de Patologia da UFMG. Local: ICB. Cidade: Belo Horizonte, 2016.

2. Cecília Bonolo de Campos; **Diego Carlos dos Reis**; Paula Peixoto Campos ; Sílvia Ligório Fialho; Michele Angela Rodrigues; GEOVANNI DANTAS CASSALI. Inflammatory response following thalidomide treatment in the 4T1 murine mammary carcinoma, 2016. (Congresso,Apresentação de Trabalho); Local: Foz do Iguaçu; Cidade: Foz do Iguaçu; Evento: World Veterinary Cancer Congress.

Palestras e minicursos

1. **Diego Carlos dos Reis**. Desmistificando o câncer de mama. Outubro Rosa. Barão de Cocais. Minas Gerais.

2. **Diego Carlos dos Reis**. Técnicas de coleta de amostras de camundongos e de necropsia em ratos e camundongos. II Workshop de Patologia Experimental. Vitória/ Espírito Santo. (Apresentação de minicurso).

3. **Diego Carlos dos Reis**. Imuno-histoquímica básica aplicada a pesquisa experimental. II Workshop de Patologia Experimental. Vitória/ Espírito Santo. (Apresentação de palestra).

4. **Diego Carlos dos Reis**. Imunopatologia de tumores. 2018. PUC-Betim. Betim, Minas Gerais. (Apresentação de palestra).

5. **Diego Carlos dos Reis**. Técnicas de necropsia em animais de laboratório. I Workshop de Patologia Experimental. 2016. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. (Apresentação de minicurso).

6. **Diego Carlos dos Reis**. Modelos Experimentais em Oncologia Mamária. 2015. Universidade Federal de São Del Rey, Campus Dona Lindu, Divinópolis, Minas Gerais. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

TRABALHOS NÃO RELACIONADOS À TESE

Artigos publicados ou aceitos para publicação em periódico

1. Patrícia Aparecida Vieira de Barros; Maria Emília Rabelo Andrade; Simone de Vasconcelos Generos; Sued Eustáquio Mendes Miranda; **Diego Carlos dos Reis**; Paola Caroline Lacerda Leocádio; Éricka Lorena de Sales e Souza; Flaviano dos Santos Martins; Marco Antonio Sunfeld da Gama; Geovanni Dantas Cassali; Jacqueline Isaura Alvarez Leite; Simone Odília Antunes Fernandes; Valbert Nascimento Cardoso. Conjugated lonoleic acid prevents damage caused by interstinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018.
2. Acurcio, Leonardo Borges; Bastos, Rafael Wesley; Sandes, Sávio Henrique De Cicco; Guimarães, Amanda Cristina De Carvalho; Alves, Clarice Gregório; **Reis, Diego Carlos Dos**; Wuyts, Sander; Nunes, Álvaro Cantini; Cassali, Geovanni Dantas; Lebeer, Sarah; Souza, Marcelo Resende De; Nicoli, Jacques Robert. Protective effects of milk fermented by *Lactobacillus Plantarum* B7 from brazilian artisanal cheese on a *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium infection in balb/C Mice. *Journal of Functional Foods*, V. 33, P. 436-445, 2017.
3. Acurcio, L.B.; Sandes, S.H.C.; Bastos, R.W.; Santanna, F.M.; Pedroso, S.H.S.P.; **Reis, D.C.**; Nunes, Á.C.; Cassali, G.D.; Souza, M.R.; Nicoli, J.R. Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infection. *Beneficial Microbes*, p. 1-10, 2017.
4. Cunha, R.M.C.; Lavalle, G.E.; **Reis, D.C.**; Horta, R.S.; Teixeira, S.V.; Ramirez, J.A; Araújo, R.B. Assessment of electrochemotherapy effects on the development of Ehrlich solid tumor in swiss mice using a novel electroporator device. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, v. 69, p. 1581-1590, 2017.
5. Araújo, Raquel Silva; Silveira, Ana Letícia Malheiros; De Sales E Souza, Éricka Lorena; Freire, Rachel Horta; De Souza, Cristina Maria; **Reis, Diego Carlos**; Costa, Bruno Rocha Cordeiro; Sugimoto, Michelle Amantéa; Silveira, Josianne Nicácio; Dos Santos Martins, Flaviano; Cassali, Geovanni Dantas; Leite, Jacqueline Isaura Alvarez; Sousa, Lirlândia Pires; Ferreira, Adaliene Versiani Matos; Oliveira, Mônica Cristina; Cardoso, Valbert Nascimento. Intestinal toxicity evaluation of longcirculating and pH-sensitive liposomes loaded with cisplatin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 106, p. 142-151, 2017.
6. Isamara Simas de Oliveira; Paulo Fernando Tormin Borges Crosara; Geovanni Dantas Cassali; **Diego Carlos dos Reis**; Danilo Santana Rodrigues; Flavio Barbosa Nunes Azithromycin for the treatment of eosinophilic nasal polyposis: Clinical and histologic analysis. *Allergy & Rhinology*, p.1 7, 2016.
7. De Oliveira, Isamara Simas; Crosara, Paulo Fernando Tormin Borges; Cassali,

Geovanni Dantas; **Dos Reis, Diego Carlos**; De Resende, Camilo Brandão; Nunes, Flavio Barbosa; Guimarães, Roberto Eustáquio Santos. Evaluation of the improvement of quality of life with Azithromycin in the treatment of eosinophilic nasal polyposis. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. v.82, p.198 202, 2016.

8. Carlesso, Fernanda N.; Araújo, Raquel S.; Fuscaldi, Leonardo L.; Mendes Miranda, Sued E.; Rubello, Domenico; Teixeira, Cláudia S.; **Dos Reis, Diego C.**; Leite, Elaine A.; Silveira, Josianne N.; Fernandes, Simone O.A.; Cassali, Geovanni D.; De Oliveira, Mônica C.; Colletti, Patrick M.; De Barros, André L.B.; Cardoso, Valbert N. Preliminary data of the antipancreatic tumor efficacy and toxicity of long circulating and pH sensitive liposomes containing cisplatin. *Nuclear Medicine Communications*., v.xx, p.1, 2016.

9. Frade, Taíssa Iolanda Checón; **Dos Reis, Diego Carlos**; Cassali, Geovanni Dantas; Bakhle, Yeshwant S.; De Francischi, Janetti Nogueira Tissue selective inflammation in the oral cavity of the rat. *Inflammopharmacology* (Dordrecht. Print), v.x, p.1 9, 2016.

10. Carlesso, F.N.; Fuscaldi, L.L.; Araújo, R.S.; Teixeira, C.S.; Oliveira, M.C.; Fernandes, S.O.A.; Cassali, G.D.; **Reis, D.C.**; Barros, A.L.B.; Cardoso, V.N. Evaluation of ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesin(7-14) as an agent for pancreas tumor detection in mice. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*. v.48, p.00 00, 2015.

11. Souza, C.M; Ana Candida Araújo e Silva; Clarissa de Jesus Ferraciolli; Giovanna Vieira Moreira; Liliane Cunha Campos; **Diego Carlos dos Reis**; Miriam Teresa Paz Lopes; Mônica Alves Neves Diniz Ferreira; Silvia Passos Andrade; Geovanni Dantas Cassali. Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*., v.68, p.51 57, 2014.

12. Geovanni D. Cassali; Gleidice E. Lavalley; Enio Ferreira; Alessandra EstrelaLima; Andriago B. De Nardi; Cristina Ghever; Renata A. Sobral; Renée L. Amorim; Luciana O. Oliveira; Felipe A. R. Sueiro; Hugo E. O. Beserra; Angélica C. Bertagnolli; Conrado O. Gamba; Karine A. Damasceno; Cecilia B. Campo; Marina R. Araujo ; Liliane C. Campos; Lidianne N. Monteiro; Fernanda C. Nunes; Rodrigo S. Horta; **REIS, D. C.**; Maria Cecilia R. Luvizotto; Georgia M. Magalhães; Josiane B. Raposo; Ana M. R. Ferreira; et al Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors 2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*., v.7, p.1, 2014.

13. Araújo MR; Damasceno KA; Gamba CO; Campos CB; Campos LC; **REIS, D. C.**; Souza CM ; Cassali GD. Morphological and immunohistochemical characterization of five phyllodes mammary gland tumors in dogs. *Online Journal of Veterinary Research*., v.18, p.688 695, 2014.

14. Souza, C. M.; Auler, P.A.; **Reis D. C.**; Lavalley, G. E.; Ferreira, E.; Cassali, G.D. Subcutaneous administration of ketoprofen delays Ehrlich solid tumor growth in mice. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*., v.66, p.1376 1382, 2014.

15. **Diego Carlos Reis**; Cristina Maria de Souza; Liliane Cunha Campos; Ana Candida Araújo e Silva; Miriam Teresa Paz Lopes; Geovanni Dantas Cassali ; Enio Ferreira. Thalidomide promotes leukocytosis in mice inoculated with 4T1 mammary carcinoma.

Artigo aceito para publicação em periódico

CAMPA, C. C.; SILVA, R. L.; MARGARIA, J. P.; PIRALI, T.; MATTOS, M. S.; KRAEMER, L. R.; **REIS, D.C.**; GROSA, G.; COPPERI, F.; DALMARCO, E. M.; LIMA-JUNIOR, R. C.; APRILE, S.; SALA, V.; BELLO, F. D.; MEDANA, C.; CASSALI, G.D; TRON, G.C.; TEIXEIRA, M. M.; CIRAULO, E.; RUSSO, R. C.; HIRSCH, E. Inhalation of the prodrug PI3K inhibitor CL27c improves lung function in asthma and fibrosis. *Nature Communications*, 2018.

Resumos publicados em anais de eventos

1. TEIXEIRA, S. V.; **REIS, D. C.**; CAMPOS, C. B.; OLIVEIRA, M. R.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G.D. Carcinoma sólido de tireoide em cão: análise clinicopatológica e terapêutica Relato de Caso In: III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, ENAPAVE 2015, 2015, Belo Horizonte. Anais do III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, ENAPAVE 2015, 2015.

Resumos enviados para apresentação em eventos

1. Alves, C. G; Guimarães, A.C.C; **REIS, D.C.**; ACURCIO, L. B.; Cassali, G.D; Souza, M. R.; Nicoli, J.R. AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE LEITES FERMENTADOS POR LACTOBACILOS ISOLADOS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL SOBRE OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS BALB/c EM UM MODELO DE SALMONELOSE, 2015. (Simpósio,Apresentação de Trabalho); Local: Instituto de Ciências Biológicas da Ufm; Cidade: Belo Horizonte; Evento: II Simpósio de Microbiologia da UFMG – Microbiologia Translacional: Do ambiente natural às aplicações biotecnológicas; Inst.promotora/financiadora: Programa de Pós Graduação em Microbiologia.

2. ANA GABRIELA SILVA ; IZABELA NATÁLIA FARIA GOMES; TAMARA RIBEIRO LONGATTI; **DIEGO CARLOS DOS REIS**; GEOVANNI DANTAS CASSALI; RALPH GRUPPI THOMÉ; HÉLIO BATISTA DOS SANTOS; ROSY IARA MACIEL DE AZAMBUJA RIBEIRO. PHYTOCHEMICAL STUDY AND CYTOTOXICITY OF A CERRADO PLANT IN EHRlich TUMOR, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho); Cidade: Foz do Iguaçu; Evento: 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq); Inst.promotora/financiadora: Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology.

8. ANEXOS

Anexo 1: Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMG)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 261/2012, relativo ao projeto intitulado “Avaliação do infiltrado inflamatório do carcinoma mamário murino 4T1 após o tratamento com talidomida”, que tem como responsável Geovanni Dantas Cassali, 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 13/09/2012. Este certificado espira-se em 13/09/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 261 / 2012, related to the Project entitled “Inflammatory infiltrate evaluation in murine 4T1 mammary carcinoma after thalidomide treatment.”, under the supervision of Geovanni Dantas Cassali, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 13/09/2012. This certificates expires in 13/09/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte,
13/09/2012.

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

Cep: 31270-901; Belo Horizonte, MG; Brasil

Telefone: (31) 3499-4516; Fax: (31) 3499-4592

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 2: Comprovante de submissão do artigo 2 para o período Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia - Manuscript ID ABMVZ-2020-12125

De: Secretaria ABMVZ (onbehalf@manuscriptcentral.com)

Para: cassalig@icb.ufmg.br; geovanni.cassali@gmail.com

Cc: dcarlosreis@yahoo.com.br; michele.ip3@gmail.com; anacandidaas@gmail.com; liliane2cmata@gmail.com; paulapet2003@yahoo.com.br; silvia.funed@gmail.com; mtpl@icb.ufmg.br; dawidson.gomes@gmail.com; russorc@gmail.com; eniofvvet@hotmail.com; cassalig@icb.ufmg.br; geovanni.cassali@gmail.com

Data: quinta-feira, 30 de julho de 2020 09:02 BRT

30-Jul-2020

Dear Dr. Cassali:

Your manuscript entitled "Evaluation of the immunomodulatory activity of thalidomide on tumor-associated macrophages in 4T1 murine metastatic breast cancer model" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Your manuscript ID is ABMVZ-2020-12125.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Sincerely,

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia Editorial Office