

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia**

Ariadne Duarte Braga

**MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES COMO MECANISMO  
DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL/ANTIMETASTÁTICA DE PROTEASES OBTIDAS DO LÁTEX  
DE *VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS***

Belo Horizonte

2017

Ariadne Duarte Braga

**MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES COMO MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL/ANTIMETASTÁTICA DE PROTEASES OBTIDAS DO LÁTEX DE *VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, com ênfase em Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Miriam Teresa Paz Lopes

**Belo Horizonte**

**2017**

043

Braga, Ariadne Duarte.

Modulação do fenótipo de macrófagos associados a tumores como mecanismo de ação da atividade antitumoral/antimetastática de proteases obtidas do látex de *Vasconcellea cundinamarçensis* [manuscrito] / Ariadne Duarte Braga. – 2017.

132 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa Dra Miriam Teresa Paz Lopes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

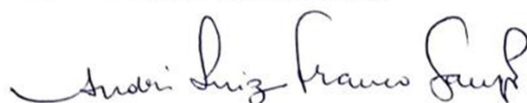
1. Farmacologia. 2. Caricaceae. 3. Peptídeo Hidrolases. 4. Macrófagos. I. Lopes, Miriam Teresa Paz. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615

**"MODULAÇÃO DO FENÓTIPO DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS  
A TUMORES COMO MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTITUMORAL/ANTIMETASTÁTICA DE PROTEASES OBTIDAS  
DO LÁTEX DE VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS"**

**ARIADNE DUARTE BRAGA**


Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **05 de outubro de 2017**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**DR. ANDRE LUIZ FRANCO SAMPAIO**  
FARMANGUINHOS/FIOCRUZ



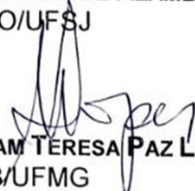
**PROF. DR. ANDRÉ KLEIN**  
ICB/UFMG



**PROF. DR. RICARDO GONÇALVES**  
ICB/UFMG



**PROFA. DRª. ROSY IARA MACIEL DE AZAMBUJA RIBEIRO**  
CCO/UFESJ



**PROFA. DRª. MIRIAM TERESA PAZ LOPES**  
ICB/UFMG  
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 05 de outubro de 2017**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me concedido a oportunidade de conhecer pessoas incrivelmente maravilhosas e especiais.

A minha orientadora, Miriam, pela credibilidade, por sua dedicação e ensinamentos que tornaram possível a realização deste trabalho. Pra mim, foi uma companheira, e espelho de liderança e de profissional.

Ao prof. Salas pelo imenso conhecimento compartilhado.

Ao prof. André Klein pela oportunidade de ingresso na vida acadêmica, incentivo e ensinamentos.

Aos meus AMIGOS LSATianos Ana, Celso, Dalton, Fernanda, Kátia, Lívia, Luciana, Gabriela e Verlane, meu muito obrigada ! Sou grata e orgulhosa por ter sido parte de uma equipe sólida, competente, determinada a alcançar seus objetivos e de lutar uns pelos outros ! Cresci imensamente com vocês, tudo foi mais leve ao ter vocês por perto. Obrigada por todo suporte, críticas, sugestões e pelas cruciais ajudas nos experimentos que tornaram possível a concretização desse trabalho.

Aos colegas do CEPAPAG, especialmente Fabio e Luz pela convivência e ajuda durante as etapas de obtenção das amostras e técnicas bioquímicas/ biomoleculares.

Aos amigos do Lab. Dor e Inflamação, Natalia e Ayslan pela amizade, convivência e companheirismo.

A minha mãe por estar sempre ao meu lado, obrigada pelo amor e incentivos inesgotáveis, que tornaram os meus sonhos como sua prioridade de vida. Obrigada pela dedicação integral, pelo amor surreal, por todo cuidado e carinho diário. A Bina e ao Dudu, pelo amor e convivência hermanística, pelo incentivo e por compartilhar de momentos inesquecíveis em minha vida.

Ao meu esposo Neto, por todo apoio, amor e incentivo.

Aos Duarte e aos Braga, por estarem sempre prontos para o que der e vier. Por compreenderem as minhas ausências e, por acima de tudo, me incentivarem.

Aos amigos da Pós-graduação pela convivência e amizade.

A todos os que, de alguma forma, participaram deste trabalho.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES, pelo financiamento.

Muito obrigada.

Trabalho realizado nos Laboratórios de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia e de Biologia Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

## RESUMO

Anteriormente, mostramos que a fração proteolítica P1G10 advinda do látex de *V. cundinamarçensis* apresenta atividade antitumoral/antimetastática sobre modelo de carcinoma de mama 4T1 ao reduzir níveis de parâmetros inflamatórios, a angiogênese e por aumentar a atividade intratumoral de macrófagos associados a tumores (Tumor associated macrophages - TAMs). O objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos de ativação macrofágica promovidos pelo tratamento com sub-frações de P1G10, CMS1 e CMS2, assim como, avaliar a habilidade das mesmas em reduzir o peso de tumores e o número de metástases pela modulação *in vivo* de TAMs. Primeiramente, mostramos que os níveis de ROS e de nitrito se encontram, respectivamente, aumentados em 2 e 11 vezes, após tratamentos com CMS1 ou CMS2. Dosagens de citocinas realizadas, também, em culturas de macrófagos mostram que CMS1 promove aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  (586%), IL-6 (23%) e CCL2/MCP-1 (368%). A sub-fração CMS2 promove aumentos nos níveis das respectivas citocinas na ordem de 1.3, 2.8 e 0.8 vezes maiores que os encontrados pelo tratamento com CMS1. Os níveis de IL-12 estão aumentados pelo tratamento com CMS1 (180%) enquanto que os de TNF- $\alpha$  (88%) por CMS2. Por outro lado, citocinas como VEGF, TGF- $\beta$  e a atividade de MMP-9 se encontram diminuídas em 53, 94 e 95%, respectivamente, pela exposição dos macrófagos a 20 $\mu$ g/mL de CMS1 ou de CMS2. O tratamento de macrófagos com CMS2 foi capaz de reduzir a viabilidade de células 4T1 (em até 57%) em modelo de co-cultura. Apesar de CMS1, também, promover aumentos nos níveis de alguns mediadores acima citados, não foi capaz de induzir a atividade tumoricida em macrófagos. Posteriormente, foram avaliadas diferentes vias intracelulares de ativação macrofágica que poderiam ser moduladas por CMS2, como NF $\kappa$ -B, COX-2, MAPKs e Akt. Os resultados mostram que as vias ativadas nesses macrófagos foram as de NF $\kappa$ -B e da Akt. Em modelo *in vivo* de carcinoma de mama 4T1, proteases de CMS2 (0,3 - 3,0 mg/kg, s.c) reduzem, em todas as doses avaliadas e após tratamento por 22 dias, o peso dos tumores (31%) e o número de metástases pulmonares(48%). A dosagem de citocinas intratumorais mostra que o tratamento dos animais com CMS2 (3,0 mg/kg) promove diminuições nos níveis de IL-1 $\beta$  (31%), de TGF- $\beta$  total (33%), de VEGF (34%) e da atividade de MMP-2 (78%), ao passo que, aumenta os níveis de IL-12 (25%) e não altera os de TNF- $\alpha$ , IL-10 ou da atividade de NAG. Assim, podemos concluir que CMS2 apresenta atividade antitumoral/antimetastática, dentre outros mecanismos, pela modulação da ativação de TAMs, uma vez que, proporciona o desenvolvimento do fenótipo tumoricida, diretamente, por alterações de vias intracelulares macrofágicas ou, indiretamente, pela alteração de mediadores, os quais favorecem o desenvolvimento deste fenótipo.

Palavras-chave: *Caricaceae*, proteases, atividade antitumoral/antimetastática, macrófagos associados a tumores.

## ABSTRACT

A proteolytic fraction (P1G10) from *V. cundinamarcensis* latex has antitumor/antimetastatic activity on 4T1 breast carcinoma model by reducing inflammation, angiogenesis and increasing tumor associated-macrophages (TAMs) activity. The aim of this study was to investigate the mechanisms of macrophages activation by P1G10 sub-fractions (CMS1 and CMS2) and the ability of these proteins to reduce tumor mass and metastasis number by *in vivo* modulation of TAM's. First, was shown that the levels of nitrite and ROS were augmented in 2 and 11 times, respectively, after macrophage treatment with CMS1 or CMS2. Dosage of cytokines levels in these cultures, revealed that CMS1 increases levels of IL-1 $\beta$  (586%), IL-6 (23%) and CCL2/MCP-1 (368%). The sub-fraction CMS2 promotes an increase of these same cytokines in 1.3, 2.8 and 0.8 times above the observed by CMS1 treated macrophages. The levels of IL-12 were increased by CMS1 treatment (180%) and TNF- $\alpha$  by CMS2 (88%). In the other hand, cytokines as VEGF, TGF- $\beta$  and MMP-9 activity were diminished around 53, 94 and 95%, respectively, by exposing macrophages to both sub-fractions. CMS2 was able to promote the macrophage tumoricidal activity, as reduced 4T1 cell viability (57%) in a co-culture model. Although, CMS1 augments the levels of these inflammatory mediators it was not able to induce macrophage tumoricidal activity. After, was done analyzes of intracellular signaling pathways, that could be stimulated in macrophages by CMS2 treatment, as NF $\kappa$ -B, COX-2, MAPKs e Akt. The results revealed that Akt and NF $\kappa$ -B signaling are activated in macrophage by CMS2 proteins. After 22 days of treatment, CMS2 (0.3, 1.0 or 3.0 mg/kg, s.c) reduce, in all doses, the tumor weight (31%) and lung metastasis (48%) in 4T1 breast carcinoma model. The results shown that CMS2 (3.0 mg/kg), when compared to saline treated mice, decreases tumor levels of IL-1 $\beta$  at 31%, total TGF- $\beta$  at 33%, VEGF at 34% and the activity of metalloproteinase-2 at 78% but increases IL-12 level at 25% and it wasn't detected any alteration in levels of TNF- $\alpha$ , IL-10, or NAG-activity. So, we can conclude that CMS2 shows antitumor/antimetastatic activity, in some way, by modulation of TAMs while gives to these immune cells ability to fight tumor cells, directly by alterations in intra-signaling pathways or, indirectly, by cause alterations in the production of intratumoral mediators that can promote macrophage tumoricidal phenotype.

Keywords: *Caricaceae*, proteases, antitumor activity, tumor associated-macrophage.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Ilustração 1</b>	<b>A origem e a influência da heterogeneidade do microambiente para o desenvolvimento de tumores</b>	<b>20</b>
<b>Ilustração 2</b>	<b><i>Vasconcellea cundinamarcensis</i></b>	<b>28</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Capacidade tumoricida de macrófagos, expostos a CMS1 ou CMS2, sobre células 4T1	66
Figura 2	Porcentagem de DNA sub-diplóide presente em células 4T1 co-cultivadas com macrófagos, previamente expostos a CMS2, em aparatos transwell	68
Figura 3	Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a produção de nitrito por culturas de macrófagos	70
Figura 4	Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio por culturas de macrófagos	71
Figura 5	Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios por culturas de macrófagos	74
Figura 6	Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a produção de mediadores pró-angiogênicos por culturas de macrófagos	75
Figura 7	Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a atividade de MMP-9 presente no sobrenadante de macrófagos em cultura	76
Figura 8	Imagens ilustrativas de bandas proteicas provenientes do lisado de culturas de macrófagos peritoneais e obtidas pela técnica de Western blot	78
Figura 9	Efeito de CMS2 sobre a expressão de proteínas intracelulares envolvidas na ativação macrofágica	79
Figura 10	Efeito de CMS2 sobre o desenvolvimento do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c	81
Figura 11	Efeito de CMS2 sobre os níveis intratumorais de mediadores pró-inflamatórios	83
Figura 12	Efeito de CMS2 sobre os níveis intratumorais de mediadores anti- inflamatórios e/ou pró-angiogênicos	84
Figura 13	Efeito de CMS2 sobre a atividade intratumoral de metaloproteases (MMPs)	85

<b>Figura 14</b>	<b>Atividade intratumoral de NAG após tratamento com CMS2</b>	<b>86</b>
<b>Figura 15</b>	<b>Efeito de CMS2 sobre a expressão intratumoral de genes indicativos do fenótipo de TAMs</b>	<b>87</b>
<b>Figura 16</b>	<b>Efeito de CMS2 sobre o desenvolvimento do carcinoma 4T1/M2 em camundongos BALB/c</b>	<b>89</b>

### **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	<b>Diluições de anticorpos primários utilizados nos ensaios de <i>Western Blotting</i></b>	<b>56</b>
<b>Tabela 2</b>	<b>Quantidade de reagentes utilizados na síntese de cDNA</b>	<b>59</b>
<b>Tabela 3</b>	<b>Ciclos térmicos utilizados na reação de transcrição reversa</b>	<b>60</b>
<b>Tabela 4</b>	<b>Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas RT-qPCR para amplificação dos seguimentos genômicos específicos para MR, FIZZ-1, Ym-1 e GAPDH</b>	<b>61</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>% (p/v)</b>	percentual peso por volume
<b>% (v/v)</b>	percentual volume por volume
<b>%</b>	porcento
<b>µg</b>	microgramas ( $10^{-6}$ g)
<b>µL</b>	microlitros ( $10^{-6}$ L)
<b>µm</b>	micrômetro ( $10^{-6}$ m)
<b>Céls</b>	células
<b>Cl<sub>t</sub></b>	clearance total
<b>cm</b>	centímetro ( $10^{-2}$ m)
<b>col.</b>	Colaboradores
<b>Ctrl</b>	controle
<b>D.O.</b>	densidade ótica
<b>e.v.</b>	endovenosa
<b>et al.</b>	e outros (do latim <i>Et alli</i> )
<b>G</b>	força gravitacional ( $9,81\text{m. s}^{-2}$ )
<b>g</b>	gramas
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>i.v.</b>	intravenoso
<b>Kel</b>	constante de eliminação
<b>Kg</b>	Kilogramas
<b>Kp</b>	coeficiente de partição

<b>M</b>	concentração molar (moles/L)
<b>Min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitros
<b>mm</b>	milímetro ( $10^{-3}$ m)
<b>ng</b>	nanogramas
<b>NK</b>	natural killer
<b>nM</b>	concentração nanomolar ( $10^{-9}$ moles/L)
<b>nm</b>	nanômetro ( $10^{-9}$ m)
<b>°C</b>	graus Celsius ou centígrados
<b>p.e.</b>	por exemplo
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>s.c.</b>	subcutâneo
<b>T<math>\frac{1}{2}</math></b>	Tempo de meia-vida
<b>Th</b>	Linfócito T helper
<b>UF</b>	Unidades de Fluorescência
<b>v.o.</b>	via oral
<b>v.s</b>	versus
<b>pg</b>	picogramas

## LISTA DE SIGLAS

<b>ADCC</b>	Citotoxicidade celular anticorpo-dependente, do inglês <i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i>
<b>Akt</b>	Proteína quinase B, do inglês <i>Kinase protein B</i>
<b>AP-1</b>	Proteína ativadora-1, do inglês <i>Activator Protein-1</i>
<b>ASC</b>	Área sob a curva
<b>ATCC</b>	Coleção Americana de Tipos Celulares, do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
<b>BCAP</b>	Proteína adaptadora
<b>CEBIO</b>	Centro de Bioterismo
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no uso de animais
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>DFCH-DA</b>	2', 7'-diclorofluoresceína diacetato
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic acid</i>
<b>ELAMs</b>	Moléculas de adesão leucocitária ao endotélio, do inglês <i>Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1</i>
<b>ERK</b>	Quinases reguladas por sinal extracelular, do inglês <i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FIZZ-1</b>	do inglês <i>Found in Inflammatory Zone 1</i>
<b>GH</b>	Hormônio do crescimento, do inglês <i>Growth Hormone</i>

<b>GHR</b>	Receptor para hormônio do crescimento, do inglês <i>Growth Hormone receptor</i>
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulante de colônia para granulócitos e macrófagos, do inglês <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HIF</b>	Fator Heterodimérico induzido por Hipóxia, do inglês <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
<b>ICAMs</b>	<i>Moléculas de adesão intercelular, do inglês Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biológicas
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível, do inglês <i>induced Nitric Oxide Synthase</i>
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos
<b>MAPKs</b>	Proteínas quinases ativadas por mitógenos, do inglês <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
<b>CCL2/MCP-1</b>	Proteína quimioatraente para monócitos-1, do inglês <i>Monocytes Chemoattractant Protein-1</i> .
<b>M-CSF</b>	Fator estimulante de colônia de macrófagos, do inglês <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MHC</b>	Complexo maior de histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>

<b>CCL3/MIP1-<math>\alpha</math></b>	Proteína inflamatória de macrófagos- $\alpha$ , do inglês <i>Macrophage Inflammatory Protein alpha</i>
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases de matriz, do inglês <i>matrix metalloproteinases</i>
<b>MR</b>	Receptor para manose, do inglês <i>Manose Receptor</i>
<b>MTC</b>	Citotoxicidade tumoral macrófago-mediada, do inglês <i>Macrophage-mediated Tumour Cytotoxicity</i>
<b>MT-MMPs</b>	Metaloproteinases de membrana, do inglês <i>Membrane-Type MMPs</i>
<b>mTOR</b>	Proteína inibida por rapamicina
<b>M<math>\phi</math>-Ca</b>	Macrófagos classicamente ativados
<b>M<math>\phi</math>-AA</b>	Macrófagos alternativamente ativados
<b>NAG</b>	N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator de transcrição nuclear- Kappa B, do inglês <i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
<b>NO</b>	Oxido Nítrico, do inglês <i>Nitric oxide</i>
<b>PBS</b>	Tampão fosfato alcalino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-quinase, do inglês <i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
<b>PKs</b>	Proteínas quinases, do inglês <i>Proteins Kinases</i>
<b>PARs</b>	Receptores ativados por proteases, do inglês <i>Protease-activated receptor</i>
<b>RNI</b>	Intermediários reativos de nitrogênio, do inglês <i>Reactive Nitrogen intermediates</i>
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>SAPK/JNK</b>	Proteínas quinases ativadas por estresse, do inglês <i>Stress-Activated Protein Kinases/c-Jun N-terminal Kinase</i>



<b>TAMs</b>	Macrófagos associados a tumores, do inglês <i>Tumor Associated-Macrophages</i>
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Fator transformador do crescimento- $\beta$ , do inglês <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
<b>TIMPs</b>	Inibidores teciduais de metaloproteases, do inglês <i>Tissue Inhibitors MetalloProteinase</i>
<b>TLRs</b>	do inglês <i>Toll-like receptors</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral- $\alpha$ , do inglês <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>VCAMs</b>	Moléculas de adesão
<b>VEGF</b>	<i>Fator de crescimento para endotélio vascular, do inglês Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>Ym1/Chi3I3</b>	do inglês, <i>Chitinase 3-like Protein 3</i>

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	18
1.1 O câncer .....	18
1.1.2 Macrófagos associados a tumores .....	23
1.1.3 Modulação do microambiente tumoral .....	26
1.2 A espécie <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> .....	27
1.2.1 Atividades biológicas e farmacológicas do látex de <i>V. cundinamarcensis</i> .....	29
1.2.2 Proteases na oncologia e as atividades antitumoral/antimetastática de proteases de <i>V. cundinamarcensis</i> .....	30
2 JUSTIFICATIVA .....	33
3 OBJETIVOS .....	34
3.1 Objetivo geral .....	34
3.2 Objetivos específicos .....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Materiais .....	35
4.1.1 Biológicos .....	35
4.1.2 Reagentes e Solventes.....	35
4.1.3 Principais soluções .....	37
4.1.3.1 Cultivo celular.....	37
4.1.3.2 Experimentos com animais .....	39
4.1.3.3 Solução para avaliação de morte celular, por citometria de fluxo .....	39
4.1.3.4 Soluções para quantificação de nitrito, pelo método de Griess.....	39
4.1.3.5 Soluções para quantificação de citocinas, pelo método de ELISA.....	40
4.1.3.6 Soluções para determinação da atividade de metaloproteinases, pelo método de Zimografia .....	41
4.1.3.7 Soluções para eletroforese e Western Blotting .....	42
4.1.3.8 Soluções para a determinação da atividade de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG), método colorimétrico.....	44
4.1.4 Kits, anticorpos e citocinas .....	46
4.1.5 Equipamentos.....	47
4.1.6 Diversos.....	48
4.1.7 Programas computacionais .....	49
4.2 Métodos .....	50

4.2.1 Cultivo da linhagem 4T1 .....	50
4.2.2 Obtenção de macrófagos peritoneais .....	50
4.2.3 Teste do MTT .....	51
4.2.4 Co-culturas e avaliação da atividade tumoricida de macrófagos peritoneais .....	51
4.2.5 Co-culturas em trans-wells e avaliação de morte celular na linhagem 4T1	52
4.2.6 Quantificação de nitrito e de espécies reativas de oxigênio .....	52
4.2.7 Estimativa da concentração protéica – Método de Bradford.....	53
4.2.8 Zimografia .....	54
4.2.9 Western Blotting.....	55
4.2.10 Inóculo tumoral e tratamento com a sub-fração CMS2.....	56
4.2.11 Dosagem de citocinas.....	57
4.2.12 Quantificação da atividade de NAG .....	58
4.2.13 Reação em cadeia da polimerase em tempo real - qPCR.....	58
4.2.14 Obtenção do meio condicionado da linhagem L929 .....	61
4.2.15 Obtenção de células da medula e diferenciação em macrófagos.....	62
4.2.16 Inóculo do modelo tumoral 4T1/M2 e tratamento dos animais com a sub-fração CMS2.....	62
4.3 Análises Estatísticas .....	63
5. RESULTADOS .....	64
5.1 CMS2 induz a capacidade tumoricida de macrófagos peritoneais.....	64
5.3 Atividade tumoricida de macrófagos promovida por mediadores solúveis.....	69
5.3 Sinalização intracelular ativada em macrófagos pela sub-fração CMS2.....	77
5.4 Atividade antitumoral/antimetastática de CMS2 sobre modelo de carcinoma de mama 4T1 .....	80
5.5 Modulação por CMS2 de mediadores presentes no microambiente tumoral...	82
5.6 Efeito da sub-fração CMS2 sobre a expressão de genes envolvidos na caracterização fenotípica de macrófagos.....	86
5.7 Atividade antitumoral de CMS2 em modelo de carcinoma 4T1/M2.....	88
6. DISCUSSÃO .....	90
6.1 Ativação <i>in vitro</i> de macrófagos pelas sub-frações CMS1 e CMS2. ....	90
6.2 Mediadores tumorocidas induzidos em macrófagos por CMS1 e CMS2 .....	92
6.3 Vias macrofágicas intracelulares ativadas por CMS2 .....	95

6.4 Atividade antitumoral/antimetastática e modulação do microambiente tumoral .....	99
6.5 Modulação de macrófagos associados a tumores .....	102
7 CONCLUSÃO .....	106
REFERÊNCIAS .....	107
APÊNDICE A – Determinação da viabilidade de macrófagos e células 4T1 após tratamento com CMS1 e CMS2 .....	123
APÊNDICE B – Curvas D.O. <i>versus</i> número de macrófagos .....	124
APÊNDICE C – Padronização do modelo de carcinoma de mama 4T1 .....	125
APÊNDICE D – Avaliação de MMP-9 e NAG em carcinomas 4T1 após 15 dias de desenvolvimento tumoral .....	126
APÊNDICE E – Avaliação da expressão de FIZZ-1 e Ym-1 em macrófagos.....	127
ANEXO A – Protocolo de aprovação para o uso de animais experimentais .....	128
ANEXO B – Perfis cromatográficos de isolamento das proteases de V.....	129

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O câncer

Câncer é o nome dado a um grupo de mais de 100 doenças, que são resultado de um crescimento desordenado de clones celulares, que invadem tecidos e órgãos, podendo atingir e acometer diferentes regiões do corpo (metástase) (INCA, 2013). Evidências indicam que a tumorigênese em humanos é um processo multifatorial, caracterizado como um reflexo de alterações genéticas (mutações) que levam a progressivas transformações de células normais em células de alta malignidade (HANAHAN & WEINBERG, 2011). O conceito mais amplamente aceito baseia-se na idéia que o câncer seja uma doença prevenível, ou seja, apenas 5 a 10% de todos os casos de câncer surgem devido a heranças de genes alterados ou por mutações somáticas. Na maioria dos casos, 90 a 95%, o aparecimento do tumor está associado ao estilo de vida e a exposição a fatores ambientais com potencial carcinogênico (AGGARWAL *et al.*, 2009). As mutações genéticas e/ou as mutações causadas pela exposição ao tabagismo; etilismo; sedentarismo; alimentação e obesidade culminam na ativação de proto-oncogenes (p.e: Ras ou Myc) ou na inativação de genes supressores de tumores (p.e.: p53 ou Rb) (AGGARWAL *et al.*, 2009; HANAHAN & WEINBERG, 2011). Tais mutações originam um vasto catálogo genotípico de células tumorais, resultante de seis alterações fundamentais da fisiologia celular: a proliferação auto-suficiente; insensibilidade a sinais anti-proliferativos; evasão ao processo de apoptose; potencial de replicação ilimitado; manutenção da angiogênese, da invasão e metástase, que em conjunto caracterizam o crescimento maligno (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Funcionalmente, o desenvolvimento de tumores pode ser dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão tumoral. A fase de iniciação leva a mudanças celulares irreversíveis e, como citado acima, é caracterizada por mudanças genéticas como mutações pontuais, deleções e/ou ampliações gênicas, e rearranjos cromossômicos. Proteínas como ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas participam da regulação do ciclo celular e realizam suas ações principalmente nas transições de fases durante as quais genes como p53 no caso de alguma anormalidade celular desencadeiam o processo de apoptose. Contudo, anormalidades nos genes de transcrição para proteínas regulatórias alteram o ciclo

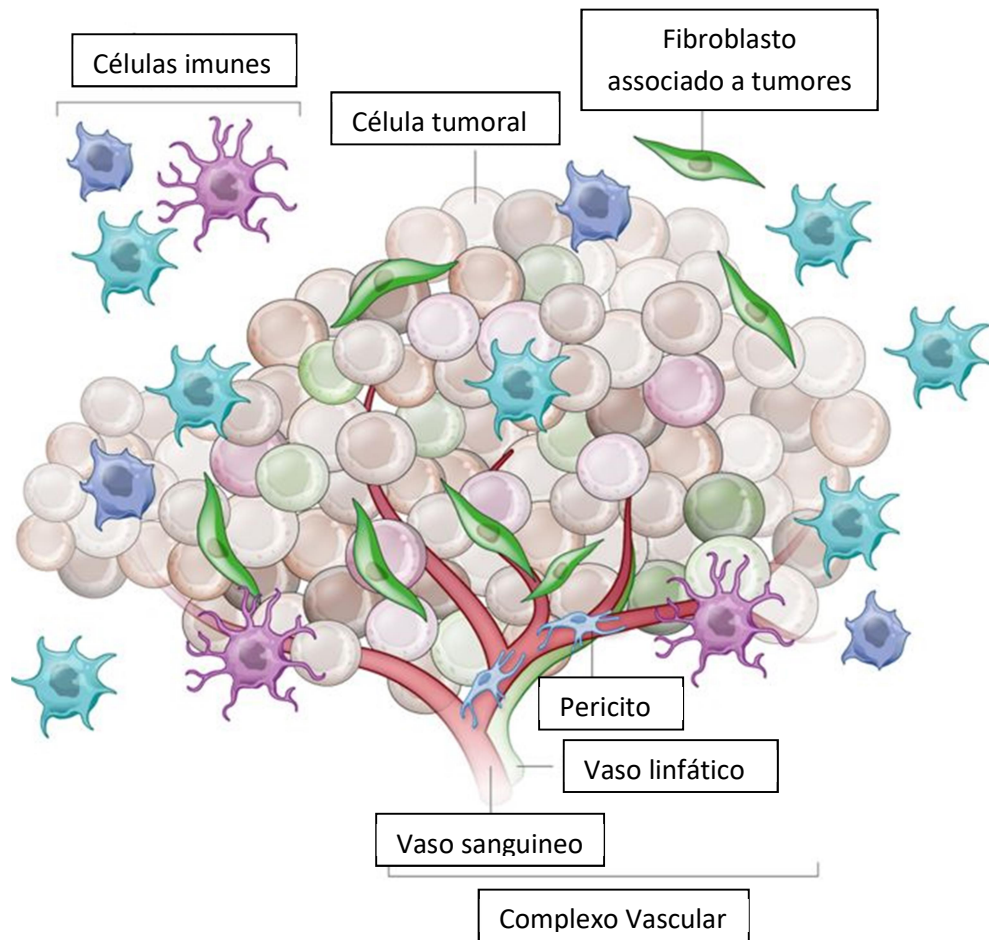
e permitem que células modificadas escapem ao processo de apoptose (GUIMARÃES & LINDEN, 2004; RIVLIN *et al.*, 2011).

A fase de promoção tumoral se caracteriza pela sobrevivência e a expansão clonal de células iniciadas. Com a expansão do tumor surge o aumento da distância de difusão do oxigênio e de nutrientes para algumas áreas tumorais. A diminuição de níveis de oxigênio nos tecidos, fenômeno denominado de hipóxia, ativa o fator heterodimérico induzível pela mesma (HIF do inglês, *Hipóxia inducible factor*) que leva a transcrição de genes que conjuntamente com outras proteínas, como a angiopoetina-2 e o fator de crescimento para endotélio vascular (VEGF do inglês, *vascular endothelial growth factor*) estimulam a formação de novos vasos. A angiogênese, ou processo de formação de novos vasos, é um processo complexo, essencial para o crescimento da massa tumoral, ao passo que garante a oxigenação e o suprimento nutricional desse tecido. Para que o processo de angiogênese aconteça são necessários sinais tumorais promotores da proliferação e da migração de células endoteliais, assim como, sinais para a diferenciação destas em capilares funcionais (BRAHIMI & POUYSSÉGUR, 2006; RAJABI & MOUSA, 2017).

Simultaneamente aos eventos angiogênicos, outros de degradação e de remodelamento da matriz extracelular (MEC) devem ocorrer, para que o tumor e a rede vascular progridam, o que resulta na invasão de tecidos adjacentes e distantes (metástase) caracterizando, assim, a etapa de progressão tumoral (RAKOFF-NAHOUM, 2006; SEYFRIED & HUYSENTRUYT, 2013). Os processos citados acima são promovidos pela ação de proteases endógenas produzidas, também, por células tumorais (GILLES *et al.*, 2013). Existe uma grande variedade dessas enzimas, são elas as metalo, aspártico, cisteíno e serino proteases. Metaloproteinases (MMPs do inglês, *matrix metalloproteinases*) são ativadas em pH ácido (entre 3,5 e 5,5) e, portanto, em ambientes de hipóxia como o tumoral se encontram ativadas (KESSENBROCK *et al.*, 2010). MMPs promovem a proteólise pericelular de componentes da membrana basal, e de outros substratos (LOFFEK *et al.*, 2011), e assim, facilitam a migração e invasão de células transformadas (GILLES *et al.*, 2013).

Atualmente, sabe-se que as propriedades autonômicas de células tumorais são necessárias, porém, não são fatores que por si só promovem a tumorigênese.

Estudos realizados nos últimos 20 anos solidificam o conceito de “semente e solo” proposto por Steven Paget na década de 80. Sendo assim, o desenvolvimento tumoral e de malignidade é resultado de um processo que envolve a presença de células transformadas (semente) e de células não-transformadas que serão o “solo fértil” no qual as “sementes” irão germinar (JUNTTILA & de SAUVAGE, 2013; TSAI *et al.*, 2014).



**ILUSTRAÇÃO 1: A origem e a influência da heterogeneidade do microambiente para o desenvolvimento de tumores.** A formação tumoral envolve a co-evolução de células neoplásicas, estromais e imunes, juntamente com a matriz extracelular e o endotélio-vascular (adaptada de JUNTTILA & de SAUVAGE, 2013).

O conceito de heterocelularidade tumoral baseia-se no fato de que o tumor é composto por células transformadas e por outras, como células endoteliais; musculares lisas; fibroblastos e células pertencentes ao sistema imune, que co-evoluem e alteram a matriz extracelular que os rodeia dando origem ao microambiente tumoral que nada mais é que o “solo fértil” mencionado por Steven

Paget. Consequentemente, será ele, o microambiente tumoral capaz ou não de favorecer o desenvolvimento de tumores ao interferir de forma a promover ou inibir os diferentes processos de malignidade tumoral (JUNTTILA & de SAUVAGE, 2013; TSAI *et al.*, 2014).

### 1.1.1 Câncer e o microambiente tumoral inflamatório

Virchow, em 1863, foi quem primeiramente descreveu a presença de leucócitos em tumores humanos instigado, na época, pelo surgimento de massas tumorais em locais previamente inflamados (TRINCHIERI, 2012).

Atualmente, sabe-se que na presença do tumor citocinas e fatores quimiotáticos, semelhantes aos produzidos em processos inflamatórios fisiológicos, sejam responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para tecidos transformados (MUNN, 2017). Contudo, durante a progressão neoplásica os controles normais que regulam a inflamação estão violados, sendo que, o tumor cria um ambiente propício para o seu desenvolvimento o qual na ausência de uma intervenção terapêutica, raramente, irá regredir (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010). Dessa forma, leucócitos, citocinas e quimiocinas presentes no microambiente tumoral são capazes de modular as interações entre células tumorais e estromais. As funções dos leucócitos e de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, no contexto tumoral serão descritas a seguir e, assim, fornecerão evidências das atividades destes elementos sobre o desenvolvimento e a progressão tumoral.

Estudos em animais confirmam que citocinas desempenham um papel fundamental na associação entre a inflamação crônica e carcinogênese. Nesse sentido, várias citocinas são descritas como sendo fatores de crescimento para células pré-maligna, ao impedirem a apoptose e induzirem a sobrevivência e a proliferação dessas células, além de serem capazes de promover a angiogênese; a invasão e a formação de metástases. Em adição, alguns oncogenes ativados em células tumorais (p.e.: Ras, Myc), podem promover a proliferação celular autonômica e induzir a transcrição de programas sinalizadores que promoverão o remodelamento do microambiente tumoral. O remodelamento do microambiente ocorre, em parte, devido à expressão de citocinas e quimiocinas que culminam no recrutamento de



leucócitos, e que em conjunto favorecem o crescimento do tumor (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010; HANAHAN & WEINBERG, 2011; TSAI *et al.*, 2014).

Sobretudo, quimiocinas classicamente denominadas como “inflamatórias” possuem papel em vários aspectos do processo de malignidade. Tais mediadores fornecem estímulo direcionado para a migração de leucócitos, também, para tumores em desenvolvimento. Células tumorais e estromais ativadas secretam citocinas e quimiocinas inflamatórias, como por exemplo, VEGF; interleucina-6 (IL-6); interleucina-8 (CXCL8/IL-8); interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); proteína quimioatraente para monócitos (CCL2/MCP-1 do inglês, *monocyte chemoattractant protein*) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$  do inglês, *tumor necrosis factor- $\alpha$* ) que agem tanto diretamente quanto indiretamente, na estimulação do endotélio vascular e no recrutamento de leucócitos para o tecido tumoral. Nesse sentido, tem-se como resultado um infiltrado tumoral inflamatório que é composto por células do sistema imune inato, incluindo macrófagos; neutrófilos; mastócitos; células dendríticas e células “Natural Killer” (NK), e do sistema adaptativo como linfócitos T e B. Sendo linfócitos e macrófagos as células imunes mais freqüentemente encontradas (BEN-BARUCH, 2002; DE VISSER *et al.*, 2006; LIN & KARIN, 2007; JUNTILA & de SAUVAGE, 2013; TSAI *et al.*, 2014).

De acordo com o conceito de imunoedição, células neoplásicas editam o seu repertório de antígenos e, com isso, modulam a resposta anti-tumoral do hospedeiro. Por outro lado, a resposta imune gerada pelo organismo molda a imunogenicidade tumoral e, com isso, ocorre a seleção de novos clones celulares. O balanço entre a resposta imune anti- e pró-tumorigênica pode se tornar a favor do crescimento tumoral, ou seja, ocorre a evasão do tumor à ação do sistema imune e, assim, a massa neoplásica se forma. Posteriormente, pode ocorrer um equilíbrio entre o crescimento tumoral e a destruição de células neoplásicas, fato que levaria o tumor a um estado estacionário ou de dormência. Apesar disso, acredita-se que células tumorais possam editar o seu repertório de antígenos para os de mais baixa imunogenicidade e, assim, inclinar novamente o equilíbrio a seu favor. Sabe-se que as respostas anti- e pró-tumorigênicas coexistem nas diferentes fases do desenvolvimento neoplásico, e que vários estudos levam a crer que são as condições do microambiente que ditam o equilíbrio entre elas (GRIVENNIKOV *et al.*,

2010; HANAHAN & COUSSENS, 2012; TSAI et al., 2014; PALUCKA & COUSSENS, 2016).

### 1.1.2 Macrófagos associados a tumores

Macrófagos são componentes do sistema reticuloendotelial, na sua maioria tem origem mielóide, e pertencem a primeira linha de defesa imune de mamíferos (KUMAR & MENON, 2013). São células plásticas e versáteis encontradas em praticamente todos os tecidos de um mamífero adulto e apresentam papéis importantes no desenvolvimento, homeostase, inflamação, reparação tecidual e em respostas imunes (WYNN et al., 2013). Tais células respondem a sinais do microambiente, no qual se encontram, de forma a sofrer polarizações funcionais e genéticas dando origem a dois extremos de polarização (KURAHARA et al., 2011; LIU & CAO, 2014). Assim, devido a sua plasticidade genética, macrófagos podem ser classificados fenotipicamente como M1, ou classicamente ativados ( $M\phi$ -Ca), e M2, ou alternativamente ativados ( $M\phi$ -AA).

Macrófagos do tipo M1 desenvolvem esse fenótipo quando na presença de IFN- $\gamma$  ou de produtos bacterianos (LPS- lipopolissacarídeos), assim passam a expressar altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23), moléculas pertencentes ao complexo de histocompatibilidade (MHC- *major histocompatibility complex*) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS); e por isso, são capazes de eliminar patógenos e células tumorais, e de promover resposta imune anti-tumoral (MURRAY et al., 2014). Em geral, macrófagos apresentam atividade tumoricida apenas após ativação. Uma vez ativados, a citotoxicidade direta ou indireta podem ser exercidas, sendo que a última consiste na secreção, por outros tipos celulares, de mediadores que estimulam a atividade anti-tumoral. A citotoxicidade direta pode ser ainda, subdividida em citotoxicidade tumoral macrófago-mediada (*macrophage-mediated tumour cytotoxicity* - MTC) e citotoxicidade celular anticorpo-dependente (antibody-dependent cellular cytotoxicity – ADCC). MTC envolve a liberação de fatores de lise por macrófagos, que resulta na morte de células neoplásicas (BINGLE et al., 2002). Esse processo se caracteriza como lento, o qual pode se estender por até 3 dias, e inclui a secreção de fatores tóxicos como o TNF- $\alpha$  (URBAN et al., 1986), acrescido de IL-1 $\beta$ , IL-6 (CHORIKI et al., 1989), serino-proteases, RNI (p.e.: óxido nítrico) e ROS (HIBBS et al., 1988; KELLER et al., 1990). ADCC é um processo dependente

da presença de anticorpos ligados a células tumorais e, assim, da expressão de antígenos de superfície classificados como não-próprios ou aberrantes. Esse mecanismo de morte, embora rápido, é semelhante ao MTC ((BINGLE *et al.*, 2002).

No outro extremo de polarização, encontram-se os macrófagos do tipo M2 que são canonicamente induzidos, *in vitro*, pela exposição a IL-4, IL-10 e/ou IL-13. Expressam baixos níveis do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II do inglês, *major histocompatibility complex*), de IL-12; de ROS e RNI, com isso não possuem atividade citotóxica e são incapazes de apresentar antígenos. Em contrapartida produzem altos níveis de citocinas anti-inflamatórias e/ou imunossupressivas como IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ . Além disso, expressam receptores “scavengers” e para manose (MRs), o que os torna capazes de eliminar debris; secretam fatores de crescimento, produtos da via da arginase (ornitina e poliaminas), que possuem atividade estimuladora sobre a proliferação celular, e MMPs enzimas que favorecem a angiogênese e promovem o remodelamento tecidual (BINGLE *et al.*, 2002; LUO *et al.*, 2006; SICA *et al.*, 2008; BISWAS & MANTOVANI, 2010; LIU & CAO, 2014; RHEE *et al.*, 2016). Assim, macrófagos-M2 apresentam atividade anti-inflamatória, habilidades para induzir resposta imune do tipo Th2 e a diferenciação de linfócitos T regulatórios (Treg) (JUHAS *et al.*, 2015).

Marcadores macrofágicos como a expressão das proteínas FIZZ-1 (do inglês, *Found in Inflammatory Zone-1*), Ym-1 e Ym-2 são, também, utilizados para identificação do fenótipo M2 (SANSON *et al.*, 2013). Fizz-1, também conhecida como fator mitogênico induzido por hipóxia, tem sua expressão suprimida na presença de IFN- $\gamma$  (RAES *et al.*, 2002). Ym-1 ou “*chitinase-like molecule*”, proteína que tem afinidade por carboidratos e por componentes da matriz extracelular, tais como glicosaminoglicanos e sulfato de heparan, propriedades importantes para as atividades de remodelamento e cicatrização teciduais exercidas por macrófagos-M2 (ROSZER, 2015).

Estudos mais detalhados sobre as características adotadas por macrófagos em diferentes contextos levaram a identificação de três sub-classes celulares de M2. Macrófagos M2a ou “*wound healing*” são induzidos por IL-4 e/ou IL-13. A estimulação com imunocomplexos somada à ativação de TLRs leva ao

desenvolvimento do fenótipo M2b. Contudo, macrófagos quando expostos a estímulos anti-inflamatórios como glicocorticóides, IL-10 ou TGF- $\beta$  se diferenciam na sub-população de macrófagos regulatórios ou ditos M2c (CASSETTA *et al.*, 2011; MANTOVANI *et al.*, 2013; RHEE, 2016).

No contexto tumoral, macrófagos residentes ou monócitos localizados na circulação periférica são estimulados e atraídos por citocinas derivadas do tecido transformado. Durante a infiltração por esse tecido, macrófagos são expostos a um gradiente de mediadores e de sinais advindos da perturbação da matriz extracelular que irão modular a atividade macrofágica. Apesar de macrófagos atuarem na primeira linha de defesa imune, vários estudos mostram que na maior parte dos pacientes esse tipo celular parece fazer pouco para a montagem de uma resposta antitumoral eficaz (RHEE, 2016). Em resumo, isto ocorre por que muitos fatores produzidos por células tumorais, incluindo IL-4; -6 e -10, fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$  do inglês, *transforming growth factor- $\beta$* ), prostaglandinas (PGs) e factor estimulante de colônia para macrófagos (M-CSF, do inglês *Macrophage colony-stimulating factor*) reduzem de forma incisiva a atividade citotóxica de macrófagos e a atividade estimuladora desses sobre linfócitos bloqueando, assim, o sistema de defesa imune do portador de câncer (MANTOVANI *et al.*, 2008; HANAHAN & COUSSENS, 2012; PALUCKA & COUSSENS, 2016).

Tais mediadores derivados de células tumorais são capazes de redirecionar a atividade de macrófagos para que estes promovam direta ou indiretamente o crescimento e a sobrevivência do tumor. Denominados de TAMs (do inglês, *Tumor Associated-Macrophages*), quando no ambiente tumoral, macrófagos são capazes de promover a subversão da imunidade inata e adaptativa, contribuindo ativamente para a imunossupressão no tecido tumoral. Em adição, a expressão de antígenos tumorais com baixa imunogenicidade juntamente com a presença de hipóxia e de inflamação crônica são fatores que imprimem características supressivas ao tecido tumoral e dificultam a atividade tumoricida de TAMs, dando origem a um microambiente que favorece o estabelecimento do fenótipo semelhante ao M2, ou “M2-like” (MANTOVANI *et al.*, 2013; RHEE, 2016).

Uma caracterização fenotípica que englobe todos os TAMs ainda deve surgir, contudo, sabe-se que estes apresentam algumas características de macrófagos regulatórios, incluindo níveis elevados de IL-10 e baixos, ou ausentes, de IL-12. Em adição, TAMs são deficientes na produção de TNF- $\alpha$  e na atividade apresentadora de antígenos características de macrófagos "*wound-healing*". Portanto, TAMs seriam caracterizados como macrófagos pertencentes a um fenótipo intermediário entre os dois sub-tipos de M2 citados acima (MOSSER & EDWARDS, 2008; FUKUDA *et al.*, 2012; RHEE, 2016). Sendo assim, TAMs seriam fontes importantes de mediadores advindos do estroma capazes de ativar em células neoplásicas genes promotores tumorais. Além disso, a íntima relação de macrófagos com diferentes etapas do desenvolvimento tumoral os torna capazes de promover o remodelamento tissular, a angiogênese e a formação metastática (CHEN *et al.*, 2003; LEWIS & POLLARD, 2006; MANTOVANI *et al.*, 2008; MANTOVANI *et al.*, 2013).

### 1.1.3 Modulação do microambiente tumoral

Com base no conhecimento de como os tumores são formados, diferentes tratamentos de combate ao câncer têm sido propostos. Contudo, esses por muitas décadas se limitaram a remoção cirúrgica, radiação, quimioterapia, hormonoterapia e imunoterapia, que são utilizados de forma isolada ou em associações. O tratamento quimioterápico constitui um enorme desafio para a medicina moderna visto que, geralmente, atua no processo de divisão celular de forma não seletiva ou que visa de maneira exclusiva as células tumorais. A classe de fármacos mais utilizada é a dos agentes citotóxicos (alquilantes, antimetabólicos e antibióticos) que atuam de forma a interromper a divisão celular e desencadear o processo de apoptose (KASIBHATLA *et al.*, 2004). Os efeitos adversos associados ao uso da quimioterapia citotóxica ocorrem devido à destruição de células saudáveis que estejam em mitose, e incluem: toxicidade hematológica, gastrointestinal e cardíaca, além de toxicidade hepática, pulmonar, neurológica, vesical/renal e dermatológica; alterações metabólicas e reações alérgicas e anafilaxia (ARAÚJO *et al.*, 2006).

Apesar da atual utilização de quimioterápicos citotóxicos para o tratamento do câncer existem poucos relatos da remissão de tumores sólidos a partir do uso exclusivo destes fármacos. Uma hipótese para esta ineficácia seria o ritmo acelerado das divisões celulares que apresentam como subprodutos a instabilidade

gênica, com surgimento de mutações constantes, além da própria heterogeneidade/celularidade tumoral. Devido ao baixo índice de cura e a tantas outras limitações atribuídas ao uso de quimioterápicos, os elementos pertencentes ao estroma tumoral como células não-transformadas, leucócitos; e o processo inflamatório em si representam alvos alternativos para barrar o crescimento neoplásico. Atualmente a idéia consiste na modulação ou no combate seletivo de elementos pertencentes ao microambiente tumoral e, dessa forma, os tratamentos quimioterápicos poderiam ser utilizados em menores doses, gerando menor toxicidade, e com uma chance maior de sucesso na terapia de tumores resistentes ao tratamento tradicional (HANNA *et. al*, 2009; JUNTTILA & de SAUVAGE, 2013; TSAI *et. al*, 2014; YANG & ZHANG, 2017).

Hanna e colaboradores (2009) descrevem as células imunes como alvos de grande interesse para o desenvolvimento de terapias de combate ao câncer. De acordo com esses autores, a inabilidade da vigilância imune em controlar processos neoplásicos é um importante alvo de pesquisas para a descoberta de caminhos que elevem a imunidade natural do hospedeiro a ponto dessa ser capaz de promover o combate a células tumorais e, assim, barrar a progressão tumoral.

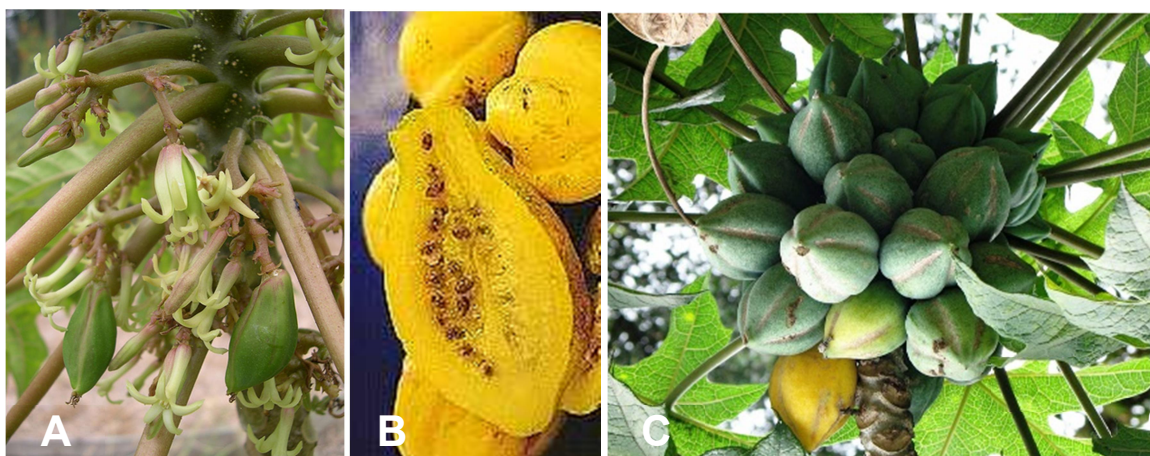
Nesse sentido, a modulação de TAMs tem sido alvo de interesse para o desenvolvimento de terapias antitumorais que sejam modificadoras da resposta biológica em seus diferentes níveis, atuando assim na quimiotaxia; na diferenciação e/ou na ativação de macrófagos, e que seriam utilizadas em associação com regimes de tratamentos citotóxicos (HEUSINKVELD & BURG, 2011; JUNTTILA & de SAUVAGE, 2013; YANG & ZHANG, 2017).

## **1.2 A espécie *Vasconcellea cundinamarcensis***

Atualmente, a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural, ou são desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Dessa forma, plantas; fungos; insetos; organismos marinhos e bactérias constituem fontes importantes de substâncias biologicamente ativas (BARREIRO & BOLZANI, 2009). Neste sentido, a caracterização bioquímica e farmacológica de frações obtidas do látex da espécie *Vasconcellea cundinamarcensis* tem sido realizada pelo nosso grupo de pesquisa nos Laboratórios de Substâncias Antitumorais do Departamento de

Farmacologia e de Biologia Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ambos do ICB, UFMG.

A espécie de mamoeiro, denominada até 2002 como *Carica candamarcensis*, trata-se de uma planta nativa da costa oeste da América do Sul que pode ser encontrada do Panamá até o Chile em altitudes superiores a 1.000 metros (região Andina) (WALRAEVENS *et al.*, 1999). Partes da planta estão ilustradas abaixo (Ilustração 2). *Vasconcellea cundinamarcensis* se apresenta como planta de tronco largo, geralmente ramificado, que atinge comprimento máximo de 10 m. Na parte terminal do tronco, ou nas extremidades de suas ramificações, possui uma coroa compacta de folhas. O fruto elipsóide possui cinco depressões largas e longitudinais, mede de 5 a 15 cm de comprimento sendo amarelo quando maduro (Ilustração 2B), e sua polpa se apresenta delgada, aquosa, aromática e comestível somente após o cozimento (LEON, 1987).



**ILUSTRAÇÃO 2:** *Vasconcellea cundinamarcensis*. A – Inflorescências; B – Fruto maduro; C – Frutos imaturos. Fontes: ecocrop.fao.org e fruitipedia.com - acesso em: 21/07/2017

O látex extraído dos frutos imaturos de *V. cundinamarcensis* é rico em cisteíno proteases de alta atividade proteolítica, além de possuir em sua composição carboidratos, vitaminas, sais minerais e peptídeos de baixo peso molecular (BAEZA *et al.*, 1990; BRAVO *et al.*, 1994). A partir da separação cromatográfica do látex em coluna Sephadex G10, são obtidos 2 picos, denominados P1G10 e P2G10, ambos ricos em cisteíno proteases. No entanto, a atividade proteolítica é mais pronunciada na fração P1G10 (BRAVO *et al.*, 1994; GRAVINA *et al.*, 1995).

### 1.2.1 Atividades biológicas e farmacológicas do látex de *V. cundinamarcensis*

Inicialmente, foi descrita a atividade mitogênica, *in vitro*, de frações provenientes da separação cromatográfica de P1G10 (cromatografia de troca iônica) (GOMES *et al.*, 2005). Posteriormente, estudos *in vivo* demonstraram uma interessante capacidade angiogênica (MELLO *et al.*, 2006) e cicatrizante de P1G10 em modelos murinos de dermoabrasão (MELLO *et al.*, 2006), de queimadura (GOMES *et al.*, 2010) e de lesões excisionais (FREITAS, 2010) atividades que se mostram como dose dependentes. A atividade cicatrizante pode então ser justificada pelas capacidades mitogênica e angiogênica observadas, além da atividade proteolítica que supostamente contribuiria para o debridamento da lesão (MELLO *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2010). Estudos subsequentes evidenciaram as atividades protetora e cicatrizante da fração em modelos de úlceras gástricas agudas, induzidas pela indometacina, e crônicas, induzidas pelo ácido acético (MELLO *et al.*, 2008; ARAUJO e SILVA *et al.*, 2015). Adicionalmente às atividades descritas, o tratamento de animais com P1G10 mostrou ser capaz de modular o processo inflamatório induzido por carragenina, ao reduzir o edema de pata nas doses de 5; 10 e 20 mg/kg, comparável ou superior a de indometacina (2 mg/kg), e inibir o recrutamento leucocitário peritoneal, em níveis semelhantes ao observado para dexametasona (0,5 mg/kg) (CHRISTIANO, 2008).

Posteriormente, estudos farmacocinéticos utilizando a dose de 1 mg/kg por vias endovenosa (e.v.), subcutânea (s.c.) ou oral (p.o.) foram realizados com P1G10-tecnécio marcada (99mTc). As maiores relações de áreas sob a curva (ASC) entre órgãos e sangue (coeficiente de partição – kp) após administração por vias e.v. e s.c., foram observadas nos órgãos relacionados à eliminação de fármacos, como rins e bexiga. Essa observação corrobora os altos valores da constante de eliminação ( $k_{el} = 0,22\%$  dose/mL/h), do volume de distribuição aparente ( $V_d = 0,082$  mg x mL/% dose x kg) e do clearance total ( $Cl_t = 0,092$  mg x mL/% dose x h x kg), bem como o valor de meia-vida ( $T_{1/2} = 190$  min). Por via s.c. a biodisponibilidade foi de aproximadamente 100%. Já para a via p.o., as maiores taxas de kp foram encontradas nos órgãos do trato gastrointestinal, corroborando a baixa biodisponibilidade por essa via (8,3%) (LEMOS *et al.*, 2016). Trabalhos pré-clínicos de toxicologia aguda em ratos foram realizados e foi possível demonstrar que, para



as vias intraperitoneais (*i.p.*) e *s.c.* apenas altas doses (acima de 50 mg/kg) causaram morte dos animais em cerca de 30 minutos (LEMOS *et al.*, 2016). Em estudos toxicológicos subcrônicos em ratos, utilizando administração oral, só se observou o aparecimento de sinais tóxicos para a dose de 300 mg/kg (SALAS *et al.*, 2010). Esses resultados demonstram a baixa toxicidade de P1G10 por via sistêmica, permitindo a execução de estudos pré-clínicos e clínicos com segurança. Nesse sentido, estudos clínicos de fase I para a atividade cicatrizante já foram conduzidos e revelaram a inocuidade da fração quando utilizada em peles íntegras de voluntários sadios (GOMES, 2009). Os estudos de fase clínica II estão sendo realizados e visam avaliar a eficácia cicatrizante da fração em pacientes portadores de lesões cutâneas.

### *1.2.2 Proteases na oncologia e as atividades antitumoral/antimetastática de proteases de V. cundinamarcensis*

Estudos clínicos sobre a utilização de proteases na Oncologia vêm sendo realizados e aprovam a utilização de tais enzimas como fármaco principal ou adjuvante nessa modalidade terapêutica. Misturas contendo papaína (protease advinda de *Carica papaya*), tripsina e quimiotripsina apresentam eficácia clínica atuando como supressores da disseminação metastática e melhoraram a qualidade de vida dos pacientes ao aliviar efeitos adversos gerados por tratamentos convencionais (LEIPNER & SALLER, 2000). O tratamento de animais com bromelina, cisteína protease advinda de *Ananas comosus*, promove a remissão de tumores murinos como leucemia (P-388), sarcoma (S-37), carcinoma ascítico de Ehrlich e carcinoma pulmonar de Lewis (BÁEZ *et al.*, 2007). Uns dos primeiros trabalhos sobre a atividade imunológica de Bromelina, descreve sobre o tratamento oral de pacientes sadios e a elevada produção *in vitro* de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e ROS, por polimorfonucleares advindos dos mesmos (DESSER *et al.*, 1993; ZAVADOVA *et al.*, 1995). Em monócitos e linfócitos isolados de pacientes portadores de câncer de mama e tratados com Bromelina (*p.o.*), observa-se a estimulação da citotoxicidade, *in vitro*, dessas células sobre linhagens tumorais (ECKERT *et al.*, 1999). Posteriormente, outros trabalhos mostraram que tal protease pode exercer sua atividade antitumoral por interferir, também, no microambiente inflamatório ao modular a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) (KALRA *et al.*, 2008, BHUI *et al.*,

2009), de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e da migração de células inflamatórias para o estroma tumoral (CHOBOTOVA *et al.*, 2010).

Semelhantemente a essas proteases, as contidas na fração proteolítica P1G10 mostraram possuir efeito antitumoral e antimetastático em diferentes modelos animais. Na dose de 5 mg/kg, P1G10 reduziu em 89% e em 82% a massa tumoral e o número de metástases em modelo de melanomas murinos B16F1 (DITZ *et al.*, 2015) e B16F10 (DITZ, 2011), respectivamente. O efeito antitumoral/antimetastático da fração foi atribuído a uma ação inibidora sobre a angiogênese, ao reduzir a quantidade de hemoglobina e os níveis VEGF (DITZ *et al.*, 2015) e as atividades anti-coagulante/ trombolítica da fração (BILHEIRO *et al.*, 2013). Além disso, P1G10 foi capaz de inibir a adesão/migração, em componentes da matriz extracelular (MEC), e induzir a apoptose *in vitro* da linhagem B16F10, sendo a morte celular dependente da ativação de caspases (DITZ *et al.*, 2015). Sub-frações denominadas de CMS1 e CMS2, obtidas pela separação cromatográfica de P1G10 em coluna de troca iônica (CM-Sephadex C-25), são compostas respectivamente por 3 e 5 proteases, e foram avaliadas quanto a citotoxicidade de células normais e tumorais. Os resultados mostram que CMS2 é a sub-fração que possui citotoxicidade seletiva sobre células tumorais. Quanto às atividades sobre a formação de metástases em modelos murinos de melanoma (B16F10) e de cólon (CT26.WT) CMS2 foi capaz de inibir, em ambos modelos (75%), a formação de pontos metastáticos sendo que a sub-fração CMS1 não apresentou tal atividade (LOPES *et al.*, 2010). Dessa forma, CMS2 em experimentos *in vitro* manteve os efeitos anteriormente descritos para P1G10 sobre a adesão/migração celular e apoptose (DITZ, 2015). Estudos posteriores levam a crer que CMS2 seja capaz de promover a diferenciação de células de melanoma murino e, assim, reduzir a tumorigenicidade dessas células (LEMOS, 2014).

Já descrevemos, também, a atividade antitumoral de P1G10 sobre o modelo de carcinoma de Ehrlich tanto sólido (3 mg/kg) quanto ascítico (5 mg/kg), com redução de cerca de 68% e 40%, respectivamente, da massa tumoral e do número de células tumorais (VIANA, 2010). O efeito antitumoral da fração sobre o modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich esteve associado a uma possível estimulação do sistema imune, sendo observado um aumento dos leucócitos circulantes; redução do número de

células da medula, aumento da proliferação de linfócitos esplênicos, assim como, redução dos níveis de TGF- $\beta$  e de TNF- $\alpha$  no tumor (VIANA, 2010).

Utilizando o modelo de carcinoma de mama 4T1, modelo tumoral classificado como inflamatório (Dupré *et al.*, 2007), a fração P1G10 na dose 1 mg/kg reduziu em mais de 50% o peso dos tumores, efeito associado a redução da inflamação no microambiente tumoral (BRAGA *et al.*, 2013). Além disso, observou-se um aumento da atividade de TAMs pelo aumento na atividade intratumoral da enzima NAG (BRAGA *et al.*, 2013). Experimentos *in vitro* elucidaram, pelo menos em parte, os mecanismos pelos quais a fração estaria promovendo sua atividade antitumoral. P1G10 foi capaz de promover a atividade tumoricida de macrófagos sobre a linhagem 4T1, no qual se observou uma redução (de até 61%) do número de células tumorais em co-cultura (BRAGA *et al.*, 2013).

Acredita-se que o fenótipo de TAMs possa ser modulado por proteínas contidas na fração P1G10, e que de alguma forma essa modulação contribua para a atividade antitumoral/antimetastática da mesma. Contudo, ainda precisam ser realizados estudos acerca dos mecanismos pelos quais proteínas contidas em P1G10 estariam promovendo seus efeitos sobre macrófagos.

## 2 JUSTIFICATIVA

Como fonte direta, ou como base para síntese, produtos naturais correspondem ao total de 64% de todos os fármacos antitumorais atualmente utilizados (NEWMAN & CRAGG, 2012). Apesar disso, a estratégia terapêutica para tratamento do câncer consiste, em grande parte, no uso de substâncias citotóxicas para as células tumorais que, em geral, são tóxicas também para as células sadias do hospedeiro. Em estudos prévios foram demonstradas a caracterização bioquímica e atividades farmacológicas de frações do látex de *Vasconcellea cundinamarzensis*. As cisteíno-proteases de alta atividade proteolítica, contidas em uma dessas frações, P1G10, mostram atividade antitumoral e antimetastática em diferentes modelos murinos, em doses 10 vezes menores do que as que podem produzir algum efeito tóxico sobre o animal (LEMOS *et al.*, 2016). A atividade antitumoral de P1G10 sobre melanoma murino se mostrou mediada por efeito antiangiogênico e com menor relevância, pelo efeito citotóxico (DITZ *et al.*, 2013). P1G10 e sua sub-fração CMS2 promovem a inibição da adesão a MEC e, conseqüente, apoptose em células de melanoma murino metastático (DITZ, 2011). Em tumor ascítico de Ehrlich, verificamos que a atividade antitumoral de P1G10 está acompanhada do aumento de leucócitos circulantes (LOPES *et al.*, 2010) e da atividade proliferativa de linfócitos esplênicos (VIANA, 2010). Em relação à modulação da ativação de células inflamatórias promovida por proteases exógenas, está descrito que a ingestão de bromelina (proteases de *A. comosus*) foi capaz de induzir a atividade tumoricida de monócitos, advindos de pacientes portadores de câncer de mama (ECKERT *et al.*, 1999). Há vários anos é sabido que macrófagos associados a tumores (TAMs) representam alvo promissor no combate a doença ao contribuírem positivamente para o desenvolvimento e progressão tumoral (MANTOVANI *et al.*, 2008; YANG & ZHANG, 2017). Em modelo de tumor inflamatório de carcinoma de mama 4T1, observamos que a atividade antitumoral de P1G10 leva a redução da inflamação, da angiogênese e do aumento da atividade intratumoral de TAMs (BRAGA *et al.*, 2013). Nesse contexto, podemos sugerir que proteínas contidas em P1G10 possam promover sua atividade antitumoral/antimetastática, sem detrimento de outros mecanismos, incluindo os já descritos, pela modulação do fenótipo de TAMs.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar os mecanismos de sub-frações, obtidas do látex de *V. cundinamarcensis*, sobre a modulação do fenótipo de macrófagos que contribuiriam para a atividade antitumoral/antimetastática das mesmas.

#### 3.2 Objetivos específicos

a) Em ensaios *in vitro* avaliar os efeitos das sub-frações, CMS1 e CMS2, sobre:

- a capacidade tumoricida de macrófagos sobre a linhagem tumoral 4T1;
- a produção de marcadores tumoricidas (NO, ROS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) e/ou da ativação macrofágica (IL-12, CCL2/MCP-1), por macrófagos em cultura;
- a produção por macrófagos em cultura, de marcadores pró-angiogênicos e promotores da invasividade tumoral (VEGF, TGF- $\beta$  e MMP- 9);
- vias de sinalização macrofágica envolvidas na produção de fatores tumoricidas como PGs e via das MAPKs, Akt e NF- $\kappa$ B (Quantificação de proteínas COX-2, p-p38, p-JNK, p-Akt e p65).

b) Em animais portadores do carcinoma de mama 4T1, avaliar os efeitos da(s) sub-fração(ões), biologicamente ativa(s), sobre:

- o desenvolvimento de tumores e de metástases pulmonares;
- os níveis de citocinas intratumorais envolvidas na modulação fenotípica de TAMs (IL-12, IL-10 e TGF- $\beta$ );
- os níveis de citocinas pró-inflamatórias e angiogênicas (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL2/MCP-1 e VEGF) e a atividade de MMPs presente no tecido tumoral;
- a atividade de macrófagos intratumorais (atividade de NAG);
- o fenótipo de TAMs (expressão de genes para MR, FIZZ-1 e Ym-1).

c) Em animais inoculados concomitantemente com células tumorais 4T1 e M $\phi$ -M2 (carcinoma 4T1/M2) demonstrar a importância da modulação macrofágica para a atividade antitumoral da(s) sub-fração(ões) ativa(s).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 *Biológicos*

- Camundongos BALB/c fêmeas entre 8 e 10 semanas– adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO/ICB/UFMG) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
- Linhagem celular de adenocarcinoma de mama 4T1- adquirida da Coleção Americana de Tipos Celulares- American Type Culture Collection (ATCC).
- Linhagem celular de fibroblastos L929- adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ).
- Látex exsudado de frutos imaturos de *Vasconcellea cundinamarcesis* originários do Chile, fornecidos pelo Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais (ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com as normas e regulamentos da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo de autorização nº 219/2012 (Anexo A).

#### 4.1.2 *Reagentes e Solventes*

Ácido acético glacial P.A., Ácido etilenodiaminotetra-acético - sal dissódico (EDTA), ácido clorídrico (HCl), álcool etílico absoluto, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato monobásico de potássio, fosfato monobásico e dibásico de sódio, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio - **Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, São Paulo, Brasil.**

Ácido Cítrico Monohidratado – **Grupo Química, Rio de Janeiro, Brasil.**

Álcool Metílico – **Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil.**

Ampicilina sódica, Anfotericina B, Aprotinina, brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol2-ila)-2,5-difeniltetrazólio ou sal de tetrazólio (MTT), BSA (Bovine serum albumin – albumina bovina fração V em pó), CHAPS 3 - [(3-colamidopropil) dimetilamônio] -1-propanossulfonato hidrato, Dimetil sulfóxido (DMSO), Deoxicolato de sódio, Estreptomicina, HEPES (ácido N-(2-hridoxietil)-piperazino-N'-etaneusulfônico), Histopaque 1083, NP-40, Iodeto de propídeo, Naftiletlenodiamino Dihidroclorídrico (NEED), O-fenilenodiamina (OPD), p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glicosamina, p-nitrofenol, Persulfato de Amônio (APS), Reagente de Bradford, Sulfanilamida, Tris base (Tris hidroximetil aminometano), TEMED (N,N,N',N-Tetramethylethylenediamine), Triton-X 100, Tween 20 ([2-(2'-amino-3'-metoxifenil)-oxanaftaleno-4-um] – **Sigma- Aldrich, St Louis, EUA.**

Cloreto de Cálcio – **Reagen, Rio de Janeiro, Brasil.**

Ketamina (Dopalen ®), e Xilasina (Anasedan ®) - **Ceva Saúde Animal Ltda. Paulínia, SP, Brasil.**

Nitrogênio Líquido- **White Martins do Brasil S/A, Contagem, Minas Gerais, Brasil.**

Fosfato dibásico de sódio – **Reagen, Rio de Janeiro, Brasil.**

Glicina, Sódio Dodecil Sulfato (SDS) - **Vetec Química fina Ltda, Duque de Caxias, Brasil, RJ, Brasil.**

Meio de cultura RPMI 1640 desidratado, Meio de cultura Dulbecco MEM (DMEM) desidratado, Solução aquosa de tripsina (ATV) - **Cultilab Mat.Cult. Cel. Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil.**

Polimixina B (Sulfato) – **InLab, São Luiz, Maranhão, Brasil.**

Solução de acrilamida 30% - **Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA**

Sonda fluorescente DCFH-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) - **Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA.**

Substrato quimioluminescente para peroxidase – Luminata® Forte Western HRP substrate e ReBlot plus strong antibody stripping solution, 10x - **EMD Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, EUA.**

Soro Fetal Bovino (FBS) - **Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland, EUA.**

Tinta nanquim – **Keramik, Vinhedo, São Paulo, Brasil.**

#### 4.1.3 Principais soluções

##### 4.1.3.1 Cultivo celular

###### **Meio Dulbecco MEM (DMEM):**

Meio DMEM desidratado (comercial).....	10,15 g
Bicarbonato de sódio .....	1,20 g
Hepes.....	2,38 g
Ampicilina Sódica.....	0,10 g
Estreptomicina .....	0,10 g
Anfotericina B.....	5,00 mg
Água deionizada q.s.p. ....	1,00 L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH 1 M. O meio foi esterilizado por filtração em membrana (0,22 µm).

###### **Meio RPMI 1640:**

Meio RPMI-1640 desidratado (comercial) .....	10,43 g
Bicarbonato de sódio .....	1,20 g
Hepes.....	2,38 g
Ampicilina sódica.....	0,10 g
Estreptomicina .....	0,10 g
Anfotericina B.....	5,00 mg
Água deionizada q.s.p. ....	1,00 L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH 1 M. O meio foi esterilizado por filtração em membrana (0,22 µm).



**Solução corante de azul de tripan:**

Azul de tripano.....	0,12 g
Solução salina 0,9% q.s.p.....	30,00 mL

**Tampão PBS pH 7,4:**

Fosfato dibásico de sódio P.A. ....	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio P.A. ....	0,25 g
Cloreto de sódio .....	8,20 g
Cloreto de potássio .....	0,20 g
Água destilada q.s.p.....	1,00 L

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido clorídrico 1 M e o tampão foi esterilizado por autoclavação a 120°C durante 40 minutos.

**Tampão PBS/EDTA 1mM pH 7,4:**

Fosfato dibásico de sódio P.A. ....	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio P.A. ....	0,25 g
Cloreto de sódio .....	8,20 g
Cloreto de potássio .....	0,20 g
EDTA .....	1,37 g
Água destilada q.s.p.....	1,00 L

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido clorídrico 1 M e o tampão foi esterilizado por autoclavação a 120°C durante 40 minutos.

**Tampão PBS/EDTA 5mM pH 7,4:**

Fosfato dibásico de sódio P.A. ....	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio P.A. ....	0,25 g
Cloreto de sódio .....	8,20 g
Cloreto de potássio .....	0,20 g
EDTA .....	6,85 g
Água destilada q.s.p.....	1,00 L

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido clorídrico 1 M e o tampão foi esterilizado por autoclavação a 120°C durante 40 minutos.

#### **4.1.3.2 Experimentos com animais**

##### **Solução Anestésica**

Ketamina 10%..... 10,0 mL  
Xilazina 2%..... 7,5 mL

##### **Solução salina 0,9%**

NaCl..... 9,00 g  
Água destilada q.s.p..... 1,0 L

##### **Solução de Tinta nanquim a 15%**

Tinta nanquim ..... 1,5mL  
Água destilada q.s.p ..... 10,0 mL

##### **Solução de Fekete, sol. descorante para tinta naquim**

Alcool 70% ..... 100,00 mL  
Formol tamponado (10%) ..... 10,00 mL  
Acido acetico glacial ..... 5,00 mL

#### **4.1.3.3 Solução para avaliação de morte celular, por citometria de fluxo**

##### **Solução Fluorescente Hipotônica - HFS**

Iodeto de propídeo..... 5,00 mg  
Citrato de sódio ..... 100,00 mg  
Triton X 100 ..... 0,50 mL  
Água destilada q.s.p. .... 100,00 mL

#### **4.1.3.4 Soluções para quantificação de nitrito, pelo método de Griess**

##### **Solução A: Sulfanilamida 1,0% (p/v)**

Sulfanilamida ..... 100,00 mg  
Ácido fosfórico 2,5% q.s.p..... 10,00 mL

Solução B: NEED 0,1%

NEED .....	10,00 mg
Água deionizada q.s.p.....	10,00 mL

**4.1.3.5 Soluções para quantificação de citocinas, pelo método de ELISA****Solução para Extração de Citocinas:**

NaCl .....	0,40 M
Tween 20.....	500,00 µL
BSA.....	5,00 g
Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF).....	17,00 mg
DMSO .....	100,00 µL
Cloreto de Benzetônio 0,1 mM .....	44,80 mg
EDTA 10 mM.....	372,00 mg
Aprotinina 20 Kj.....	20,00 µL
Água Deionizada q.s.p.....	1,00 L

**Reagente diluente:**

BSA 0,1%.....	40,00 mg
Tampão PBS estéril.....	40,00 mL

**Tampão de lavagem:**

Polioxietilenosorbitanomonolaurato 20 (Tween20).....	650,00 µL
Tampão PBS.....	1,30 L

**Tampão de bloqueio:**

BSA 1%.....	0,40 g
Tampão PBS estéril.....	40,00 mL

**Tampão Citrato/Fosfato pH 5,0:**

Ácido cítrico 0,1 M .....	24,3 mL
Fosfato sódio dibásico 0,2 M.....	25,7mL
Água deionizada q.s.p.....	10,00 mL

**Tampão do substrato – OPD:**

Tampão Citrato/Fosfato pH 5,0 .....	10 mL
OPD .....	4 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 v/v) .....	2 µL

**Solução para paralisação da reação:**

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4M.....	30,00 mL
Água destilada q.s.p.....	10,00 mL

**4.1.3.6 Soluções para determinação da atividade de metaloproteinases, pelo método de Zimografia****Gel Concentrador (4%) – 1 gel:**

Solução de Acrilamida 30%.....	0,325 mL
Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.....	0,625 mL
Água deionizada.....	1,525 mL
SDS 10%.....	25,00 µL
APS 10%.....	12,50 µL
TEMED.....	4,00 µL

**Gel Separador (8%) – 1 gel:**

Solução de Acrilamida 30%.....	2,00 mL
Tris-HCl 1,5M, pH 8,8.....	1,875 mL
Água deionizada.....	2,725 mL
Solução de gelatina (15mg/mL).....	0,750 mL
SDS 10%.....	75,00 µL
APS 10%.....	75,00 µL
TEMED.....	7,50 µL

**Solução corante:**

Azul de Coomassie (CBB).....	0,25 g
Metanol.....	125,00 mL
Ácido acético glacial.....	50,00 mL
Água deionizada.....	325,00 mL

**Solução descorante:**

Metanol.....	40,00 mL
Ácido acético.....	80,00 mL
Água deionizada.....	880 mL

**Tampão de lavagem:**

Tris-HCl 1M pH7,4.....	10,00 mL
Triton 2,5%.....	5,00 mL
Água destilada q.s.p.....	200,00 mL

**Tampão de incubação:**

Tris-HCl 1M pH 7,4.....	10,00 mL
CaCl <sub>2</sub> 1M.....	2,00 mL
NaCl 5M.....	8,00 mL
Chaps 0,02%.....	40,00 mg
Água destilada q.s.p.....	200,00 mL

**Tampão de corrida:**

Tris Base.....	1,51 g
Glicina.....	7,20 g
SDS.....	0,50 g
Água destilada q.s.p.....	500,00 mL

**4.1.3.7 Soluções para eletroforese e Western Blotting****Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8**

Tris base.....	18,21 g
Água deionizada q.s.p. ....	100,00 mL

O pH foi ajustado para 8,8 com solução de ácido clorídrico 10 M e, em seguida, o volume completado com água deionizada.

**Tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8**

Tris base.....	12,14 g
Água deionizada q.s.p. ....	100,00 mL

O pH foi ajustado para 6,8 com solução de ácido clorídrico 10 M e, em seguida, o volume completado com água deionizada.

**Solução para o gel separador desnaturante 10% acrilamida**

Solução aquosa de Acrilamida 30% .....	1,67 mL
Tampão Tris-HCl 1,5 mM pH 8,8.....	1,25 mL
SDS 10% (p/v) .....	50,00 µL
Água deionizada.....	1,98 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v) .....	50,00 µL
TEMED .....	10,00 µL

**Solução para o gel concentrador desnaturante 4% acrilamida**

Solução aquosa de Acrilamida 30% .....	267,00 µL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 8,8.....	250,00 µL
SDS 10% (p/v) .....	20,00 µL
Água deionizada .....	1,44 mL
Solução aquosa de APS 10% (p/v) .....	20,00 µL
TEMED .....	5,00 µL

**Tampão de corrida eletroforese desnaturante 5X (solução estoque)**

Tris base.....	15,10 g
Glicina.....	94,00 g
SDS.....	5,00 g
Água destilada q.s.p.....	1L

A solução de uso (1X) foi preparada no momento do uso por diluição 1:5 em água milli Q.

**Tampão de lise (RIPA buffer)**

Cloreto de sódio .....	0,44 g
Tris base.....	0,30 g
Desoxicolato de sódio.....	0,25 g
NP-40 ou Triton-X 100 .....	0,5 mL
SDS.....	0,5 g
Água deionizada q.s.p. ....	50,00 mL

**Tris-Buffered Saline plus Tween 20 (TTBS)**

Cloreto de sódio .....	8,70 g
Tris base .....	24,20 g
Tween 20.....	500,00 µL
Água deionizada q.s.p. ....	1L

**Solução de bloqueio**

BSA .....	2,50 g
TTBS q.s.p. ....	50,00 mL

**Tampão de transferência**

Metanol absoluto.....	100,00 mL
Glicina.....	7,2 g
Tris base.....	1,52 g
Água deionizada q.s.p. ....	500,00 mL

**4.1.3.8 Soluções para a determinação da atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG), método colorimétrico.****Solução NaCl a 0,9%:**

NaCl.....	0,90 g
Água destilada q.s.p.....	100,00 mL

**Solução para extração - Triton X-100 a 0,1%:**

Triton X- 100.....	1,00 mL
Solução salina a 0,9% q.s.p.....	1,00 L

**Solução de p-nitrofenol para curva padrão:**

p-Nitrofenol (PM= 139,1g/mol).....	0,02782 g
Tampão Citrato-Fosfato pH 4,5.....	500,00 mL

**Tampão citrato/fosfato pH 5:**Ácido cítrico a 0,1 M (Solução A)

Ácido cítrico monohidratado .....	10,51 g
Água deionizada q.s.p.....	500,00 mL

Fosfato de Sódio a 0,1 M (Solução B)

Fosfato de sódio dibásico .....	7,10 g
Água deionizada q.s.p.....	500,00 mL

Tampão citrato/ fosfato a 0,039 M pH 4,5:

Solução A.....	300,00 mL
Solução B.....	465,00 mL

**p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glicosamina a 2,24 mM:**

p-nitrofenil-N-acetil-b-D-glicosamina.....	0,77 mg
Tampão citrato/fosfato.....	1,00 mL

**Tampão Glicina a 0,2M pH 10,6:**Glicina a 0,8 M:

Glicina.....	15,01 g
Água destilada q.s.p.....	250,00 mL

NaCl a 0,8 M:

NaCl.....	11,70 g
Água destilada q.s.p.....	250,00 mL



NaOH a 0,8 M:

NaOH.....	8,00 g
Água destilada q.s.p.....	250,00 mL

Tampão glicina:

Glicina a 0,8M.....	100,00 mL
NaCl a 0,8 M.....	100,00 mL
NaOH a 0,8 M.....	100,00 mL

*4.1.4 Kits, anticorpos e citocinas*

Anticorpos primários policlonais produzidos em coelhos: anti-COX-2, **Abcam, Cambridge, Massachusetts, EUA**; anti- NFκ-B (p65), **Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA**; anti-p38 MAPK Total, anti-SAPK/JNK total e anti-fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), **CellSignaling, Danvers, Massachusetts, EUA**.

Anticorpos primários policlonais produzidos em camundongos: anti- Fosfo- p38 (Thr180/Tyr182), **CellSignaling, Danvers, Massachusetts, EUA**.

Anticorpos secundários HRP- conjugados: anti- rabbit e Anti- mouse, **Sigma-Aldrich, St Louis, EUA**.

Coquetel de inibidores para proteases - SIGMAFAST® Protease Inhibitor Cocktail Tablets - **Sigma- Aldrich, St Louis, EUA**.

Interleucina-4 murina recombinante - **Sigma- Aldrich, St Louis, EUA**.

Kits de imunoenaios: Mouse IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-12, IL-10, TGF-β, VEGF e CCL2/MCP-1 (DuoSet ® ELISA Development System) - **R & D Systems, Mineapolis, Minnesota, EUA**.

Kit para a síntese de cDNA (High Capacity cDna Reverse Transcription Kits, 200 reactions) – **Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA**.

Kit para qPCR em tempo real (SYBR™ Green Master Mix) – **ThermoFisher Scientific, San Jose, Califórnia, EUA.**

#### *4.1.5 Equipamentos*

Aagitador Magnético modelo 252 - **Fizatron Equipamentos Elétricos para Laboratório, São Paulo, Brasil.**

Balança analítica Toledo – **Gehaka Eletro-EletrônicaLtda, São Paulo, Brasil.**

Bomba Aspirante modelo “H” - **Nevoni Equipamentos Médicos e Odontológicos, Lapa, SP, Brasil.**

Capela com fluxo laminar de ar ultra-filtrado - **Veco do Brasil Indústria & Companhia de Equipamentos, Campinas, SP, Brasil.**

Câmera fotográfica para microscópio Moticam 2500 - **Motic Incorporation Ltd., Hong Kong, China.**

Centrífuga refrigerada, Sorvall ST 16R, equipada com rotor para placas modelo M-20; Leitor de microplacas, Multiskan GO - **ThermoScientific, San Jose, Califórnia, EUA.**

Citômetro de Fluxo – FACscalibur Cytometer - **Becton & Dickinson, San Diego Califórnia, USA.**

Estufa incubadora 37 °C, atmosfera controlada e contendo 5,0% CO<sub>2</sub> (v/v) – **Nuaire Equipaments, Plymouth, Massachusetts, USA.**

Fluorímetro – Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader - **BioTek, Winooski, Vermont, EUA.**

Fotodocumentador, ImageQuant™ LAS 4000 Biomolecular Imager – **GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido.**

Freezer a temperatura de -80 °C e Ultra-sonicador modelo FS-28H - **Thermo Scientific, San Jose, California, EUA.**

Hemocitômetro (câmara de Neubauer) 0,0025 m<sup>2</sup> x 0,100 mm de profundidade - **FORTUNA®, Berlim, Alemanha.**

Medidor de pH modelo NT-PH2 - **Novatécnica Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP, Brasil**, equipado com eletrodo modelo V-620 C – **Analion Aparelhos & Sensores Ind. & Com., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.**

Microscópios ópticos OLYMPUS BX451, OLYMPUS CX4IRE, OLYMPUS BX41, OLYMPUS CX41. **Metrimpex, Hungria.**

Nanodrop NanoVue Plus Spectrophotometer - **GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido.**

Refrigerador ajustado à temperatura de +4°C; freezer à temperatura de -20°C – **Consul-Multibrás Eletrodomésticos S/A, São Bernardo do Campo, Brasil.**

Sistema de eletroforese, de transferência semi-seca e fonte de energia, Protein Electrophoresis and Blotting – **Bio Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA.**

Termociclador – StepOnePlus® Real-Time PCR System – **Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA.**

#### *4.1.6 Diversos*

Agulhas e seringas descartáveis - **INJEX Indústrias Cirúrgicas, LTDA., Ourinhos, Brasil.**

Béqueres, Ehrlenmeyers, Funis, Pipetas graduadas, Provetas, Quitassatos, Balões volumétricos - **Pyrex®, Cidade do México, México.**

Garrafas (25 e 75 cm<sup>2</sup>) e placas (6, 12, 24 e 96 poços) de poliestireno para cultura celular - **KASVI, Curitiba, Brasil.**

Insertes de poliéster para co-cultura - Corning® Costar® Transwell® permeable supports, para placa de 12 poços, poro de 0,4 µm – **Corning Incorporated, Nova Iorque, Nova Iorque, EUA.**

Material cirúrgico (Pinças, tesouras e bisturis) - **Procure – Cirúrgica, Belo Horizonte, MG.**

Membrana de PVDF (Fluoreto de polivinilideno), Immobilon®-P Membrane poro de 0,45µm - **EMD Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, EUA.**

Microtubos de fechamento seguro de 500 e 1500 µL - **Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA e Eppendorf, Hamburg, Alemanha.**

Paquímetro digital - **Mitutoyo ®, Suzano, São Paulo, Brasil.**

Pipetadores automáticos com capacidade máxima de 2, 20, 200 e 1000 µL – **FisherBrand, ThermoFisher Scientific, San Jose, California, EUA.**

#### *4.1.7 Programas computacionais*

Software GraphPadPrism versão 5.0 – **GraphPad Software, La Jolla, California, EUA.**

Software BD Cell Quest® versão 5.1 - **Becton Dickison, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA.**

Software ImageJ versão 1.50i - **National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA.**

Software ImageQuant™ versão TL 8.1 - **GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido.**

Software StepOnePlus® versão 2.3 - ThermoFisher Scientific, San Jose, California, EUA.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Cultivo da linhagem 4T1

Células da linhagem 4T1 (adenocarcinoma de mama) foram descongeladas em meio RPMI 1640 a 20% (v/v) de FBS e mantidas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C com atmosfera úmida. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado por RPMI 1640 a 10% (v/v) de FBS e o crescimento acompanhado. Ao atingirem aproximadamente 90% de confluência, subcultivos das linhagens foram realizados para ampliação da cultura. Para isso, as células foram lavadas com a solução de PBS/EDTA 1mM, pH 7,4 e posteriormente adicionou-se tripsina a 0,2% (v/v) para que estas se soltassem da garrafa de cultivo. Quando as células apresentavam-se completamente desprendidas, foi adicionado meio RPMI com 5% FBS para inativação da tripsina.

### 4.2.2 Obtenção de macrófagos peritoneais

Animais BALB/C fêmeas entre 8 e 10 semanas foram estimulados, por via intraperitoneal, com 2,0 mL de tioglicolato estéril a 3% (p/v). Após 3 dias, os animais foram sacrificados para a realização do lavado peritoneal. Para isso, no abdômen de camundongos estimulados foi realizada uma incisão (de 0,5 a 1 cm), com auxílio de pinças e tesouras estéreis, e introdução de 10 mL de PBS estéril a 4°C. Após massagem vigorosa na cavidade abdominal a suspensão celular obtida foi coletada com a utilização de pipetas de Pasteur, transferidas para tubos de fundo cônico estéreis com capacidade para 15 mL e centrifugada a 2.500 rpm por 10 minutos a 4°C (LEIJH *et al.*, 1984). Em seguida o sobrenadante foi descartado, as células suspensas em meio RPMI, para contagem em câmara de Neubauer e ajuste da densidade celular. Após 2 horas de cultivo, tempo necessário para adesão dos macrófagos, adicionou-se a cada cavidade PBS pH 7,4 seguido de aspiração com o objetivo de remover células não aderentes. Esse procedimento de lavagem foi realizado por mais 2 vezes, seguido do cultivo das células em RPMI a 5% (v/v) de FBS por 24 horas.

#### 4.2.3 Teste do MTT

O ensaio do MTT é um teste de competência metabólica baseado na avaliação do desempenho celular mitocondrial. Consiste na conversão pela succinato desidrogenase mitocondrial do corante amarelo, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) ou sal de tetrazólio, em formazan, composto roxo e insolúvel em água (MOSMANN, 1983). Em seguida, a solubilização do formazan se dá pela adição de DMSO, e permite a correlação das leituras de densidade óptica (D.O.), realizadas em 570 nm, com a quantidade de células metabolicamente viáveis.

Neste trabalho o teste de MTT foi utilizado com o objetivo de se determinar a quantidade de células 4T1 e de macrófagos viáveis em cultura (FERRARI *et al.*, 1990). Além disso, o mesmo teste foi utilizado para a construção das curvas D.O. *versus* número de macrófagos (Apêndice B – Figura 1 e 2), permitindo a correção dos níveis de nitrito, ROS ou de citocinas pelo número de macrófagos viáveis.

#### 4.2.4 Co-culturas e avaliação da atividade tumoricida de macrófagos peritoneais

Macrófagos obtidos após estimulação com tioglicolato (item 4.2.2), foram cultivados ( $3 \times 10^5$  céls/poço) em placas de 24 poços e expostos a CMS1 ou CMS2 (10, 20 ou 40 ug/mL) por 24h. Após esse período, os macrófagos foram lavados para retirada dos tratamentos e a co-cultura realizada ao semear células 4T1 ( $10^5$  céls/poço) nos respectivos poços. No total, a co-cultura foi mantida por 40 h em meio RPMI 1640, sendo que as últimas 24h foram na ausência de FBS, e em seguida, expostas ao teste do MTT. Em paralelo, monoculturas de macrófagos foram realizadas, nas mesmas condições, expostas as sub-frações e ao MTT, e os valores de D.O., utilizados como controle do número de macrófagos em co-cultura (FERRARI *et al.*, 1990). O teste do MTT foi realizado por 90 min, com adição de 500uL/poço da solução de sal de tetrazólio (0,5mg/mL) em meio RPMI, e solubilização do formazan com 1mL de DMSO. A co-cultura com polimixina B foi realizada seguindo este mesmo protocolo, sendo que a retirada e o cultivo dos macrófagos foram realizados com RPMI 1640 acrescido de polmixina B na concentração de 10ug/mL.

Cálculo da porcentagem de células 4T1 viáveis em co-cultura:

**% Viabilidade 4T1 em co-cultura =**

**= (D.O. co-cultura – D.O. Mφs Tratados) x 100/ (D.O. co-cultura – D.O. Mφs controle)**

#### 4.2.5 Co-culturas em trans-wells e avaliação de morte celular na linhagem 4T1

Macrófagos peritoneais, obtidos conforme item 4.2.2, foram cultivados no compartimento superior de aparatos *transwell* ( $5 \times 10^5$  céls/poço) e expostos por 24 h a CMS2 (10 ou 20 µg/mL) ou controle (RPMI 1640 a 5% FBS). Os insertes, com poros de 0,4 µm, contendo macrófagos foram transferidos para poços contendo células 4T1 previamente semeadas ( $1,5 \times 10^5$  céls/poço) e a co-cultura, sem que houvesse contato físico entre os tipos celulares, mantida por 24h na ausência de FBS. Em seguida, as células 4T1 foram suspensas em 300 µL de solução fluorocrômica hipocrômica HFS (do inglês, *hypochromic fluorochrome solution*). A incubação das células com essa solução, leva à fragilização da membrana celular pela ação do Triton X-100 e o choque hipotônico provoca a lise da membrana celular. O material nuclear se torna acessível ao iodeto de propídeo, que irá se intercalar ao DNA nuclear. Após 4 h de incubação a 4 °C, ao abrigo da luz, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences, EUA). Inicialmente, a população celular foi delineada considerando o tamanho e granulosidade característica de cada linhagem celular, utilizando, como controle, células tratadas com o veículo (RPMI) e sem terem sido co-cultivadas com macrófagos. As células normais apresentam o conteúdo de DNA igual a 2n ou 4n, dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram. Já as células em apoptose apresentarão conteúdo de DNA menor que 2n (sub-diplóide), uma vez que os fragmentos de pequeno peso molecular irão deixar o interior do núcleo. A fluorescência emitida dos núcleos foi analisada em histogramas, sendo o conteúdo de DNA sub-diplóide definido por meio do programa Cell Quest (Becton Dickison, EUA).

#### 4.2.6 Quantificação de nitrito e de espécies reativas de oxigênio

Macrófagos peritoneais foram obtidos, conforme item 4.2.2, e cultivados em placas de 96 poços ( $10^5$  céls/poço) e expostos a CMS1 ou CMS2 (5-40 µg/mL) por 24h. Em

seguida, macrófagos foram lavados e cultivados em RPMI 1640 sem FBS, por mais 24 h, quando os sobrenadantes das culturas foram recolhidos para a determinação da produção indireta de NO utilizando o método de Griess. Para isso, 50uL de solução de sulfanilamida, a 1% (preparada em solução de ácido fosfórico a 2,5%), e 50uL de solução de NEED a 0,1%, foram adicionados ao branco, a curva e a 50uL de amostras provenientes do sobrenadante de cultura de macrófagos. Após 10 min de reação, as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm (REINER *et al.*, 2009) e a quantificação de nitrito foi estimada pela extrapolação da curva obtida.

Enquanto o sobrenadante foi utilizado para dosagem de nitrito, as culturas de macrófagos, propriamente dita, foram utilizadas para a quantificação intracelular de espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*). Para isso, estas foram incubadas, por 30 min a 37°C, com solução contendo a sonda fluorescente peróxido-sensível DCFH-DA (2', 7'- diacetato de diclorofluoresceína) na concentração de 10µM (ROMAN *et al.*, 2009). DCFH-DA penetra para o compartimento celular por difusão passiva onde reage com ROS resultando na formação do composto DCF (diclorofluoresceína) que é altamente fluorescente. Como indicativo da produção de ROS, a liberação intracelular cumulativa de DCF foi avaliada em fluorímetro Synergy® durante o período de 15 min, com leituras a cada minuto.

Após a quantificação de ROS, o teste do MTT foi realizado pela exposição dos macrófagos, durante 3h, a 100µL/poço da solução de sal de tetrazólio (0,5mg/mL), em meio RPMI e, posterior, solubilização do formazan com 100 µL de DMSO. A partir da curva D.O. *versus* número de macrófagos (Apêndice B - Figura 1), foi possível o cálculo do número de células viáveis e a correção dos níveis encontrados de nitrito e de ROS para cada experimento.

#### *4.2.7 Estimativa da concentração protéica – Método de Bradford*

A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Nesse caso, foram incubadas quantidades entre 1,0 e 10,0 µL das amostras completando o volume destas para 20,0 µL com água deionizada. Foi adicionado em seguida 180 µL da solução de Bradford e após 15 min a leitura da densidade ótica



foi realizada em 595 nm. Para cálculo das concentrações de proteína, foi estimada uma curva padrão utilizando BSA nas concentrações entre 0,5 e 10,0 µg/µL.

#### 4.2.8 Zimografia

Macrófagos peritoneais, obtidos conforme item 4.2.2, foram cultivados em placas de 24 poços ( $10^6$  céls/poço). No dia posterior foram expostos a CMS1 ou CMS2 (5, 10 ou 20 µg/mL) por 24h. Após o período de exposição, as culturas foram lavadas e mantidas em RPMI 1640 livre de fatores de crescimento. Após mais 24 h, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos, centrifugados e armazenados para os ensaios de zimografia e para a quantificação de citocinas.

Os experimentos de zimografia foram realizados em amostras de sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais e em sobrenadante de homogenatos tumorais. As amostras de sobrenadante de culturas de macrófagos foram preparadas e recolhidas, conforme descrito acima, aliqüotadas e armazenadas. Os fragmentos de tumores foram homogeneizados em 0,6 mL de tampão de extração de NAG (item 4.1.3.8) à 4°C e após centrifugação (15.000 x g), o sobrenadante foi armazenado em alíquotas. Posteriormente, a concentração protéica foi determinada, nos dois tipos de amostras, através do método de Bradford (item 4.2.7).

Segundo protocolo previamente descrito (HU & BEETON, 2010), as zimografias foram realizadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 8% contendo gelatina na concentração final de 0,1%. Quinze µg de proteína de cada amostra foram submetidas a 90 Volts por um tempo médio de 90 min. Após a eletroforese, os géis foram lavados por 30 min em tampão de lavagem para total remoção do SDS, seguido de incubação a 37°C por 16 horas em tampão de incubação, conforme item 4.1.3.6. A seguir, os géis foram corados (solução corante de géis) e descorados (solução descorante). A atividade da gelatinase foi visualizada por bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de proteína. A análise semiquantitativa foi feita usando o programa de análise de imagem ImageJ®.

#### 4.2.9 Western Blotting

A fim de avaliar em macrófagos as vias de sinalização ativadas pelo tratamento com CMS2, foram quantificadas proteínas como COX-2 e NFκ-B (p65), assim como, a fosforilação de p38, SAPK/JNK e Akt. Primeiramente, macrófagos peritoneais foram obtidos, conforme item 4.2.2, e cultivados em placas de 6 poços na densidade de  $6 \times 10^6$  cels/poço. No dia seguinte, as células foram expostas, por 24h, a CMS2 nas concentrações de 5,10 e 20 µg/mL. Decorrido o período de tratamento, o meio foi aspirado, a monocamada celular lavada com PBS gelado e as células incubadas com tampão de lise (RIPA Buffer - 50 µL/poços no total de 3 poços – item 4.1.3.7) acrescido do coquetel de inibidores para proteases (SIGMAFAST®) por 30 min, sobre gelo. A seguir, os lisados foram recolhidos e centrifugados a  $13.000 \times g/4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante recolhido e conservado a  $-80^\circ\text{C}$ . A dosagem de proteínas foi realizada através do método de Bradford (item 4.2.7) e os lisados submetidos a ensaios de western blotting.

Trinta µg de proteína foram fracionados em gel de poliacrilamida a 10% a 90 V por, em torno, de 2h. Após a eletroforese, o gel foi incubado à temperatura ambiente durante 10 min com o tampão de transferência sob lenta agitação. Concomitantemente, uma membrana de PVDF, de mesma dimensão do gel, foi lavada por 15 segundos em metanol absoluto e depois incubada em tampão de transferência, juntamente, com 2 papéis de filtro de iguais dimensões. O “sandwich” foi montado com o gel e a membrana envolvidos pelos papéis de filtro. A transferência foi processada durante 15 min, em 25 V de tensão usando a célula de transferência semi-seca. Após a transferência, a membrana de PVDF foi lavada 3 vezes em TTBS e incubada, *overnight*, em solução de bloqueio na qual o anticorpo contra a proteína de interesse foi diluído de acordo com a tabela1:

**Tabela 1 – Diluições de anticorpos primários utilizados nos ensaios de *Western Blotting*.**

<b>Anticorpos primários</b>	<b>Diluições</b>	<b>Fabricantes</b>
COX-2	1 : 500	Abcam®
NFκ-B (p65)	1 : 2.000	Santa Cruz®
p38 total	1 : 500	Cell Signalling®
p-p38	1 : 500	Cell Signalling®
SAPK/JNK Total	1: 2.000	Cell Signalling®
p-SAPK/JNK	1: 2.000	Cell Signalling®
Akt total	1: 2.000	Cell Signalling®
p-Akt	1: 1.000	Cell Signalling®
GAPDH	1: 10.000	Cell Signalling®

Ao final da incubação, lavou-se a membrana em TTBS por 3 vezes de 5 min cada, sendo posteriormente incubada por 2 h, em temperatura ambiente, na presença do anticorpo anti-IgG específico peroxidase-conjugado (diluído 1:10.000 em TTBS). Lavou-se novamente a membrana por 3 vezes de 5 min em TTBS, e procedeu-se a revelação por quimioluminescência utilizando o Luminatta Forte (Millipore®) como revelador. Após adição do reagente, as membranas foram digitalizadas em fotodocumentador (ImageQuant™ LAS 4000) e a densidade das bandas analisadas com auxílio do programa de imagens ImageQuant® TL.

#### *4.2.10 Inóculo tumoral e tratamento com a sub-fração CMS2*

No modelo de carcinoma de mama 4T1, a suspensão celular (obtida conforme item 4.2.1) contendo  $10^6$  células da linhagem 4T1 foi inoculada s.c. (100 µL) na região do flanco esquerdo de camundongos BALB/c fêmeas entre 8-9 semanas. No 3º dia pós-inóculo o tratamento com CMS2 (0,3; 1,0 ou 3,0 mg/kg) ou salina foi iniciado, e realizado diariamente por via s.c. durante 22 dias.

O crescimento tumoral foi acompanhado em dias alternados, do 1º ao 25º dias, através da medição do volume dos tumores com o auxílio de um paquímetro. A determinação do volume foi realizada através de duas medidas: uma no sentido da

maior extensão e outra no sentido da menor extensão (GHONEUM *et al.*, 2008). Assim, o volume tumoral (VT) foi determinado pela seguinte fórmula:

$$VT \text{ (mm}^3\text{)} = 0,52 AB^2$$

sendo A, a medida do menor eixo e B a do maior eixo.

Ao final do período de tratamento, os animais foram anestesiados, tiveram os tumores retirados e pesados. Posteriormente, foi introduzida 1 mL de tinta nanquim (15%) pela via traqueal dos animais para visualização das metástases pulmonares (BAO *et al.*, 2011). A atividade antitumoral foi avaliada pela medida das massas dos tumores e a atividade antimetastática pela contagem de pontos metastáticos (brancos) em meio ao parênquima pulmonar (negro).

#### 4.2.11 Dosagem de citocinas

O ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ou ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi realizado para a dosagem das citocinas em sobrenadante de homogenato tumoral e em sobrenadantes de culturas macrofágicas. As amostras de sobrenadante foram obtidas conforme a obtenção de sobrenadantes para zimografia (Item 4.2.8). Já os fragmentos de tumor foram processados em 600µL de tampão extrator de citocinas e o sobrenadante do homogenato recolhido e armazenado a -80°C. Para a realização dos imunoenaios foram utilizados kits e seus respectivos protocolos. As placas foram sensibilizadas colocando-se 100µL/cavidade de anticorpo primário (anti-camundongo) específico para cada citocina a ser avaliada, e então, incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas quatro vezes com 200 µL de tampão de lavagem. Em seguida, adicionou-se 200 µL do tampão de bloqueio e as placas foram colocadas para incubação por uma hora. Após lavagens, os padrões e as amostras diluídas em reagente diluente foram adicionados totalizando 100 µL/ poço, e as placas incubadas *overnight* a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas novamente, por quatro vezes, e o anticorpo de detecção biotilado respectivo para cada citocina foi adicionado. As placas foram incubadas por uma hora, e ao final de quatro lavagens, adicionou-se 100 µL/ poço do conjugado estreptavidina-peroxidase. Posteriormente, a incubação por 30 minutos, em temperatura ambiente, e após

lavagens foi adicionado 100µL/ poço de tampão do substrato – OPD. As placas foram incubadas ao abrigo da luz por, no máximo, quinze minutos quando a reação foi paralisada pela adição de 50 µL/cavidade da solução de paralisação. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm e os resultados obtidos expressos em pg de citocina por mg de tumor no caso de amostras tumorais ou, em pg de citocina/10<sup>5</sup> células, no caso de sobrenadante proveniente de culturas macrofágicas.

#### 4.2.12 *Quantificação da atividade de NAG*

Os fragmentos de tumor foram pesados e processados em 600µL de solução de triton X-100 a 0,1% v/v em salina. Esse homogenato foi centrifugado a 4°C por 10 minutos em velocidade 3.000 rpm. Para a realização do ensaio enzimático, 50 µL da amostra foram diluídos em 200 µL de tampão citrato/fosfato (pH 4,5) e colocadas em duplicada (100µL) em placa de 96 poços. Posteriormente, 100 µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidase, diluído em tampão citrato/fosfato (pH 4,5), foi adicionado à placa. Para construção da curva, a solução de p-nitrofenol em tampão citrato/fosfato pH 4,5 foi adicionada na placa em diferentes diluições (400nM, 200nM, 100nM, 50nM, 25nM e 12,5nM). Em seguida, a placa foi incubada a 37° C, durante 30 minutos. Finalmente, a reação foi interrompida adicionando-se 100 µL de tampão glicina 0,2M (pH 10,6). A absorbância foi medida por leitor de microplaca em comprimento de onda de 405nm. Os resultados foram expressos em [ ] p-nitrofenol(nM)/mg de tecido.

#### 4.2.13 *Reação em cadeia da polimerase em tempo real - qPCR*

Extração de RNA total: A extração de RNA total foi realizada utilizando-se o método “guanidinoisotiocianato-fenol-clorofórmio”. Imediatamente após a medição, os tumores foram removidos, pesados e congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas na presença do reagente Trizol® (0,8 mL), utilizando-se um homogeneizador de tecido. Os tubos contendo os homogenatos foram incubados a temperatura ambiente por 10 min. Após esse procedimento, adicionou-se 0,5 mL de clorofórmio. Os tubos foram vigorosamente agitados e deixados em repouso por 10 min a 4°C, sendo, em seguida, centrifugados a 12.000 g por 15 min. A camada superior (fase aquosa) foi

recuperada em novos tubos, com subsequente adição de 0,5 mL de isopropanol. O material foi levemente agitado e mantido em repouso a temperatura ambiente por 10 min. Após centrifugação a 12.000 g por 20 min, à mesma temperatura utilizada anteriormente, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 75% (solução manufaturada em água DEPC), agitando-se novamente. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos à temperatura ambiente até secagem das amostras. A redissolução do RNA total foi realizada com adição de 0,05 mL de água DEPC.

Transcrição reversa: A conversão do RNA em cDNA dos homogenatos tumorais foi realizada com o auxílio do High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems. A transcrição reversa é um processo no qual o RNA de cadeia simples é transcrito inversamente em DNA complementar (cDNA). Para isso se faz necessário a amostra de RNA total, uma enzima transcriptase reversa, um iniciador rico em timina que irá se ligar à região Poly-A do RNA e nucleotídeos do DNA (dNTPs). A quantidade de RNA presente em cada amostra foi quantificada, com o auxílio do aparelho NanoDrop, e o volume referente a 5000nM adicionado ao tubo de reação. A quantidade dos reagentes está descrita na Tabela 2:

**Tabela 2– Quantidade de reagentes utilizados na síntese de cDNA.**

Reagente	Volume (µL)
Tampão 10X	2,0
dNTP Mix (100mM) 25X	0,8
Primers aleatórios 10X	2,0
Transcriptase reversa	1,0
RNA	Volume referente a 5000nM
Água livre de nucleases	q.s.p 20,0

Os tubos foram colocados em um termociclador, seguindo os passos descritos na Tabela 3:

**Tabela 3 – Ciclos térmicos utilizados na reação de transcrição reversa.**

	<b>Passo 1</b>	<b>Passo 2</b>	<b>Passo 3</b>	<b>Passo 4</b>
<b>Temperatura</b>	25°C	37°C	85°C	4°C
<b>Tempo</b>	10min	120min	5min	∞

Após o término das reações, os tubos foram armazenados a -20°C.

PCR quantitativo em Tempo Real: As reações foram feitas utilizando *primers* específicos para produzir a amplificação do cDNA correspondente aos genes de interesse. Os *primers* foram confeccionados, com auxílio do programa específico BLASTN, e gentilmente doados (Fizz-1 e Ym-1) pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Rafaela Fernandes do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB/UFMG). Os primers do gene utilizado para normalização da reação (controle endógeno) foram para GAPDH (Gliceroaldeido-3-fosfato desidrogenase). As sequências dos oligonucleotídeos específicos para cada gene estão descritas na Tabela 4.

**Tabela 4 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas RT-qPCR para amplificação dos seguimentos genômicos específicos para MR, FIZZ-1, Ym-1 e GAPDH.**

<b>Primer</b>	<b>Óligo senso</b>	<b>Óligo antisenso</b>
<b>MR</b>	5'-GCTGAATCCCAGAAATTCCGC-3'	5'-ATCACAGGCATACAGGGTGAC-3'
<b>FIZZ-1</b>	5'-CCCTCCACTGTAACGAAGACTC-3'	5'-CACACCCAGTAGCAGTCATCC-3'
<b>Ym-1</b>	5'-GGGCATACCTTTATCCTGAG -3'	5'-CCACTGAAGTCATCCATGTC-3'
<b>GAPDH</b>	5-GCA CTT GGC AAA ATG GAG AT-3'	5'-CCA GCA TCA CCC CAT TAG AT-3'

O cDNA obtido da etapa de transcrição reversa foi utilizado como fita molde para a amplificação por qPCR em tempo real. As reações tiveram um volume final de 10 µl e foram feitas em duplicatas, utilizando 5 µl do Master Mix de SYBR Green (ThermoFisher Scientific); 1 µl de cada primer na concentração de 0,3 µM; 2 µl de cDNA (diluição de 10x) e água q.s.p. O aparelho para reação foi StepOnePlus (Applied Biosystem, EUA), sendo realizados 40 ciclos com temperatura de anelamento de 60°C.

#### 4.2.14 Obtenção do meio condicionado da linhagem L929

Células L929 são produtoras do fator estimulante de colônia para granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), fator que promove a diferenciação de células hematopoiéticas em macrófagos (Deryugina *et al.*, 1995). As células da linhagem L929 (fibroblasto) foram descongeladas em meio DMEM a 20% (v/v) de FBS e mantida em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C com atmosfera úmida. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado por DMEM a 10% (v/v) de FBS e o crescimento acompanhado. Após a expansão, as células foram mantidas durante seis dias com o mesmo meio de cultura que foi



retirado e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização (WEISCHENFELDT & PORSE, 2008)

#### 4.2.15 Obtenção de células da medula e diferenciação em macrófagos

Camundongos BALB/c fêmeas de 8-10 semanas foram eutanasiados em câmara de  $\text{CO}_2$  e seus ossos, fêmur e tíbia, retirados. O lavado medular foi realizado em capela com fluxo laminar, para a garantia de um ambiente estéril. Primeiramente, as extremidades dos ossos foram cortadas com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Em seguida, para a retirada das células da medula óssea acoplou-se na cavidade interna dos ossos uma seringa contendo solução de PBS/EDTA 5mM. O lavado foi homogeneizado com a seringa com o objetivo de desagregar os grumos de células e obter uma suspensão celular uniforme. O lavado medular foi centrifugado a 400G, na temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos, na presença do gradiente densitométrico Histopaque 1083. O gradiente permite que as células precursoras mononucleares se separem das demais, formando um anel branco visível no tubo. Assim, a porção mononuclear foi separada, suspensa e lavada (3x) com PBS/EDTA 5mM. Retirou-se uma alíquota que foi homogeneizada com a solução corante azul de tripan, para a contagem de células na câmara de Neubauer, e ajuste da densidade celular. Assim  $1 \times 10^7$  células foram semeadas em garrafas de cultivo na presença do meio DMEM/L929 (DMEM acrescido de 10% de meio condicionado proveniente da linhagem L929) a 10% FBS. Após 4h, as garrafas de cultura foram lavadas com PBS e as células aderidas cultivadas em DMEM/L929 a 10% FBS, por 6 dias (onde se realizou a troca a cada 2 dias), período necessário para a diferenciação de monócitos em macrófagos. No sétimo dia, foram expostos ao meio DMEM a 10% FBS acrescido de 1 ng/ml de IL-4 por 24h, para obtenção do fenótipo M2 (EDWARDS *et al.*, 2006 ; CHO *et al.*, 2012).

#### 4.2.16 Inóculo do modelo tumoral 4T1/M2 e tratamento dos animais com a sub-fração CMS2

Uma variação do modelo de carcinoma 4T1, denominado aqui de carcinoma 4T1/M2, foi adaptado (CHO *et al.*, 2012) e utilizado em outro grupo de experimentos. Para isso, camundongos BALB/c fêmeas de 8-9 semanas receberam na região do flanco esquerdo, por via s.c., o co-inóculo de suspensão celular contendo  $10^6$  células

de carcinoma de mama 4T1(50  $\mu$ L), acrescida de suspensão celular contendo  $2 \times 10^5$  M $\phi$ s-M2 (50  $\mu$ L), obtidos conforme item 4. Os grupos controle receberam apenas suspensão celular contendo células da linhagem 4T1 ( $10^6$  células). No dia seguinte ao inóculo, iniciou-se o tratamento diário dos camundongos com CMS2 (1,0mg/Kg) ou salina e este foi realizado durante 14 dias. O crescimento tumoral foi acompanhado em dias alternados, do 1° ao 15° dias, através da medição do volume dos tumores com o auxílio de um paquímetro. A determinação do volume foi realizada através de duas medidas: uma no sentido da maior extensão e outra no sentido da menor extensão (GHONEUM *et al.*, 2008).

Assim, o volume tumoral (VT) foi determinado pela seguinte fórmula:

$$VT \text{ (mm}^3\text{)} = 0,52 AB^2$$

sendo A, a medida do menor eixo e B a do maior eixo.

No 15° dia após inóculo, os animais foram sacrificados, tiveram os tumores retirados e pesados para avaliação da atividade de CMS2 sobre tal modelo.

### **4.3 Análises Estatísticas**

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  e.p.m. As análises estatísticas entre 3 ou mais grupos, foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de múltiplas comparações, utilizando-se o método de Student Newman-Keuls. As análises entre 2 grupos foram realizadas por meio do teste t de Student não-paramétrico. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como significativos para ambos os testes estatísticos utilizados.

## 5. RESULTADOS

Com o intuito de avaliar o efeito das sub-frações, CMS1 e CMS2, sobre a atividade tumoricida de macrófagos, ensaios *in vitro* foram realizados utilizando co-culturas de macrófagos/células tumorais. Posteriormente, utilizando monoculturas de macrófagos foram realizadas quantificações de mediadores com potencial citotóxico como NO, ROS e citocinas após exposição dos macrófagos as sub-frações. Foi avaliado, também, o envolvimento de vias macrofágicas intracelulares na produção desses mediadores que poderiam estar moduladas pelos tratamentos. Avaliou-se o efeito de CMS2, sub-fração que apresentou efeito ativador sobre macrófagos, em carcinoma mamário 4T1. Inicialmente, foi padronizado o modelo, para a seguir, determinar o seu efeito sobre o desenvolvimento tumoral. Posteriormente, por ter sido observada redução significativa do tamanho do tumor e do número de metástases pulmonares, avaliou-se a presença de marcadores do fenótipo de macrófagos associados a esse tecido (TAMs - Tumor Associated Macrophages) e de mediadores que possam nele influenciar. Assim, em amostras de tecido tumoral foram avaliados níveis de citocinas imunomodulatórias e a atividade de enzimas macrofágicas, como marcadores do efeito antitumoral/antimetastático de CMS2. Ao final, para melhor observação da importância de TAMs e de sua modulação para tal efeito, foi utilizado um modelo de carcinoma mamário 4T1 acrescido do co-inóculo de macrófagos- M2.

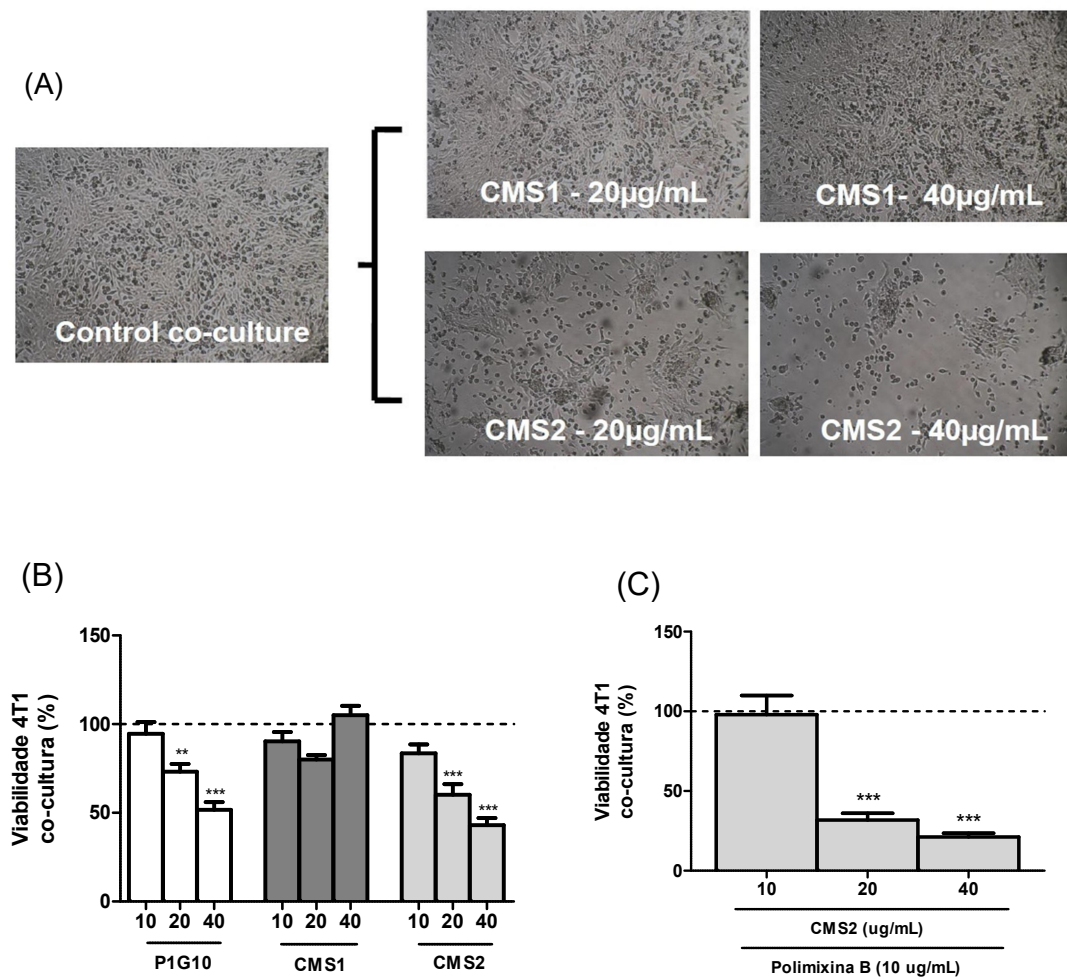
### 5.1 CMS2 induz a capacidade tumoricida de macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais foram obtidos conforme item 4.2.2 e utilizados para avaliação da capacidade tumoricida dos mesmos frente à exposição a P1G10, CMS1 ou CMS2 (10, 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 horas, conforme item 4.2.4. A viabilidade de células 4T1 em co-cultura foi realizada pelo método do MTT, após 40 horas de co-cultura, sendo determinada pela subtração dos valores de D.O. de culturas macrofágicas controles dos valores de D.O. das respectivas co-culturas.

Primeiramente pode-se observar, na figura 1B que o pré-tratamento de culturas de macrófagos com a fração P1G10 nas concentrações de 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$  foi capaz de promover uma redução em torno de 40% ( $p < 0,0001$ ) na viabilidade de células 4T1 em co-cultura ( $73,25 \pm 4,37$  e  $51,65 \pm 4,39\%$ , respectivamente). Com relação as sub-

frações, o pré-tratamento de macrófagos com CMS1 em nenhuma das concentrações utilizadas, 10; 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , foi capaz de promover alteração significativa na viabilidade das mesmas ( $90,30 \pm 5,24$ ;  $80,00 \pm 2,53$  e  $105,03 \pm 5,25\%$ , respectivamente). Já o pré-tratamento com a sub-fração CMS2 reduziu, nas concentrações de 20 ( $60,13 \pm 6,07\%$ ) e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $43,09 \pm 4,01\%$ ), em torno de 50% a viabilidade de células 4T1 ( $p < 0,0001$ ), todos em relação a co-culturas controle ( $97,51 \pm 5,17\%$  - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

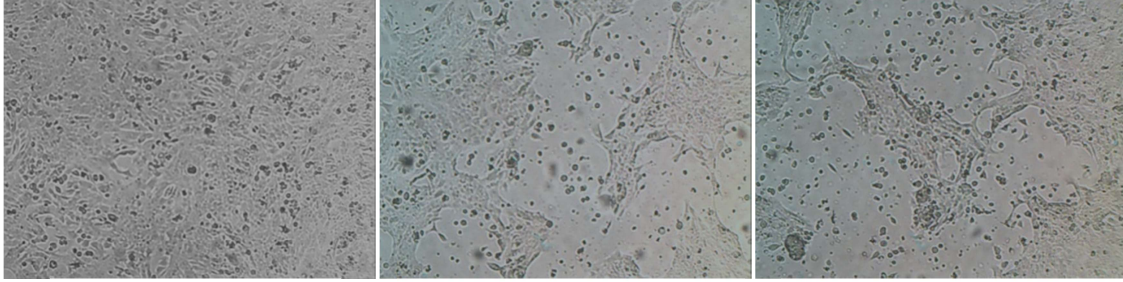
A figura 1C mostra o efeito do pré-tratamento de macrófagos obtidos e cultivados na presença de polimixina B (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e tratados com CMS2. Nas concentrações de 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CMS2 promove uma redução significativa ( $p < 0,0001$ ) de 69 ( $31,78 \pm 4,28\%$ ) e de 79% ( $21,23 \pm 2,27\%$ ), respectivamente, na viabilidade de células 4T1 em relação a co-culturas controle ( $102,51 \pm 12,68\%$  - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).



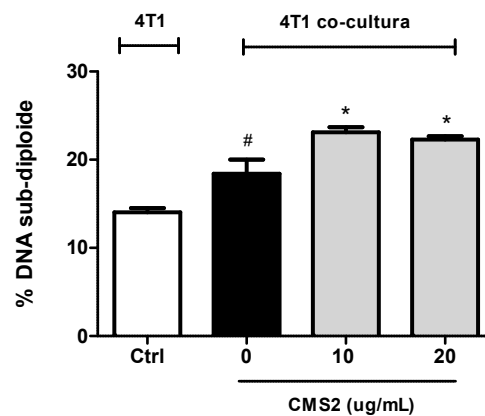
**FIGURA 1: Capacidade tumoricida de macrófagos, expostos a CMS1 ou CMS2, sobre células 4T1.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados em placas de 24 poços (3x10<sup>5</sup> céls/poço) e expostos a CMS1, CMS2 (10- 40µg/mL), controle positivo (P1G10) ou controle negativo (RPMI 1640) por 24 h. Posteriormente, poços contendo macrófagos receberam células 4T1 (10<sup>5</sup>céls/poço). (A) Após 40h de co-cultura as imagens foram obtidas em microscópio óptico invertido (aumento de 20x), (B e C) viabilidade de células 4T1 em co-cultura, porcentagem do controle. Cada coluna representa a porcentagem média de viabilidade de 4T1 ± e.p.m. de 3 experimentos independentes (n=4), sendo que as linhas tracejadas representam 100% de viabilidade celular. Resultados estatisticamente diferentes do controle - \*\*p<0,001 e \*\*\*p<0,0001 (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

Co-culturas de células 4T1 e macrófagos peritoneais foram realizadas em aparatos *transwell* com o objetivo de avaliar a relevância do contato físico com as células-alvo para a capacidade tumoricida de macrófagos expostos a CMS2. A figura 2B mostra um aumento de 4% ( $18,42 \pm 1,58\%$ ) na porcentagem de DNA sub-diplóide presente em células 4T1 co-cultivadas com macrófagos controles em relação a culturas de células tumorais não co-cultivadas ( $14,03 \pm 0,49\%$  DNA sub-diplóide –  $p < 0,05$ ). O conteúdo de DNA sub-diplóide presente em células tumorais encontra-se ainda mais elevado, quando estas são co-cultivadas com macrófagos previamente expostos a CMS2. O aumento é em torno de 5% para os tratamentos com  $10\mu\text{g/mL}$  ( $23,10 \pm 0,58$ ) e com  $20\mu\text{g/mL}$  ( $22,30 \pm 0,36\%$ ), ambos relativos ao conteúdo de DNA sub-diplóide presente em células 4T1 co-cultivadas com macrófagos controles (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls -  $p < 0,05$ ).

(A)



(B)

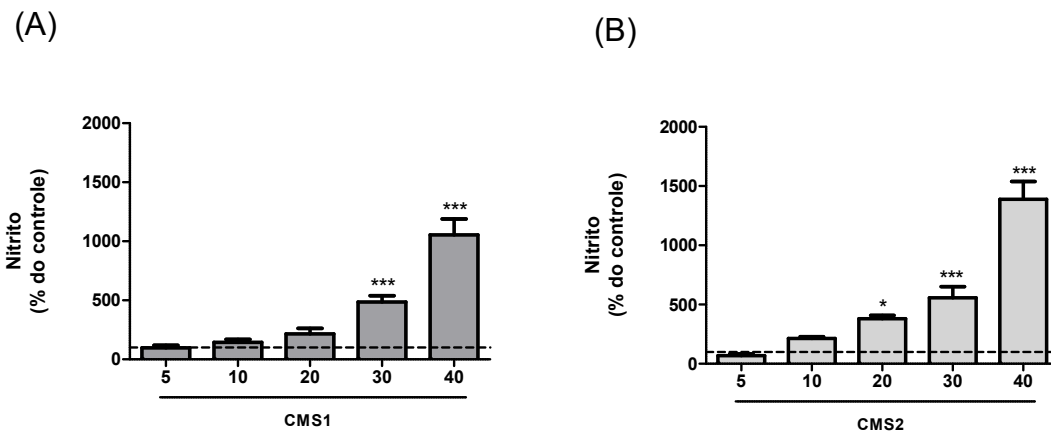


**FIGURA 2: Porcentagem de DNA sub-diplóide presente em células 4T1 co-cultivadas com macrófagos, previamente expostos a CMS2, em aparatos transwell.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados no compartimento superior de aparatos transwell ( $5 \times 10^5$  céls/poço) e expostos por 24 h a CMS2 (10 e  $20 \mu\text{g/mL}$ ) ou controle. Em seguida, (A) a co-cultura foi realizada por 24h e (B) a porcentagem de DNA sub-diplóide determinada pela marcação do núcleo de células 4T1 por iodeto de propídeo ( $50 \mu\text{g/mL}$ ). Cada coluna representa a porcentagem média de DNA sub-diplóide  $\pm$  e.p.m. de 3 experimentos independentes ( $n=4$ ). Sendo, #  $p < 0,05$  e \*  $p < 0,05$  resultados estatisticamente diferentes do grupo controle não co-cultura e do grupo controle co-cultura, respectivamente (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

### 5.3 Atividade tumoricida de macrófagos promovida por mediadores solúveis

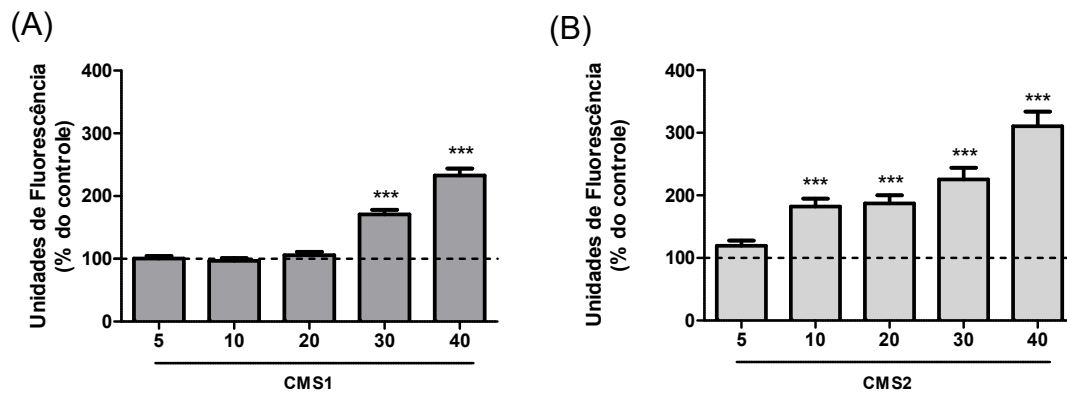
Em sobrenadantes provenientes de culturas de macrófagos pré-expostos as sub-frações foram realizadas quantificação de nitrito. Para isso, macrófagos peritoneais foram obtidos e expostos a CMS1 ou a CMS2. Após 24 horas, os tratamentos foram retirados, um novo meio de cultura introduzido para posterior coleta e dosagem de nitrito, utilizando como método a reação de Griess (Item 4.2.6). Os resultados mostram que tanto CMS1 quanto CMS2 promovem um aumento nos níveis basais de nitrito produzidos por culturas de macrófagos peritoneais. Na figura 3A, podemos perceber que o tratamento com a sub-fração CMS1 promove um aumento em torno de 400 e de 970% nos níveis desse marcador, em relação aos valores encontrados em sobrenadantes de culturas controles ( $0,10 \pm 0,03 \mu\text{M Nitrito}/10^4 \text{ céls}$  - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls), após exposição dos macrófagos as concentrações de 30 ( $485,95 \pm 51,12\%$ ,  $p < 0,0001$ ) e de 40  $\mu\text{g/mL}$  ( $1.054,60 \pm 128,80 \%$ ,  $p < 0,0001$ ), respectivamente. A exposição dos macrófagos a sub-fração CMS2 (Figura 3B) promove aumento nos níveis de nitrito a partir da concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  ( $380,02 \pm 27,41\%$ ,  $p < 0,01$ ), até a concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$  ( $1.388,24 \pm 144,75\%$ ,  $p < 0,0001$ ), passando por aumentos de 450% quando a concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$  foi utilizada ( $556,99 \pm 89,74$ ,  $p < 0,0001$ ).





**FIGURA 3: Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a produção de nitrito por cultura de macrófagos.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados em placas de 96 poços ( $10^5$  céls/poço) e expostos a CMS1, CMS2 (5- 40µg/mL) ou controle (RPMI 1640) por 24 h. Posteriormente, o sobrenadante foi recolhido para determinação de nitrito utilizando-se a metodologia de Griess. Cada coluna representa a porcentagem de nitrito com relação as culturas controle  $\pm$  e.p.m. de 3 experimentos independentes (n=4), sendo que as linhas tracejadas representam 100%. Resultados estatisticamente diferentes do grupo controle - \*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

Nestas mesmas culturas macrofágicas foi realizada a quantificação intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) com auxílio da sonda fluorescente DCFH-DA, conforme item 4.2.6. Os resultados mostram que ambas sub-frações são capazes de promover aumento na produção desses radicais livres. CMS1 promove seus efeitos quando utilizado nas concentrações de 30 e 40 µg/mL (Figura 4A), onde se observa um aumento de 71% ( $170,90 \pm 7,03$  %) e de 133% ( $232,80 \pm 10,51$ %), respectivamente, em relação aos níveis encontrados em culturas controle ( $7.197,47 \pm 916,92 \Delta$  UF/ $10^4$  céls,  $p < 0,0001$ ). Por outro lado, o tratamento com CMS2 promoveu aumentos da produção de ROS nas concentrações entre 10 e 40 µg/mL (Figura 4B). Sendo que o aumento observado para a concentração de 10 µg/mL foi de 82% ( $182,05 \pm 12,21$ %) e de 211% para a concentração de 40 µg/mL ( $310,65 \pm 22,04$ %) em relação aos níveis observados em culturas controle (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls,  $p < 0,0001$ ).



**FIGURA 4: Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio por cultura de macrófagos.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados em placas de 96 poços ( $10^5$  céls/poço) e expostos a CMS1, CMS2 (5-40µg/mL) ou controle (RPMI 1640) por 24 h. Posteriormente, foi determinada a produção de espécies reativas de oxigênio pela adição a cultura de sonda fluorescente (DCFH-DA). Cada coluna representa Unidades de Fluorescência como porcentagem do controle  $\pm$  e.p.m. de 3 experimentos independentes ( $n=4$ ), após 15 minutos de leituras, sendo que as linhas tracejadas representam 100%. Resultados estatisticamente diferentes do grupo controle - \*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

Citocinas classificadas como pró-inflamatórias e/ou pró-angiogênicas foram utilizadas como marcadores da ativação macrófágica. A quantificação das citocinas foi realizada, conforme item 4.2.11, no sobrenadante de culturas de macrófagos após exposição, por 24 horas, a diferentes concentrações de CMS1 ou de CMS2. A quantificação de IL-12 (Figura 5A) revelou que o tratamento com CMS1 promove alterações nos níveis dessa citocina quando utilizado na concentração de 20 µg/mL o qual induz aumento de 181% ( $281,09 \pm 32,05\%$ ,  $p < 0,0001$ ), com relação a níveis encontrados em culturas controle ( $65,36 \pm 10,89$  pg/ $10^5$  cels - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). O tratamento com CMS2 não promoveu alterações significativas ( $p > 0,05$ ) nos níveis de IL-12 produzidos por cultura de macrófagos, nem mesmo na concentração de 20 µg/mL ( $140,36 \pm 17,13\%$ ).

A quantificação de IL-1 $\beta$  (Figura 5B) mostra que, utilizadas na concentração de 20 µg/mL, tanto CMS1 quanto CMS2 são capazes de promover aumentos significativos ( $p < 0,0001$ ) de aproximadamente 590 ( $686,00 \pm 198,27\%$ ) e 760% ( $859,36 \pm 108,15\%$ ), respectivamente, em relação a níveis encontrados em culturas controle ( $0,46 \pm 0,12$  pg/ $10^5$  céls - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Podemos observar que a sub-fração CMS2 induz aumento médio e significativo de 340% ( $p < 0,01$ ) na produção de IL-1 $\beta$ , também, quando utilizada nas concentrações

menores de 5 ( $388,16 \pm 87,51$ ) e 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $487,00 \pm 88,63$  %), sendo  $p < 0,01$  para ambas concentrações.

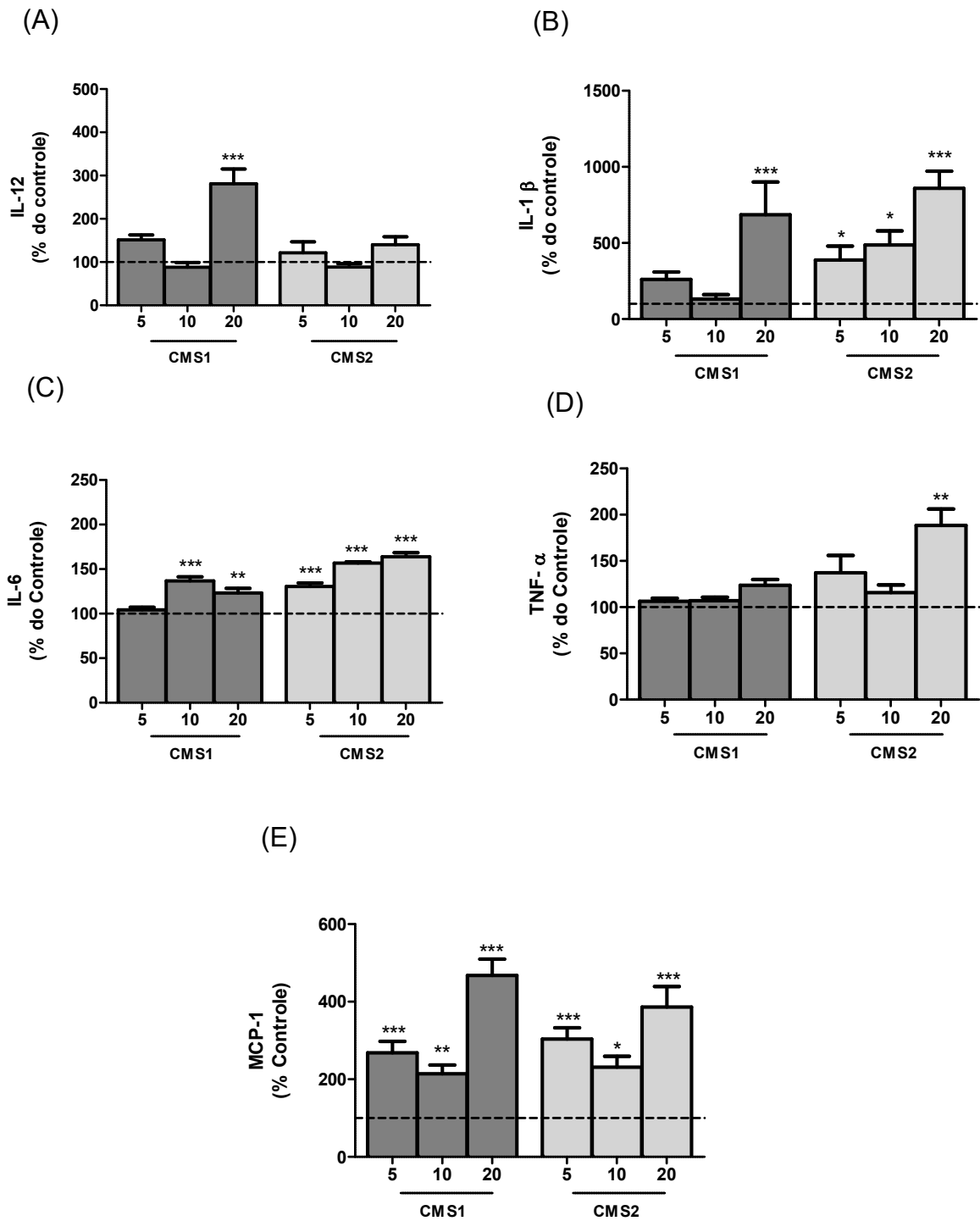
Posteriormente, a dosagem de IL-6 (Figura 5C) revelou que ambas sub-frações são capazes de promover elevações nos níveis dessa citocina em cultura de macrófagos peritoneais. Os valores encontrados foram de  $136,77 \pm 3,93$  e de  $123,33 \pm 4,42\%$  para CMS1 para as concentrações de 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, com valores de  $p < 0,01$ , quando comparados a níveis produzidos por culturas controle ( $32,47 \pm 0,79$   $\text{pg}/10^5$  céls - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Para a sub-fração CMS2, os aumentos nos níveis de IL-6 foram observados a partir da exposição dos macrófagos a concentrações de 5  $\mu\text{g/mL}$  ( $130,52 \pm 3,34$  %) passando por aumentos da ordem de 60% ( $p < 0,0001$ ) para as concentrações de 10 ( $156 \pm 1,25\%$ ) e 20  $\mu\text{g/mL}$  ( $163,85 \pm 3,97\%$ ).

Na figura 5D se observa que CMS2, na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ , é a sub-fração capaz de estimular macrófagos peritoneais a produzirem a citocina TNF- $\alpha$  em quase 2 vezes mais ( $188,36 \pm 16,15\%$  ,  $p < 0,001$ ) os níveis encontrados em culturas macrofágicas controle ( $1.279,14 \pm 47,58$   $\text{pg}/10^5$  céls - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Por outro lado, o tratamento dos macrófagos com CMS1 em nenhuma das concentrações utilizadas, 5; 10 ou 20  $\mu\text{g/mL}$ , foi capaz de promover modificações sobre a produção de tal citocina ( $106,30 \pm 2,85$  ;  $106,91 \pm 3,28$  e  $123,69 \pm 5,30\%$  , respectivamente).

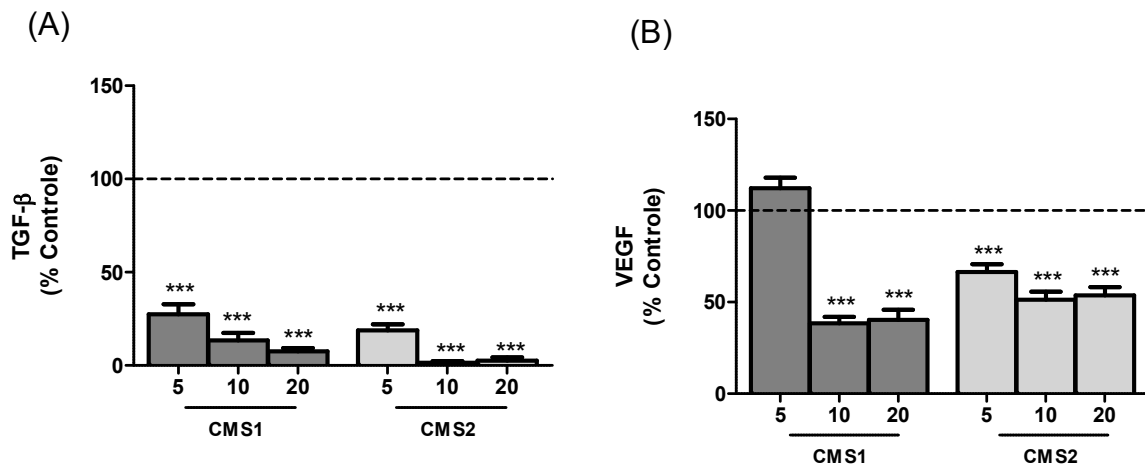
Com relação aos níveis de CCL2/MCP-1 (Figura 5E) se observa elevações nos níveis da mesma em sobrenadante de culturas macrofágicas expostas tanto a CMS1 quanto a CMS2. Os aumentos observados foram em torno de 170 a 370% para o tratamento com CMS1, sendo os valores encontrados de  $268,46 \pm 27,20\%$  para a concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ ; de  $214,48 \pm 20,96\%$  para 10  $\mu\text{g/mL}$  e de  $467,74 \pm 38,87\%$  para 20  $\mu\text{g/mL}$ , quando comparados aos níveis provenientes de culturas controle ( $88,30 \pm 10,95$   $\text{pg}/10^5$  céls - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Já o tratamento com a sub-fração CMS2 promove aumentos nos níveis de CCL2/MCP-1 com valores de  $303,97 \pm 27,50$ ,  $231,08 \pm 26,27$  e de  $386,31 \pm 50,50\%$ , respectivamente, para as mesmas concentrações acima citadas para CMS1.

O tratamento com ambas sub-frações promove redução nos níveis de mediadores pró-angiogênicos como TGF- $\beta$  e VEGF (Figuras 6A e 6B). Sobre os níveis de TGF- $\beta$ , CMS1 promove reduções com valores de  $27,39 \pm 5,03$  para a concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ , de  $13,48 \pm 3,74$  para a de 10  $\mu\text{g/mL}$  e de  $7,59 \pm 1,54$  % para a de 20  $\mu\text{g/mL}$ , todos quando comparados a níveis de culturas controle ( $26,37 \pm 0,70$   $\text{pg}/10^5$  céls,  $p < 0,0001$ - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Já a sub-fração CMS2 promove reduções em torno de 81 a 97%, para as concentrações de 5 ( $18,80 \pm 3,05\%$ ), de 10 ( $1,36 \pm 0,74\%$ ) e de 20  $\mu\text{g/mL}$  ( $2,54 \pm 1,63\%$ ), com valores de  $p < 0,0001$ .

Ambas sub-frações promovem reduções em torno de 40 a 60% nos níveis de VEGF (Figura 6B). CMS1 promove redução significativa somente quando utilizada nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$  ( $38,39 \pm 3,31$  e  $40,33 \pm 5,09\%$  respectivamente,  $p < 0,0001$ ). Por outro lado, CMS2 se mostra capaz de reduzir os níveis desse mediador já na menor concentração utilizada de 5  $\mu\text{g/mL}$  ( $66,40 \pm 4,67\%$ ), passando por reduções da ordem de 49% para a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $51,36 \pm 4,14\%$ ) e de 47% para a de 20  $\mu\text{g/mL}$  ( $53,67 \pm 14,16\%$ ) quando comparados a níveis presentes em sobrenadante de culturas controle ( $7,24 \pm 0,52$   $\text{pg}/10^5$  céls,  $p < 0,0001$ - ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

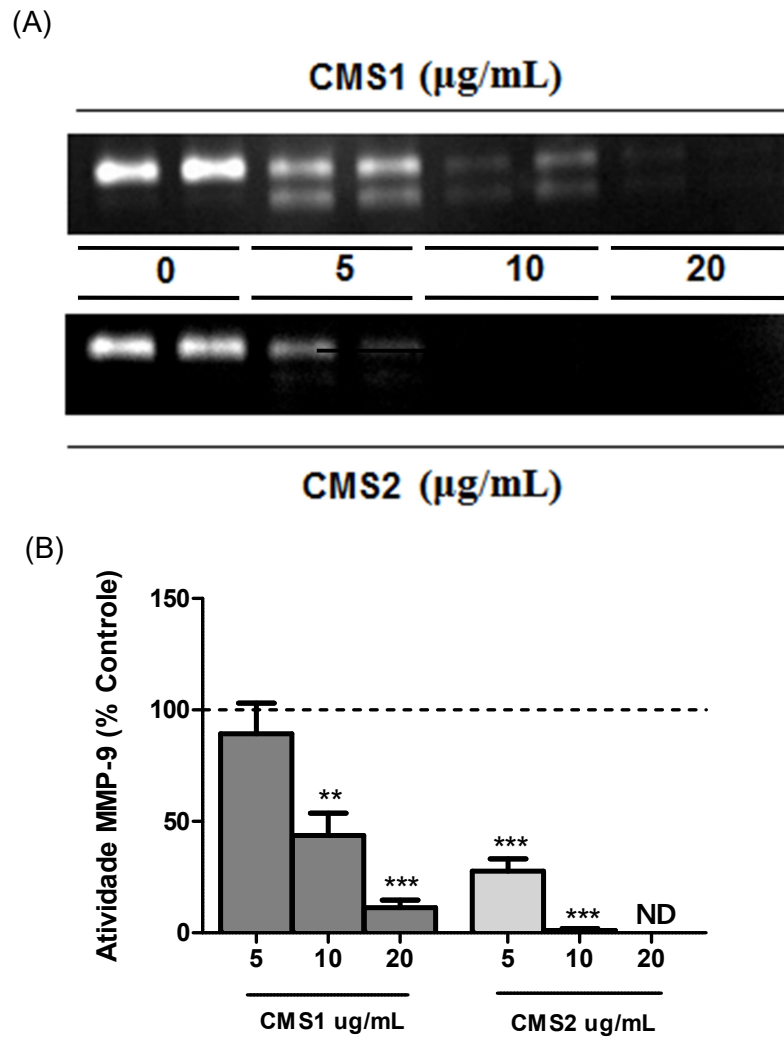


**FIGURA 5: Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios por culturas de macrófagos.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados em placas de 24 poços ( $10^6$  céls/poço) e expostos a CMS1, CMS2 (5-20 μg/mL) ou controle (RPMI 1640) por 24 h. Posteriormente, os poços foram lavados, os tratamentos retirados e adicionado meio de cultivo livre de fatores de crescimento. Após 24h, os sobrenadantes foram recolhidos e nestes quantificadas as respectivas citocinas (A) IL-12p40, (B) IL-1β, (C) IL-6, (D) TNF-α e (E) CCL2/MCP-1. Cada coluna representa a média ± e.p.m. de 3 experimentos independentes (n=4), sendo que as linhas tracejadas representam 100% da produção de citocinas. Resultados estatisticamente diferentes do grupo controle – \* p<0,01; \*\*p<0,001; \*\*\*p< 0,0001 (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).



**FIGURA 6: Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a produção de mediadores pró-angiogênicos por culturas de macrófagos.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados em placas de 24 poços ( $10^6$  céls/poço) e expostos a CMS1, CMS2 (5-20  $\mu$ g/mL) ou controle (RPMI 1640) por 24 h. Posteriormente, os poços foram lavados, os tratamentos retirados e adicionado meio de cultivo livre de fatores de crescimento. Após 24h, os sobrenadantes foram recolhidos e nestes quantificadas as respectivas citocinas (A) TGF- $\beta$ 1 e (B) VEGF. Cada coluna representa a média  $\pm$  e.p.m. de 3 experimentos independentes (n=4), sendo que as linhas tracejadas representam 100% da produção de mediadores. Resultados estatisticamente diferentes do grupo controle - \*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

A figura 7A ilustra a atividade gelatinolítica da metaloprotease específica MMP-9, presente no sobrenadante de culturas macrófágicas, mediante exposição de 24 horas as sub-frações. Após corrida eletroforética em gel de acrilamida/gelatina e análises densitométricas das bandas, os resultados mostram que a exposição dos macrófagos a ambas sub-frações, CMS1 e CMS2, promove uma redução na atividade de MMP-9 (Figura 7B). CMS1 reduziu a atividade desta metaloprotease em 56% ( $43,64 \pm 8,75\%$ ,  $p < 0,001$ ) quando utilizado na concentração de 10  $\mu$ g/mL e em 89% ( $11,32 \pm 2,88\%$ ,  $p < 0,0001$ ), quando na concentração de 20  $\mu$ g/mL, ambas comparadas a atividade observada para culturas controle ( $103,31 \pm 8,34\%$ , ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). CMS2 na concentração de 5  $\mu$ g/mL reduziu em 72% a atividade de MMP-9, proveniente do sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais ( $27,67 \pm 4,99\%$ ,  $p < 0,0001$ ) e em 99% ( $1,12 \pm 0,70\%$ ,  $p < 0,0001$ ) quando utilizado na concentração de 10  $\mu$ g/mL, seguida da não detecção (ND) da atividade dessa enzima quando na presença de 20  $\mu$ g/mL de CMS2.

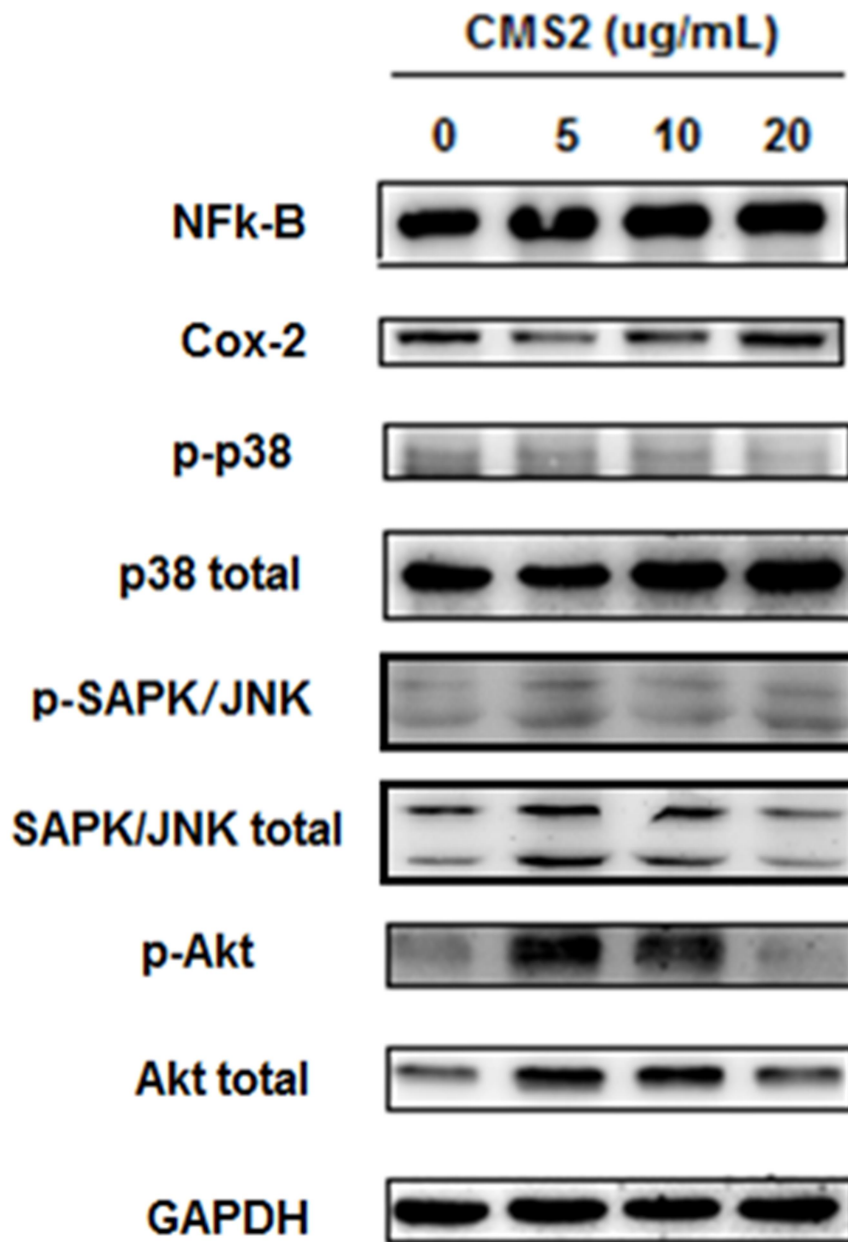


**FIGURA 7: Efeito de CMS1 e CMS2 sobre a atividade de MMP-9 presente no sobrenadante de macrófagos em cultura.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados em placas de 24 poços ( $10^6$  céls/poço) e expostos a CMS1 ou CMS2 (5-20  $\mu\text{g/mL}$ ) ou controle (RPMI 1640) por 24 h. Posteriormente, os poços foram lavados, os tratamentos retirados e adicionado novo meio de cultivo livre de fatores de crescimento. Após 24 h os sobrenadantes foram recolhidos e submetidos (15  $\mu\text{g}$  de proteína) a eletroforese em gel de acrilamida/gelatina. (A) A coloração por azul-brilhante de Coomassie permite a visualização de bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de gelatina de duas replicatas de cada grupo experimental. A análise das bandas foi feita pela quantificação densitométrica com auxílio do programa de análise de imagem ImageJ®. (B) Cada coluna representa a atividade de MMP-9 (% do controle)  $\pm$  e.p.m. de 3 experimentos independentes (n=4). A linha tracejada representa 100% da atividade de MMP-9. Resultados estatisticamente diferentes do grupo controle - \*\*p<0,001; \*\*\*p< 0,0001 (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

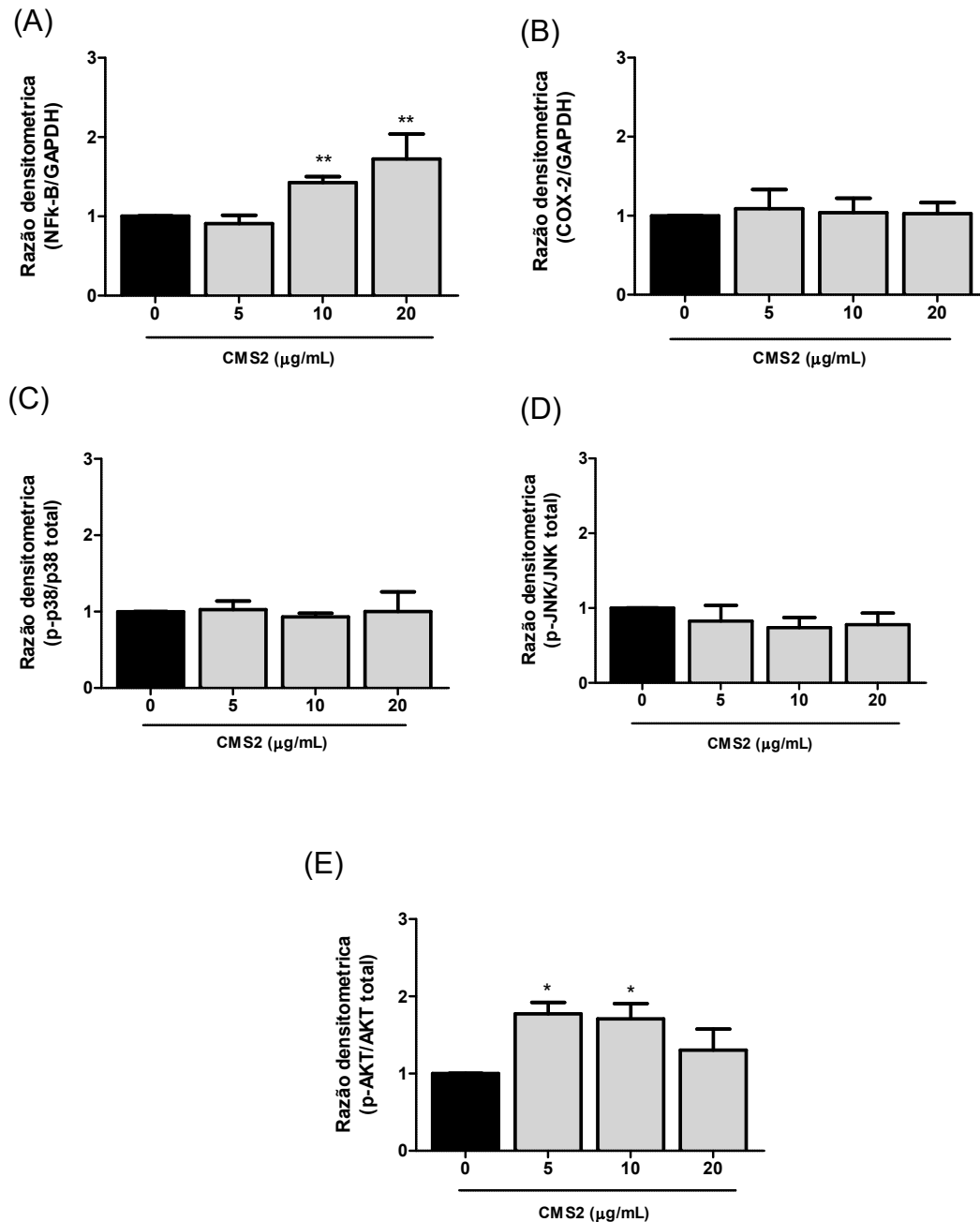
### 5.3 Sinalização intracelular ativada em macrófagos pela sub-fração CMS2

A quantificação de proteínas, como COX-2 e NFk-B e a fosforilação de outras como p-38, SAPK/JNK e Akt, foi realizada por Western Blot a partir do lisado celular total de cultura de macrófagos peritoneais, conforme item 4.2.9. As leituras densitométricas das bandas, ilustradas na figura 8, foram realizadas, normalizadas pela expressão de GAPDH e apresentadas como razão relativa às culturas controle (Figura 9). Os resultados mostram que em nenhuma das concentrações utilizadas, 5, 10 ou 20 $\mu$ g/mL, CMS2 foi capaz de interferir na expressão de COX-2 ( $0,54 \pm 0,21$ ;  $1,04 \pm 0,16$  e  $1,02 \pm 0,11$  - Figura 9B) ou na fosforilação de p-38 ( $1,03 \pm 0,10$ ;  $0,93 \pm 0,04$  e  $1,00 \pm 0,22$  - Figura 9C) e de SAPK/JNK ( $0,82 \pm 0,18$ ;  $0,74 \pm 0,11$  e  $0,78 \pm 0,13$ , respectivamente - Figura 9D), em relação a expressão apresentada por culturas controle (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls). Contudo, o tratamento de macrófagos com CMS2 promove aumento em torno de 40 a 70% ( $p < 0,01$ ) na expressão de NFk-B ( $1,43 \pm 0,07$  e  $1,72 \pm 0,26$ , respectivamente, para as concentrações de 10 e 20 $\mu$ g/mL) (Figura 9A) e em torno de 70% ( $p < 0,05$ ) na fosforilação de Akt ( $1,77 \pm 0,12$  e  $1,71 \pm 0,16$ , para as concentrações de 5 e 10 $\mu$ g/mL) (Figura 9E).





**FIGURA 8: Imagens ilustrativas de bandas proteicas provenientes do lisado de culturas de macrófagos peritoneais e obtidas pela técnica de Western blot.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados em placas de 6 poços ( $6 \times 10^6$  céls/poço) e expostos a CMS2 (5, 10 ou 20 µg/mL) ou controle (RPMI 1640) por 24 h. Após 24 h, na ausência de CMS2, foi realizada a lise celular com tampão apropriado para isolamento de proteínas totais. Foram aplicados 30 µg de proteínas em cada canaleta e as eletroforeses e western blotting desenvolvidos conforme descrito no item 4.2.9. As imagens foram obtidas e analisadas com auxílio do software Image Quant®

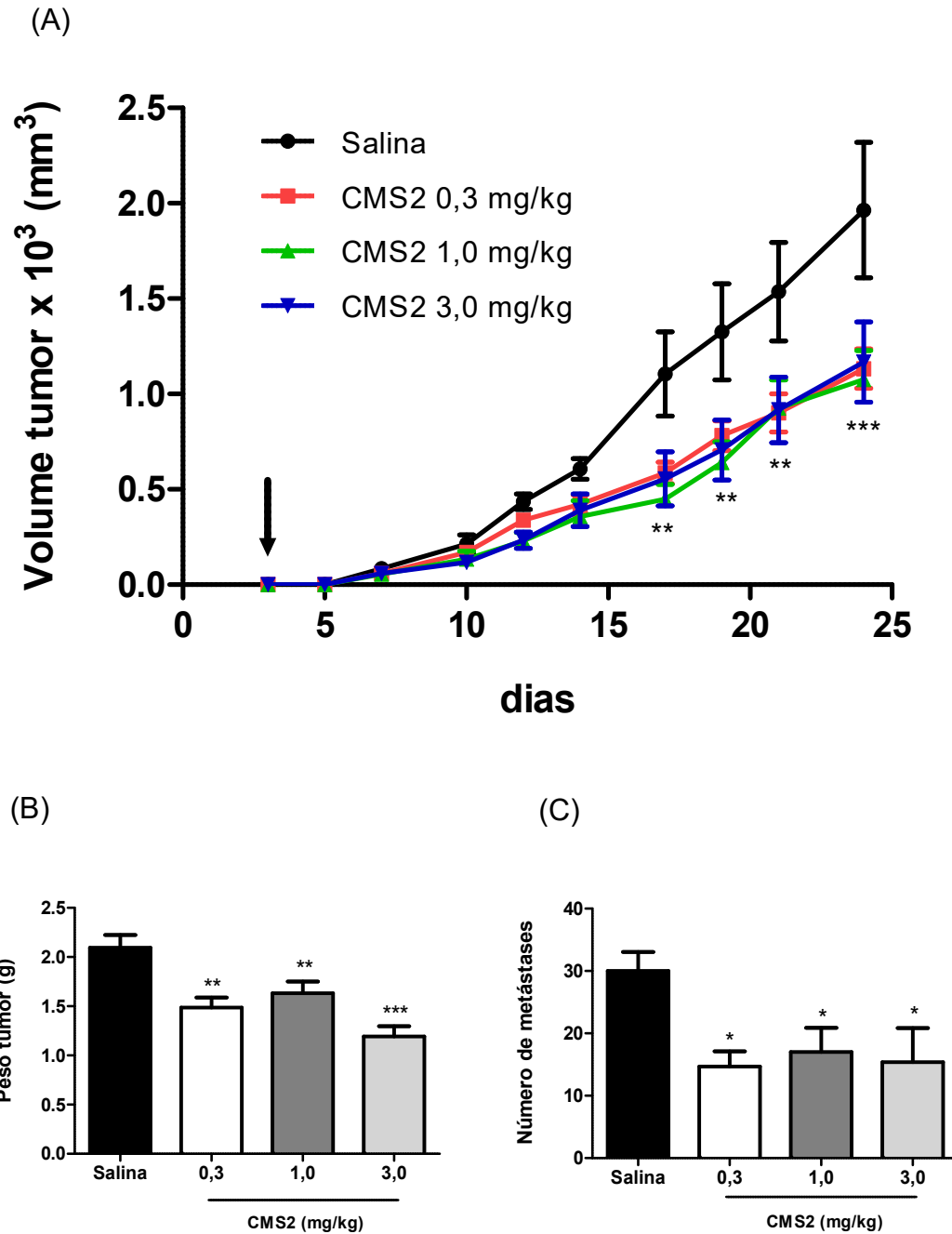


**Figura 9: Efeito de CMS2 sobre a expressão de proteínas intracelulares envolvidas na ativação macrófágica.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados em placas de 6 poços ( $6 \times 10^6$  céls/poço) e expostos a CMS2 (5, 10 ou 20 µg/mL) ou controle (RPMI 1640) por 24 h. Após 24 h, na ausência de CMS2, foi realizada a lise celular com tampão apropriado para isolamento de proteínas totais. Foram aplicados 30 µg de proteínas em cada canaleta e as eletroforeses e western blotting desenvolvidos conforme descrito no item 4.2.9. Os resultados para a expressão de NFκ-B (A), COX-2 (B) foram normalizados pela expressão de GAPDH. Os resultados para a expressão de p-p38 (C), p-JNK (D) e p-Akt (E) foram normalizados pela expressão das respectivas proteínas totais e apresentados todos como razão relativa às culturas controles. Cada coluna representa média  $\pm$  e.p.m. de 4 experimentos independentes realizados com pool celulares. \* Indicam resultados estatisticamente diferentes do grupo que não recebeu CMS2, sendo \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  (ANOVA seguido do pós-teste Student Newman Keuls,  $p < 0,05$ ).

#### **5.4 Atividade antitumoral/antimetastática de CMS2 sobre modelo de carcinoma de mama 4T1**

A partir de ensaios *in vivo*, o modelo de tumor de mama 4T1 foi estabelecido e padronizado (Apêndice C) para posterior avaliação da atividade antitumoral de CMS2, conforme item 4.2.10. Os resultados mostram que pelo acompanhamento do volume tumoral (Figura 10A), os efeitos de redução do tumor por CMS2 se iniciam após 14 dias de tratamento ou após 17 dias de desenvolvimento tumoral, para as doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg ( $0,59 \pm 0,05$ ;  $0,45 \pm 0,07$  e  $0,55 \pm 0,13$  mm<sup>3</sup> –  $p < 0,01$ , respectivamente) quando comparados ao volume de tumores de animais controle ( $1,11 \pm 0,20$  mm<sup>3</sup> – Two-way-ANOVA, pós-teste Bonferroni).

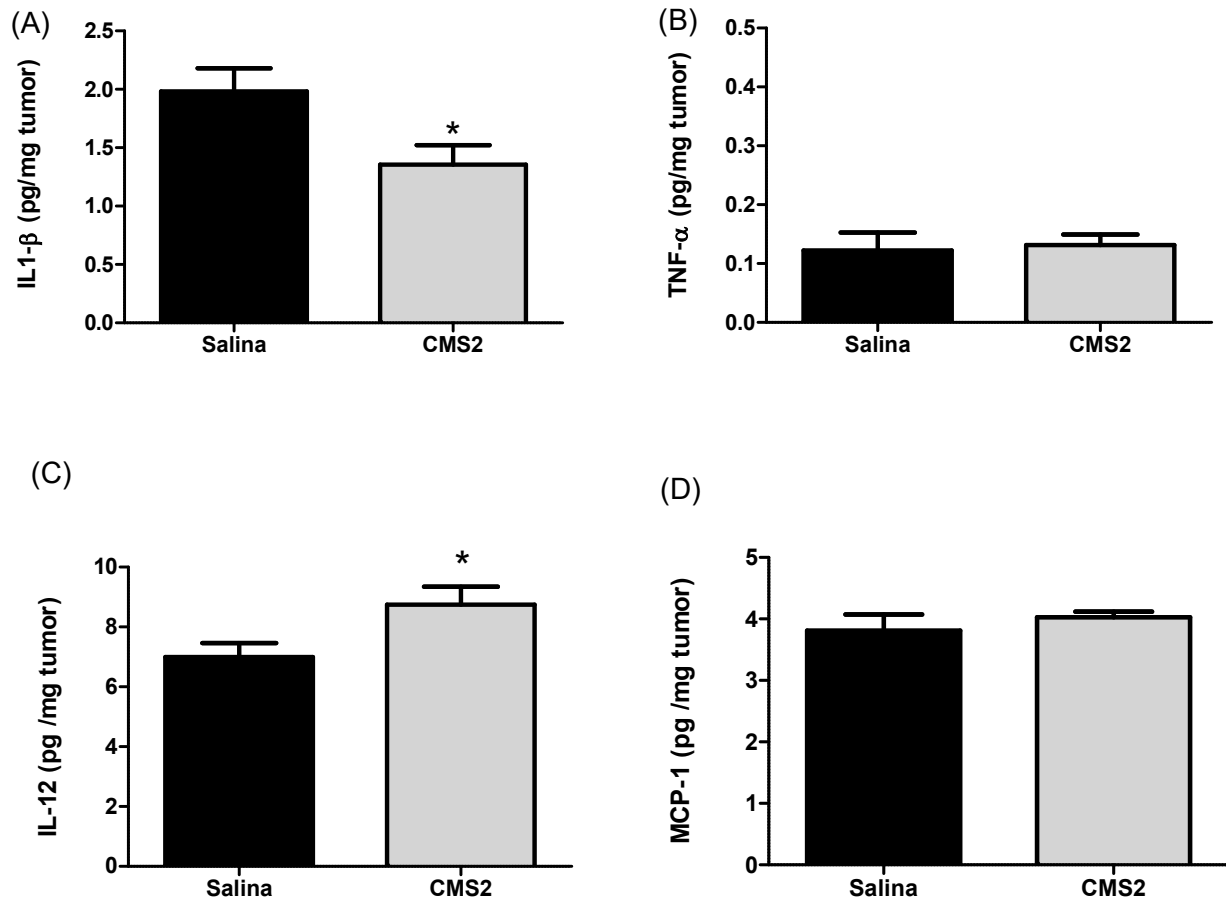
No 25<sup>o</sup> dia após o inóculo observa-se que o tratamento com CMS2 impede o crescimento dos tumores em 29% ( $1,49 \pm 0,09$  -  $p < 0,01$ ), 22% ( $1,63 \pm 0,11$  -  $p < 0,01$ ) e em 43% ( $1,19 \pm 0,10$  gramas -  $p < 0,001$ ) (Figura 10B) e de metástases pulmonares em 51% ( $14,7 \pm 2,2$  -  $p < 0,05$ ), 43% ( $17,0 \pm 3,5$  -  $p < 0,05$ ) e em 49% ( $15,4 \pm 4,9$  unidades -  $p < 0,05$ ), nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, respectivamente (Figura 10C), quando comparados ao peso de tumores ( $2,09 \pm 0,12$  gramas) e ao número de metástases ( $30,0 \pm 2,7$  unidades) apresentados por animais portadores do carcinoma e tratados com salina (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).



**FIGURA 10: Efeito de CMS2 sobre o desenvolvimento do carcinoma de mama 4T1 em camundongos BALB/c.** Camundongos BALB/c fêmeas receberam no flanco esquerdo inóculo de células 4T1 ( $10^6$  céls/100  $\mu$ L). (A) O crescimento tumoral foi acompanhado, do 1<sup>o</sup> ao 24<sup>o</sup> dia, com auxílio de um paquímetro, através da medida do volume dos tumores. A seta indica o início dos tratamentos. (B) Massa dos tumores após 22 dias de tratamento diário com salina ou CMS2 (0,3; 1,0 e 3,0mg/kg). (C) Número de metástases pulmonares contabilizados em pulmões corados com tinta nanquim. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m de no mínimo 6 animais/grupo. \* Indicam resultados estatisticamente diferentes dos animais tratados com salina, sendo \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  (One- Way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

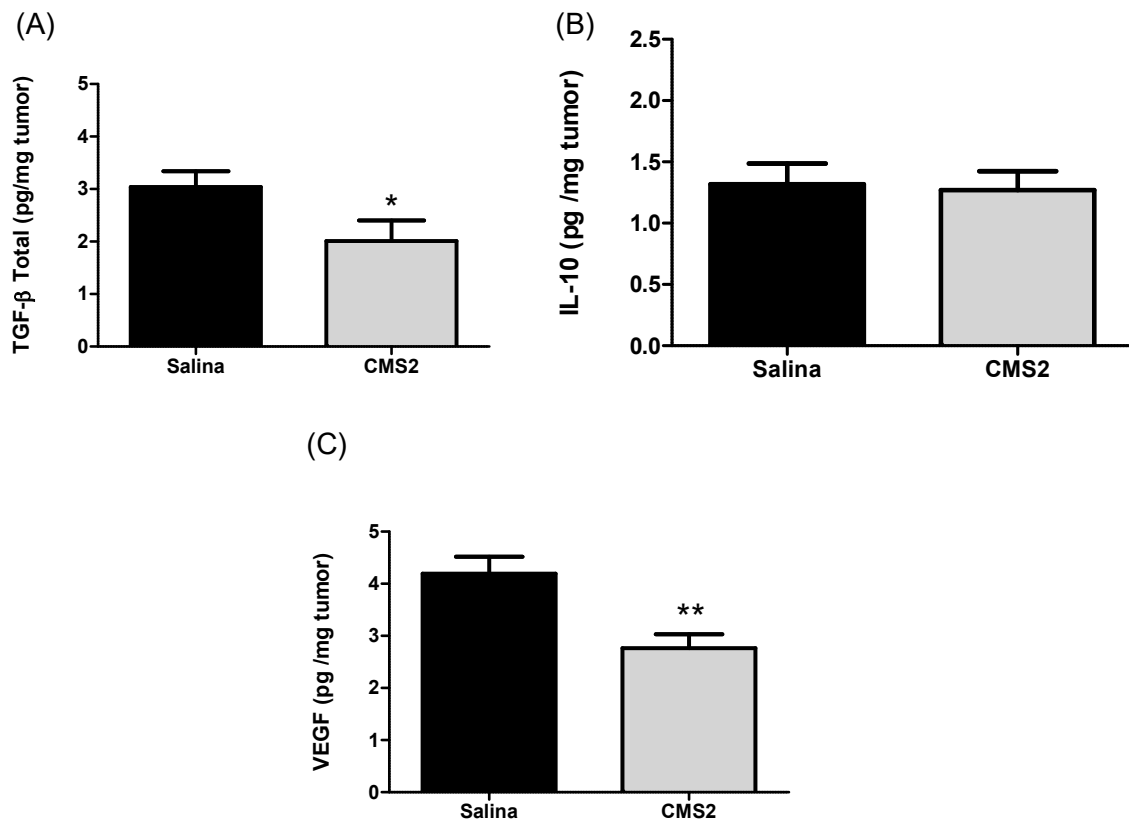
### 5.5 Modulação por CMS2 de mediadores presentes no microambiente tumoral

Nos tecidos tumorais foram quantificadas citocinas inflamatórias e/ou imunoregulatórias e enzimas, como metaloproteases e NAG, que estariam envolvidas no remodelamento do seu microambiente. As figuras 11 e 12 mostram que os níveis de IL-1 $\beta$  (Figura 11A), TGF-  $\beta$  (Figura 11B) e VEGF (Figura 12C) presentes em tumores de animais portadores do carcinoma 4T1 e tratados com a sub-fração CMS2, encontram-se reduzidos em 31% ( $1,36 \pm 0,15$  pg/mg tumor,  $p < 0,05$ ), em 34% ( $2,01 \pm 0,35$  pg/mg tumor,  $p < 0,05$ ) e em 34% ( $2,76 \pm 0,24$  pg/mg tumor,  $p < 0,05$ ), respectivamente, quando comparados aos níveis encontrados em tumores provenientes de animais portadores do carcinoma e tratados com salina ( $1,98 \pm 0,19$  ;  $3,04 \pm 0,28$  ;  $4,19 \pm 0,30$  pg/mg tumor, respectivamente – Teste t de Student). Por outro lado, o tratamento dos animais com a sub-fração CMS2 não promove alterações nos níveis intratumorais de TNF- $\alpha$  ( $0,13 \pm 0,02$  pg/mg tumor - Figura 11B), de IL-10 ( $1,27 \pm 0,14$  pg/mg tumor - Figura 12B) e de CCL2/MCP-1 ( $4,02 \pm 0,08$  pg/mg tumor - Figura 11D) quando comparados aos respectivos níveis, presentes em tumores de animais controle ( $0,12 \pm 0,03$  ,  $1,32 \pm 0,15$  e  $3,81 \pm 0,25$  pg/mg tumor – Teste t de Student). Com relação a modulação dos níveis de IL-12 (Figura 11C), o tratamento dos animais com a sub-fração CMS2 é capaz de elevar, em 25%, os níveis intratumorais da mesma ( $8,75 \pm 0,54$  pg/mg tumor,  $p < 0,05$ ), quando comparado a níveis de tumores provenientes de animais tratados com salina ( $6,99 \pm 0,42$  pg/mg tumor – Teste t de Student).



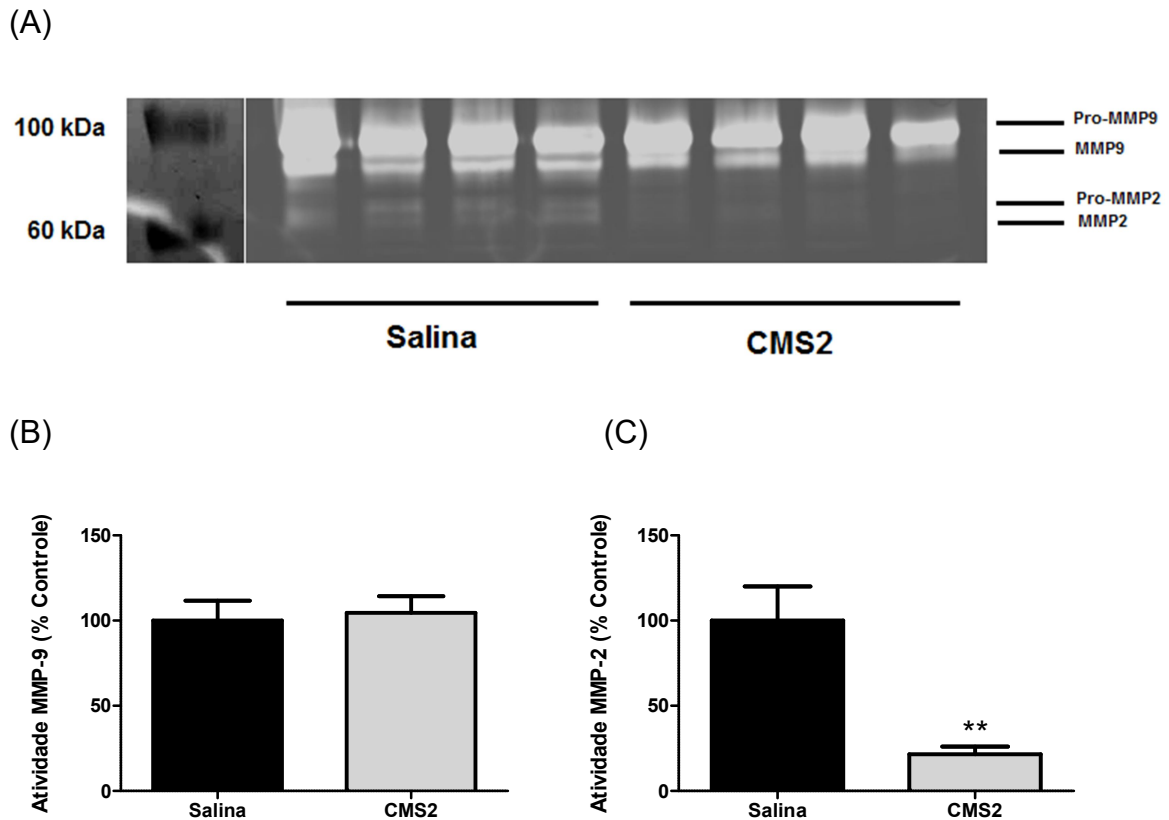
**FIGURA 11: Efeito de CMS2 sobre os níveis intratumorais de mediadores pró-inflamatórios.**

Camundongos BALB/c fêmeas portadores do carcinoma 4T1, tratados por 22 dias com salina (controle) ou CMS2 (3 mg/kg) foram sacrificados, tiveram os tumores retirados, fracionados e macerados em solução apropriada para a dosagem de citocinas. Em (A) os níveis de IL-1 $\beta$ , (B) de TNF- $\alpha$ , (C) de IL-12, e (D) de CCL2/MCP-1. Cada coluna representa a média  $\pm$  e.p.m. de no mínimo 6 animais/grupo. Resultados estatisticamente diferentes do grupo salina - \* $p < 0,05$ ; Teste t de Student.



**FIGURA 12: Efeito de CMS2 sobre os níveis intratumorais de mediadores anti- inflamatórios e/ou pró-angiogênicos.** Camundongos BALB/c fêmeas portadores do carcinoma 4T1, tratados por 22 dias com salina (controle) ou CMS2 (3 mg/kg) foram sacrificados, tiveram os tumores retirados, fracionados e macerados em solução apropriada para a dosagem de citocinas. Em (A) os níveis de TGF- $\beta$ , (B) de IL-10 e (C) de VEGF. Cada coluna representa a média  $\pm$  e.p.m. de no mínimo 6 animais/grupo. Resultados estatisticamente diferentes do grupo salina - \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; Teste t de Student.

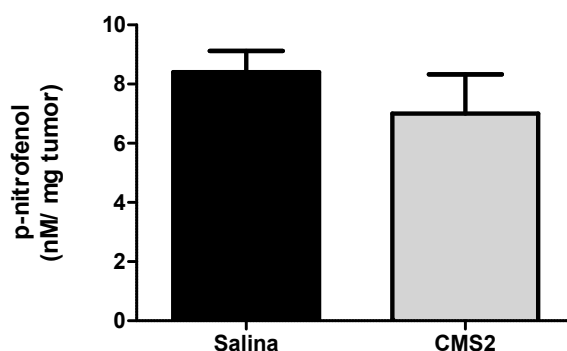
A atividade de metaloproteases foi determinada no tecido tumoral de animais portadores do carcinoma 4T1 tratados, ou não, com CMS2 (3mg/kg), conforme item 4.2.8. A análise densitométrica das bandas geradas pela degradação do substrato de gelatina, ilustradas na figura 13A, mostra que o tratamento dos animais com a sub-fração CMS2 não promove alteração na atividade intratumoral de MMP-9 ( $104,60 \pm 8,98$ ) (Figura 13B) quando comparada a essa atividade em tumores de animais tratados com salina ( $100,00 \pm 10,97$  - Teste t de Student). Com relação a atividade de MMP-2 podemos observar, na figura 13C, que o tratamento com a sub-fração foi capaz de inibir em 79% a atividade da mesma ( $21,62 \pm 4,03$ ,  $p < 0,01$ ) com relação a apresentada por tumores provenientes de animais controle ( $100,00 \pm 18,79$  - Teste t de Student).



**FIGURA 13: Efeito de CMS2 sobre a atividade intratumoral de metaloproteases (MMPs).** Camundongos BALB/c fêmeas portadores do carcinoma 4T1, tratados por 22 dias com salina (controle) ou CMS2 (3 mg/kg) foram eutanasiados, tiveram os tumores retirados, fracionados e macerados em solução apropriada para determinação da atividade de metaloproteases. Em seguida, os sobrenadantes dos homogenatos foram recolhidos e submetidos (15ug de proteína) a eletroforese em gel de acrilamida/gelatina. (A) Imagem representativa do gel, mostra a coloração por azul-brilhante de Coomassie que permite a visualização de bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de gelatina. Cada canaleta representa a proteólise proveniente da amostra de um animal, sendo que foram confeccionados um total de dois géis. A quantificação densitométrica das bandas foi realizada com auxílio do programa de análise de imagem ImageJ®. Em (B) e (C) atividades de MMP-9 e de MMP-2, respectivamente. Cada coluna representa a média  $\pm$  e.p.m. de no mínimo 6 animais/grupo. Resultados estatisticamente diferentes do grupo salina - \*\*  $p < 0,01$ ; Teste t de Student.

Os ensaios para determinação da atividade intratumoral de NAG (Figura 14) revelaram que o tratamento dos animais com a sub-fração CMS2 não promove alterações significativas na atividade dessa enzima ( $7,00 \pm 1,23$ ,  $p > 0,05$ ) quando comparada a atividade de tumores provenientes de animais tratados com salina ( $8,40 \pm 0,66$  nM/mg tumor- Teste t de Student).

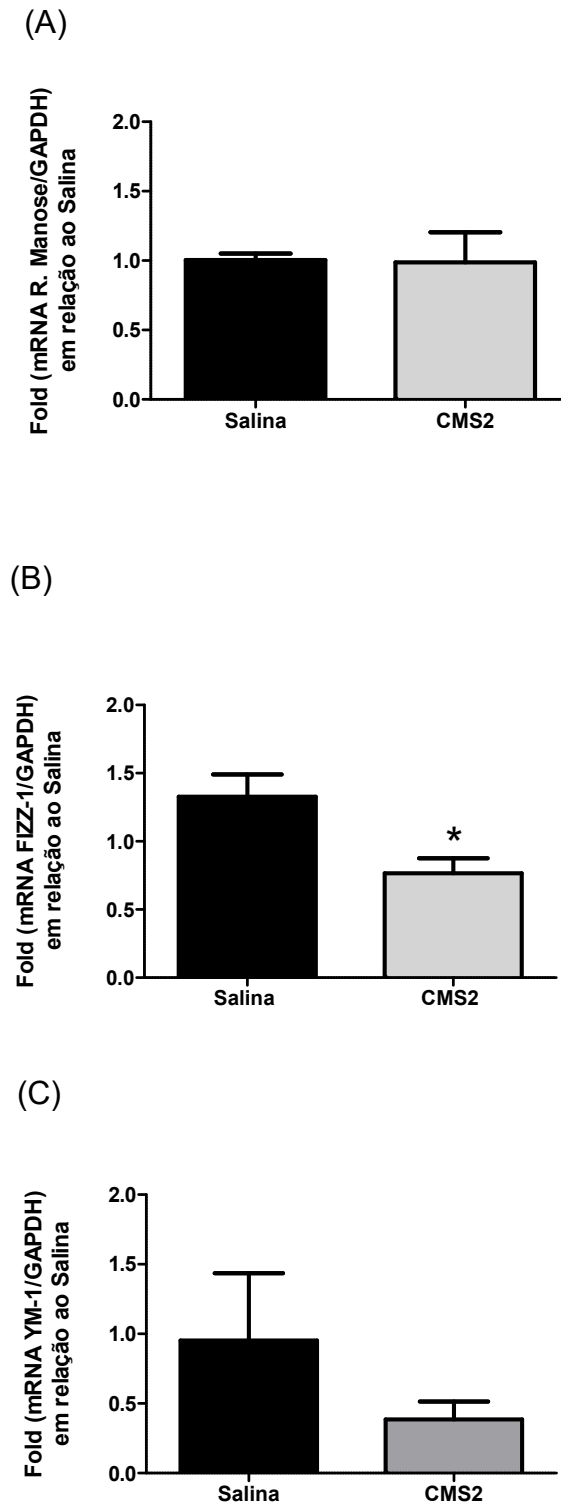




**FIGURA 14: Atividade intratumoral de NAG após tratamento com CMS2.** Camundongos BALB/c fêmeas portadores do carcinoma 4T1, tratados por 22 dias com salina (controle) ou CMS2 (3 mg/kg) foram eutanasiados, tiveram os tumores retirados, fracionados e macerados em solução apropriada para determinação da atividade de N-acetil- $\beta$ -glicosaminidase. Para determinação da atividade de NAG, os sobrenadantes dos homogenatos foram recolhidos e submetidos a uma reação enzimática colorimétrica na presença do substrato p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase. Os resultados foram expressos em nM de p-nitrofenol/mg de tumor. Os dados representam média  $\pm$  e.p.m., Teste-t de Student.

### 5.6 Efeito da sub-fração CMS2 sobre a expressão de genes envolvidos na caracterização fenotípica de macrófagos.

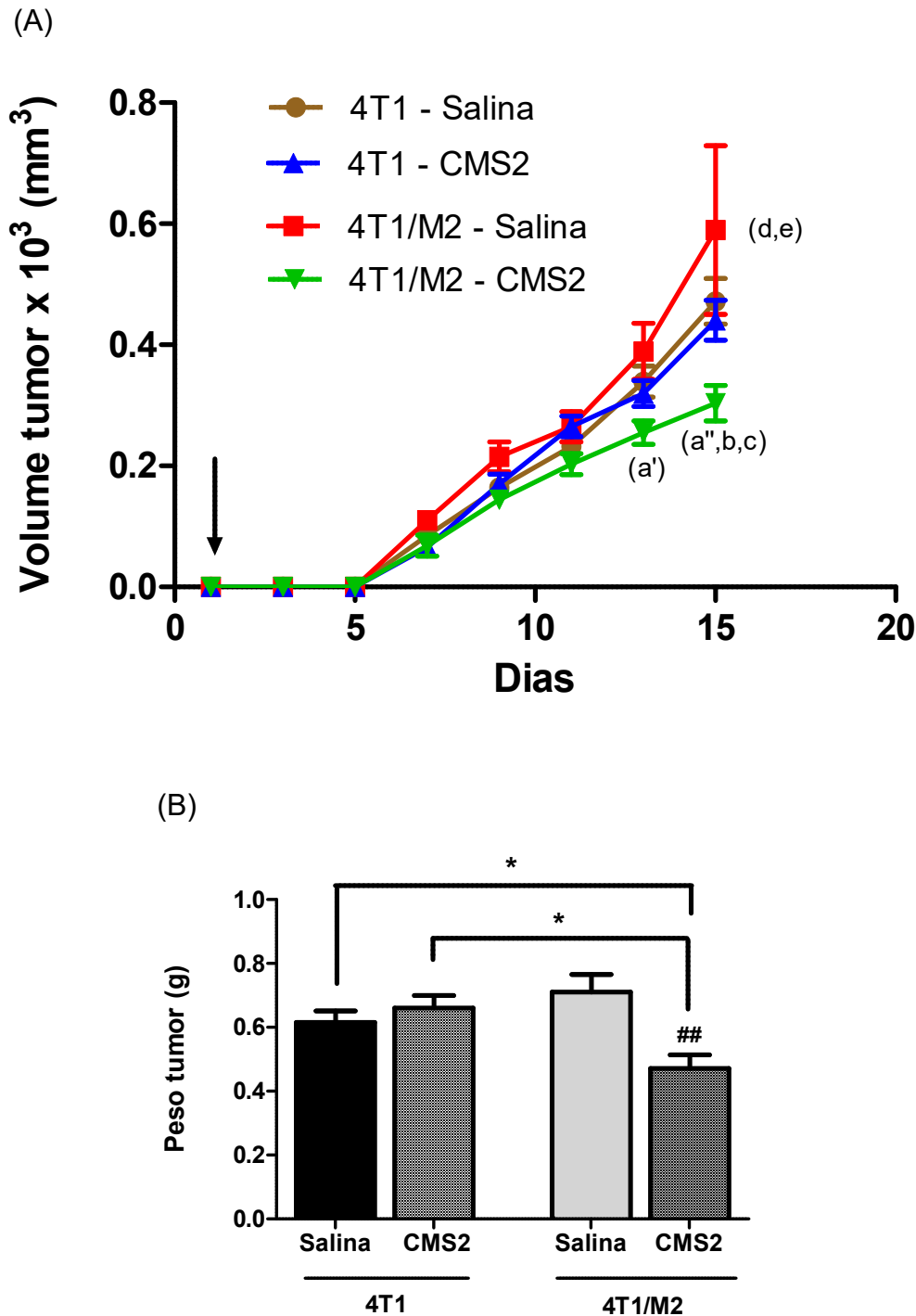
A expressão de mRNA para os genes codificadores do receptor de manose, de FIZZ-1 e de YM-1 foi avaliada através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Para isso os valores foram normalizados em relação ao grupo de animais que receberam salina como tratamento, e expressos como *Fold changes*. Os resultados mostram que o tratamento dos animais com a sub-fração CMS2 promove redução de 42% ( $0,77 \pm 0,09$ ,  $p < 0,05$ ) na expressão intratumoral de mRNA para o FIZZ-1 (Figura 15B), quando comparado as expressões apresentadas por tumores de animais tratados com salina ( $1,33 \pm 0,15$  - Teste t de Student). Sobre as expressões de mRNA para os genes codificadores do MR ( $0,99 \pm 0,20$ ) (Figura 15A) e de YM-1 ( $0,39 \pm 0,11$ ) (Figura 15C), pode-se observar que o tratamento com CMS2 não promove alterações significativas nas mesmas (sendo,  $p > 0,05$ ) em relação a expressões apresentadas por tumores de animais controles  $1,00 \pm 0,04$  e  $0,95 \pm 0,42$  *Fold changes*, respectivamente - Teste-t de Student).



**FIGURA 15: Efeito de CMS2 sobre a expressão intratumoral de genes indicativos do fenótipo de TAMs.** Camundongos BALB/c fêmeas portadores do carcinoma 4T1, tratados por 22 dias com salina (controle) ou CMS2 (3 mg/kg) foram sacrificados, tiveram os tumores retirados e processados, conforme item 4.2.13, para análise por PCR em tempo real da expressão de genes específicos. (A) Receptor para manose, (B) FIZZ-1 e (C) Ym-1. Os dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de unidades arbitrárias corrigidas para a expressão do gene para GAPDH e normalizadas para o grupo Salina. \* indica resultado estatisticamente diferente do grupo salina, com  $p < 0,05$ . Teste t de Student.

### 5.7 Atividade antitumoral de CMS2 em modelo de carcinoma 4T1/M2

No modelo de carcinoma 4T1/M2, macrófagos M2 obtidos por diferenciação *ex-vivo* (Conforme item 4.2.15) foram co-inoculados com células da linhagem tumoral 4T1 no flanco esquerdo de camundongos Balb/C fêmeas. Grupos de animais inoculados somente com a linhagem 4T1 foram utilizados como controles experimentais. Comparando-se o peso de carcinomas 4T1 provenientes de animais tratados com salina ( $0,61 \pm 0,03$  g) e os tratados com CMS2 ( $0,66 \pm 0,04$  g), não há diferença estatística entre os grupos. Ao compararmos o peso de carcinomas 4T1/M2 de animais salina-tratados ( $0,71 \pm 0,05$  g) e os CMS2-tratados ( $0,47 \pm 0,04$  g), observamos que o tratamento com a sub-fração impede o crescimento deste carcinoma em 33% ( $p < 0,01$ ). Quando se compara o peso de tumores de animais que receberam a linhagem 4T1 ( $0,61 \pm 0,03$  g) com os que receberam o co-inóculo 4T1/M2 ( $0,71 \pm 0,05$  g), ambos grupos salina-tratados, observa-se um aumento de 15% no peso médio dos tumores provenientes do co-inóculo, porém, esse aumento não foi estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ). Além disso, o peso dos tumores de animais portadores do carcinoma 4T1/M2 e CMS2-tratados são em torno de 28% menores ( $0,47 \pm 0,04$  g) que o de animais portadores do carcinoma 4T1 e, também, tratados com a sub-fração ( $0,66 \pm 0,04$  g) (Figura 16B).



**FIGURA 16: Efeito de CMS2 sobre o desenvolvimento do carcinoma 4T1/M2 em camundongos BALB/c.** Camundongos BALB/c fêmeas receberam no flanco esquerdo inóculo de células 4T1 ( $10^6$  céls/50  $\mu$ L) juntamente com M $\phi$ -M2 ( $2 \times 10^5$  céls/50  $\mu$ L), diferenciados *in vitro*. (A) O crescimento tumoral foi acompanhado, do 1<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dia, através da medida de volume dos tumores com auxílio de um paquímetro. A seta indica o início do tratamento. Sendo, a: 4T1 + Mos (Salina) vs. 4T1 + Mos (CMS2 1,0 mg/Kg),  $a' p < 0,05$ ;  $a'' p < 0,01$ ; b: 4T1 (Salina) vs. 4T1 + Mos (CMS2 1,0mg/Kg),  $p < 0,001$ ; c: 4T1 (CMS2 1,0mg/Kg) vs. 4T1 + Mos (CMS2 1,0mg/Kg),  $p < 0,01$ ; d: 4T1 (Salina) vs. 4T1 + Mos (Salina),  $p < 0,05$ ; e: 4T1 + Mos (Salina) vs. 4T1 (CMS2 1,0mg/Kg),  $p < 0,01$  (Two-Way ANOVA, pós teste Bonferroni). (B) Massa dos tumores após 15 dias da inoculação celular. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m da massa ou volume tumoral de no mínimo 6 animais/grupo. \* Indica resultados estatisticamente diferentes dos animais portadores do carcinoma 4T1, com  $p < 0,05$ . ## Indica resultado estatisticamente diferente dos animais portadores do carcinoma 4T1/M2 e tratados com salina, com  $p < 0,01$  (One- Way ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

## 6. DISCUSSÃO

Estudos prévios mostram que a atividade antitumoral das proteases contidas na fração P1G10, proveniente do látex de *V. cundinamarcensis*, sobre o carcinoma inflamatório murino 4T1 está associada à redução da inflamação no tumor e ao aumento da atividade intratumoral da enzima macrófaga, N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) (BRAGA *et al.*, 2013). Estudos *in vitro* mostram que macrófagos expostos a essa fração apresentam atividade citotóxica sobre células 4T1 em modelo de co-cultura (BRAGA, 2013).

Sabe-se, também, que a sub-fração CMS2 de P1G10 (obtida por separação cromatográfica em coluna CM-Sephadex C-25) é a responsável por inibir, em modelos murinos de melanoma e de cólon, a massa tumoral e a formação de pontos metastáticos (LOPES *et al.*, 2010)

Dessa maneira, foi avaliado o efeito, *in vitro*, das sub-frações CMS1 e CMS2 sobre a modulação fenotípica de macrófagos, assim como, a produção de mediadores e a ativação de vias intracelulares macrófagas desencadeadas pelos tratamentos. Na sequência, avaliou-se a atividade antitumoral/antimetastática da fração ativa (CMS2) e o seu efeito modulatório sobre o fenótipo de macrófagos associados a tumores (TAMs, do inglês *Tumor associated-macrophages*).

### 6.1 Ativação *in vitro* de macrófagos pelas sub-frações CMS1 e CMS2.

Neste trabalho observa-se que a pré-exposição de macrófagos peritoneais à sub-fração de P1G10, CMS2 (20 e 40  $\mu$ g/ml), e não CMS1, aumenta de forma significativa a citotoxicidade destes sobre a linhagem de carcinoma mamário murino 4T1, ao reduzir em torno de 50% a viabilidade dessas células em co-cultura (Figura 1A e 1B). Diante disso, sugere-se que proteínas contidas em CMS2 seriam as responsáveis pelo efeito tumoricida de macrófagos, previamente observado pelo tratamento com a fração total P1G10 (BRAGA *et al.*, 2013).

A atividade tumoricida de macrófagos foi originalmente mostrada pela indução de dois potentes sinais seqüenciais interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e lipopolissacarídeos (LPS) (PACE & RUSSELL, 1981). Posteriormente, estudos mostraram que várias outras citocinas e/ou quimiocinas (CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL2/MCP-1), fatores de crescimento

como o fator estimulador de colônias para granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), moléculas sintéticas e análogos de parede bacteriana podem induzir tal ativação em macrófagos (MURRAY *et al.*, 2014). Sabe-se que moléculas de LPS presentes em preparações de cultivo celular como contaminantes, em concentrações mínimas da ordem de 100 ng/mL, podem ativar macrófagos peritoneais (XIAO-XIAO *et al.*, 2017). Experimentos de co-cultura foram realizados na presença de polimixina B (10 µg/mL) com o objetivo de investigar a possível participação de moléculas de LPS na ativação macrofágica promovida por CMS2. A molécula de polimixina B se apresenta como um agente catiônico com extensa cauda hidrofóbica capaz de se ligar avidamente à porção lipídica de fragmentos de LPS neutralizando suas características endotóxicas (MORRISON & JACOBS, 1976; LANDMAN *et al.*, 2008; XIAO-XIAO *et al.*, 2017). Sabe-se que polimixina B, quando utilizada na concentração de 10 µg/mL, é capaz de anular os efeitos promovidos por LPS em concentração de até 1000 ng/mL (XIAO-XIAO *et al.*, 2017). Essa concentração de polimixina B, no entanto, não afetou a atividade citotóxica de macrófagos pré-expostos à sub-fração, mostrando que o efeito de CMS2 parece ocorrer, independentemente, da presença de LPS (Figura 1C).

Macrófagos através da produção e da liberação de mediadores solúveis podem promover a morte de células alvo independentemente do contato físico e/ou de fagocitose. Sendo assim, realizamos experimentos de culturas de macrófagos e de células tumorais em compartimentos distintos (superior e inferior, respectivamente) de aparatos "*transwell*" e que foram, posteriormente, co-cultivados (Figura 2A). Os resultados mostram que mesmo sem o contato físico, entre ambos os tipos celulares, macrófagos expostos à CMS2 são capazes de promover a morte de células tumorais com aumento (em torno de 23%) no conteúdo de DNA sub-diplóide destas últimas (Figura 2B). Esses dados levaram a investigação dos prováveis mediadores citotóxicos secretados por macrófagos, após exposição às proteínas de CMS2, e a comparação de possíveis modulações apresentadas pelo tratamento com CMS1, sub-fração que parece não apresentar atividade estimulatória sobre macrófagos.

## 6.2 Mediadores tumorocidas induzidos em macrófagos por CMS1 e CMS2

Macrófagos classicamente ativados (M $\phi$ -Ca), ou ditos M1, se tornam tumorocidas por liberarem compostos citotóxicos como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), óxido nítrico (NO, do inglês Nitric oxide), Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ , do inglês Tumor necrosis factor), Interleucinas -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e Interleucina-6 (IL-6) e promotores de resposta imune antitumoral como interleucina-12 (IL-12), IFN- $\gamma$ , proteína inflamatória de macrófagos- $\alpha$  (CCL3/MIP1- $\alpha$ , do inglês *Macrophage Inflammatory Protein- $\alpha$* ) e proteína quimiotática para macrófagos (CCL2/MCP-1, do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*) (MANTOVANI *et al.*, 2013; TUGUES *et al.*, 2015; CARSON *et al.*, 2017). Com base nesses dados sugere-se que proteínas contidas na sub-fração CMS2 poderiam modular a produção/secreção de tais moléculas e de espécies reativas correlacionadas com a atividade tumorocida de macrófagos.

Primeiramente, foram realizados experimentos para a determinação dos efeitos das sub-frações (CMS1 e CMS2) sobre a produção de NO e de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) produzidas por cultura de macrófagos peritoneais. Os resultados mostram que tanto CMS1 quanto CMS2 promoveram o aumento dos níveis de nitrito de forma concentração dependente (Figura 3). Por outro lado, CMS2 (Figura 3B e 4B) em todas as concentrações utilizadas, promoveu aumento mais pronunciado que CMS1 (Figura 3A e 4A). Sabe-se, desde 1984 após trabalho publicado por MAVIER & EDGINGTON, que M $\phi$ -Ca produzem NO e ROS que medeiam a atividade antitumoral ao inibirem a respiração mitocondrial, que culmina na citólise das células alvo (GOENKA *et al.*, 1998). Dessa forma, sugere-se que os níveis elevados de NO e ROS teriam papel importante na citotoxicidade de macrófagos promovida por CMS2.

Como mostrado na Figura 5, macrófagos expostos tanto à CMS1 quanto à CMS2 apresentam aumentos dos níveis secretados de citocinas promotoras de citotoxicidade, como IL-1 $\beta$  (Figura 5B), IL-6 (Figura 5C) e CCL2/MCP-1 (Figura 5E), sendo que apenas CMS2 foi capaz de promover aumento significativo nos níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 5D). Além disso, CMS2 foi mais potente e/ou mais eficaz que CMS1 em promover o aumento dos níveis dessas citocinas. Mais potente, pois, mesmo quando utilizada em menores concentrações (5 e 10  $\mu$ g/mL) se observou efeito igual

ou superior a maior concentração de CMS1. Mais eficaz, pois, quando utilizadas (CMS1 ou CMS2) na concentração de 20 µg/mL, CMS2 promove um aumento ainda maior nos níveis de IL-6 (Figura 5C) em relação ao observado para a exposição dos macrófagos à CMS1.

Dessa forma, propõe-se que esses maiores níveis de NO; ROS; IL-6 e TNF- $\alpha$  produzidos por macrófagos expostos CMS2 seriam os responsáveis pelo efeito tumoricida observado (Figura 1B). O mesmo não se pode afirmar sobre a liberação de IL-1 $\beta$  e CCL2/MCP-1, cujos níveis estão aumentados, semelhantemente, tanto em cultura de macrófagos expostos à CMS1, quanto para às expostas a CMS2. Já a citocina TNF- $\alpha$  se caracteriza como um dos mediadores chave da atividade citotóxica de macrófagos ativado por CMS2, por ter seus níveis aumentados, unicamente, em culturas expostas à essa sub-fração (Figura 5D). Aumentos nos níveis de IL-12 somente foram observados para o tratamento dos macrófagos com a sub-fração CMS1 (Figura 5A). Sabe-se que, a produção de IL-12 por macrófagos ativado tem dentre outras funções aumentar a resposta imune do tipo Th1 e à auto-ativação macrofágica (XING *et al.*, 2000). Nesse sentido, níveis elevados de IL-12, observados em culturas de macrófagos expostos a CMS1, seriam importantes para a auto-ativação e tentativa de estabelecimento do fenótipo tumoricida que, contudo, nas concentrações utilizadas não foi observado. Por outro lado, acreditamos que a não elevação dos níveis de IL-12 pelo tratamento com CMS2, sub-fração capaz de promover a atividade tumoricida de macrófagos, deva-se a algum sistema contra-regulatório desencadeado pela presença de altos níveis de mediadores tumoricidas (MEDVEDEV *et al.*, 2000; FUKAO *et al.*, 2002).

CCL2/MCP-1 por ser uma citocina envolvida na ativação do fenótipo tumoricida apresenta papel fundamental na citotoxicidade mediada por macrófagos ao ser capaz de estimular a produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e NO (CARSON *et al.*, 2017). Sabe-se, também, que a sinalização desencadeada por ROS pode regular a transcrição de citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (TAN *et al.*, 2016). Assim sendo, a elevação dos níveis de CCL2/MCP-1 e de ROS, em culturas de macrófagos, pelo tratamento com as sub-frações contribuiria para níveis aumentados de citocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Figura 5B, C e D). Nesse



sentido, acreditamos que tais mediadores, citocinas e/ou quimiocinas, possam agir de forma sinérgica na promoção da morte de células tumorais induzida por macrófagos expostos a CMS2.

Em sua grande maioria, TAMs são capazes de promover a angiogênese, a invasão e metástases, pela produção de moléculas pró-angiogênicas e promotoras do remodelamento tissular como fator de crescimento para endotélio vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ , do inglês *transforming growth factor  $\beta$* ) e metaloproteinases (CONDEELIS & POLLARD, 2006; GREEN *et al.*, 2009; RHEE *et al.*, 2016). Assim, ao avaliar a atividade da metaloproteinase de matriz (MMPs, do inglês *matrix metalloproteinases*), do tipo 9, e os níveis de TGF- $\beta$  e VEGF produzidos por cultura de macrófagos expostos a CMS1 ou CMS2, observa-se que as duas sub-frações são capazes de reduzir a atividade de MMP-9 (Figura 7) e os níveis de ambos mediadores de forma expressiva (Figuras 6A e 6B). Os macrófagos quando expostos à sub-fração CMS1 apresentaram perfis de inibição de TGF- $\beta$  e VEGF semelhantes ao observado para CMS2. Contudo, o tratamento com CMS2 foi mais potente que CMS1 em relação aos níveis de VEGF, evidenciado na menor concentração utilizada (5  $\mu\text{g/mL}$ ). Da mesma forma, a redução da atividade de MMP-9 em macrófagos expostos a CMS1 foi menos pronunciada (56-89%), quando comparada à promovida por CMS2 (72-100%), e ocorre apenas nas maiores concentrações. Considerando que a modulação promovida por CMS2 *in vitro* se reproduza *in vivo*, esta promoveria não somente a capacidade tumoricida dos TAMs, mas também, reduziria a formação de novos vasos, o remodelamento da matriz extracelular e, conseqüentemente, a capacidade de formação metastática.

Ao se observar a proporção entre os níveis secretados de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e CCL2/MCP-1) e anti-inflamatória (TGF- $\beta$ ), percebe-se o desdobramento de um perfil inflamatório em macrófagos expostos às sub-frações, quando comparados ao perfil de culturas controle. Com isso, se pode concluir que tanto CMS1 quanto CMS2 apresentariam um efeito imunomodulador sobre macrófagos peritoneais. Contudo, as proteases de CMS1, nas concentrações utilizadas, não são capazes de desencadear um perfil inflamatório/tumoricida

satisfatório a ponto de induzir a citotoxicidade de macrófagos sobre células transformadas.

### 6.3 Vias macrofágicas intracelulares ativadas por CMS2

Sabe-se que a indução do fenótipo tumoricida pode se dar pela ativação de diferentes vias intracelulares, a partir de estímulos e receptores macrofágicos distintos, que podem gerar mediadores inflamatórios comuns e característicos de tal fenótipo (RAO, 2001; CAAMANO *et al.*, 2002; ARRANZ *et al.*, 2012 e COVARRUBIAS *et al.*, 2015). Proteases contidas em CMS2 induzem, *in vitro*, um fenótipo tumoricida em macrófagos peritoneais, porém não se sabe, até o momento, como se caracteriza a interação dessas proteínas com os macrófagos, e quais seriam as moléculas e/ou receptores envolvidos.

CMS2 é composta por cinco proteases denominadas de CMS2MS1 - 5. Sabemos que CMS2MS2 apresenta similaridade estrutural, a nível de estruturas primárias e terciárias, com a molécula do fator de crescimento do Plerocercóide (PGF, do inglês "Plerocercoid Growth Factor") (GOMES *et al.*, 2009). PGF é um fator que foi isolado do verme parasita *Spirometra mansonioides*, peculiar por acelerar o crescimento do hospedeiro de uma maneira similar ao hormônio do crescimento (GH, do inglês *Growth Hormone*). PGF foi caracterizado como uma cisteína protease com aproximadamente 50% de identidade com outras cisteína proteases de mamífero e nenhuma homologia com o GH humano (Phares, 1996). Entretanto, PGF é capaz de interagir com receptores do hormônio de crescimento (GHRs, do inglês do inglês *Growth Hormone Receptors*) e provocar efeitos biológicos semelhantes aos mediados por hormônios de mamíferos (PHARES & KUBIC, 1996). Gomes e col. (2009) mostra que não foi possível destacar uma região que pudesse diferenciar de maneira clara as estruturas de CMS2MS2 e de PGF, o que abriria precedentes para um possível mecanismo de ação de CMS2MS2 via interação com GHRs de mamíferos. Inicialmente, Edwards e colaboradores (1988) mostraram que macrófagos expressam GHRs, e que GH promove a ativação dessas células, com efeito similar ao promovido pelo clássico ativador, IFN- $\gamma$ . Adicionalmente, experimentos realizados por Uronen-Hansson e col. (2003) mostraram que GH promove a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em monócitos obtidos do sangue total de humanos. Já em macrófagos peritoneais o GH

foi capaz de desencadear a transcrição de *iNOS* e a produção de NO (KUMAR & MENON, 2003).

Sabe-se também que a atividade proteolítica das proteínas contidas em CMS2 promovem a clivagem, *in vitro*, de substratos sintéticos de todos os quatro sub-tipos (PAR- 1 a 4) de receptores ativados por proteases (PARs, do inglês *Protease-activated receptors*). A diferença mais marcante foi observada na clivagem do substrato PAR-2 pela protease CMS2MS2, que foi aproximadamente 10 vezes maior que todas as outras proteases estudadas (GOMES, 2008). A ativação desse tipo de receptor ocorre após clivagem, por proteases, do sítio localizado no domínio amino-terminal, quando é formada uma nova extremidade que funciona como ligante, e que apesar de estar unido ao receptor é capaz de ativá-lo ao sofrer uma torção, seguida de ligação a segunda alça extracelular (GIESELER *et al.*, 2013). De acordo com experimentos realizados por Johansson e colaboradores (2005), a ativação de PAR-2 em macrófagos é capaz de desencadear a produção de mediadores como IL-6, CXCL8/IL-8 e IL-1 $\beta$ . Assim, podemos sugerir que a ativação de GHRs e de PARs possa ocorrer após exposição de macrófagos a CMS2, e contribuir com vias de sinalização que levem a produção de mediadores característicos do fenótipo tumoricida.

Diante disso, se propôs avaliar as vias intracelulares que estariam ativadas em macrófagos pela exposição à sub-fração CMS2. Dentre várias vias de sinalização intracelulares ativadas durante o estabelecimento do fenótipo tumoricida em macrófagos, chama-se a atenção para as vias do NF $\kappa$ -B; da COX-2; das MAPKs e da Akt/PI3K.

Inicialmente, a quantificação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (p65) mostra que o tratamento dos macrófagos com CMS2 aumenta em até 72% a quantidade intracelular dessa proteína (Figura 9A). A ativação e a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B estão associadas ao aumento da transcrição de diferentes genes que codificam mediadores e enzimas inflamatórias como óxido nítrico sintase induzível (*iNOS*, do inglês *induced nitric oxide synthase*), ciclooxigenase-2 (COX-2), quimiocinas (CXCL8/IL-8), moléculas de adesão (ICAMs, VCAMs e ELAMs) e citocinas como IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , e IL-12 (WANG *et al.*, 2014). O aumento nos níveis secretados de NO, IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-12, foi observado pelo tratamento dos macrófagos com CMS2,

o que seria, pelo menos em parte, promovido pela ativação de NF- $\kappa$ B e, conseqüente, expressão de genes que codificam tais mediadores.

NF- $\kappa$ B se apresenta como um complexo trimérico citosólico, pré-formado por um dímero protéico p50/p65 associado a uma proteína inibitória I $\kappa$ B. A sinalização extracelular leva a ativação de duas I $\kappa$ B kinases, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , que promovem a fosforilação de I $\kappa$ B. Após fosforilação, I $\kappa$ B se dissocia do complexo resultando na migração de NF- $\kappa$ B para o núcleo celular e ativação da expressão de genes alvo (Liu *et al.*, 2017). A quantificação intranuclear de NF- $\kappa$ B (p65) e de I $\kappa$ B não foram realizadas e, portanto, não foi possível demonstrar que o aumento de NF- $\kappa$ B intracelular, promovido pelo tratamento com CMS2, levaria a aumentos na ativação e na transcrição de genes alvo. Tais quantificações precisam ser realizadas para melhor delineamento dos mecanismos pelos quais CMS2 estaria promovendo a ativação de macrófagos.

Como dito anteriormente, a ativação de NF $\kappa$ -B pode levar a aumentos na expressão de vários mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, via indução da expressão de COX-2. Ativadores, em alguns tipos celulares, induzem o aumento da enzima COX-2 via ativação de NF $\kappa$ -B. Wadleigh e colaboradores (2000) demonstraram que apesar do envolvimento do fator NF $\kappa$ -B na ativação intracelular de macrófagos promovida por LPS, não há contribuição do mesmo na transativação gênica de COX-2. Pelos resultados aqui apresentados, observa-se que a via de ativação de NF $\kappa$ -B promovida pelo tratamento com CMS2, assim como o descrito pela exposição ao LPS, não leva a aumentos da proteína COX-2 em macrófagos (Figura 9B). Isto deve ocorrer devido a interações extracelulares entre proteínas pertencentes a CMS2 e/ou ao tipo de sinalização intracelular desencadeada.

Sabe-se que proteínas quinases (PKs, do inglês Protein Kinases), em especial proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs, do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinases*), possuem interligação com vias do NF- $\kappa$ B e da Proteína Ativadora-1 (AP-1, do inglês *Activator Protein-1*) na modulação da resposta de macrófagos a estímulos externos (DONG *et al.*, 1993, AGA *et al.*, 2004). MAPKs, uma vez ativadas, levam à ativação de NF- $\kappa$ B através da fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$  (CARTER *et al.*, 1999). Além disso, estímulos variados se mostram capazes de ativar, em

macrófagos, proteínas pertencentes as três sub-famílias de MAPKs, denominadas de ERKs (Extracellular Signal-Regulated Kinases), p38 MAPKs e JNK/SAPKs (c-Jun N-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinases) (RAO, 2001). Adicionalmente, estudos mostram que MAPKs possam regular a transcrição e/ou translação de vários mediadores inflamatórios como NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (RAO, 2001). Contudo, o tratamento dos macrófagos com CMS2 não promove alterações nas vias de MAPKs, avaliadas aqui pela fosforilação de p38; de SAPK/JNK (Figuras 9C e 9D). Quantificações da fosforilação de ERK 1/2 foram realizadas, porém não foram concluídas. Contudo, os dados prévios descartam o envolvimento da ativação de ERKs no o efeito ativador de CMS2 sobre os macrófagos. Assim, os dados mostram que a possível ativação da via de NF $\kappa$ -B e, conseqüente, produção dos mediadores inflamatórios, acima citados, ocorreria por vias independentes a ativação de MAPKs.

Vias de sinalização como PI3K/Akt também estão envolvidas com a ativação, assim como com o metabolismo macrofágico e que, somado a isso, Akt pode controlar a sinalização mediada por NF $\kappa$ -B (COVARRUBIAS *et al.*, 2015). A interação com o receptor Toll-Like 4 em macrófagos LPS-ativados, desencadeia o acoplamento da enzima fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K), mediada pela proteína adaptadora BCAP, seguida de ativação da proteína kinase B (Akt) que inibe a proteína alvo da rapamicina (mTOR) (COVARRUBIAS *et al.*, 2015). O genoma de mamíferos codifica três subtipos distintos de proteínas Akt das quais apenas dois, Akt1 e Akt2, são expressos por macrófagos (ZHOU *et al.*, 2006). O tratamento de culturas macrofágicas com a sub-fração CMS2 promove aumento da fosforilação de Akt, determinado pelas fosforilações nos resíduos 473 de serina, que não distingue os dois subtipos. Arranz e col. (2012), ao utilizarem macrófagos provenientes de animais deficientes para os genes codificadores de tais proteínas (Akt1  $-/-$  ou Akt2  $-/-$ ), sugerem que a ausência de Akt1 inibe, enquanto que, Akt2 promove o fenótipo tumoricida, ao passo que a perda de Akt1 e Akt2, aumenta e reduz, respectivamente, a ativação e o desenvolvimento desse fenótipo. Além disso, macrófagos Akt1 $-/-$  e estimulados com LPS apresentam hiperprodução de NO, TNF- $\alpha$  e IL-6, enquanto que macrófagos Akt2 $-/-$  produzem baixos níveis desses mediadores pró-inflamatórios. Com base no tipo de anticorpo aqui utilizado, não podemos definir o subtipo de Akt que estaria com sua atividade aumentada. No

entanto, sugerimos que o aumento da fosforilação da Akt2 estaria de acordo com o perfil tumoricida de macrófagos, observado para o tratamento com a sub-fração CMS2.

De acordo com as vias de sinalização aqui analisadas e sabendo do importante papel da ativação de NF- $\kappa$ B (YANG & ZHANG, 2017) e da via PI3k/Akt (COVARRUBIAS *et al.*, 2015) na polarização do fenótipo antitumoral de macrófagos, pode-se concluir que a produção de mediadores presentes no sobrenadante de culturas macrofágicas e o efeito tumoricida observados, após tratamento com CMS2, estariam, em parte, associados a ativação das vias Akt e NF- $\kappa$ B.

#### **6.4 Atividade antitumoral/antimetastática e modulação do microambiente tumoral**

Por ser CMS2 a sub-fração capaz de induzir, *in vitro*, o fenótipo tumoricida de macrófagos, avaliou-se *in vivo* a atividade da mesma sobre o desenvolvimento, em camundongos BALB/c, do carcinoma de mama metastático 4T1. Pelo acompanhamento do volume tumoral, observa-se que o efeito inibidor do crescimento tumoral promovido por CMS2 inicia-se, para todas as doses utilizadas, após o 14<sup>o</sup> dia de tratamento, que corresponde ao 17<sup>o</sup> dia de desenvolvimento tumoral (Figura 10A). No 22<sup>o</sup> dia de tratamento se pode observar que CMS2 impede o crescimento dos tumores (29, 22 e 43 %) (Figura 10B) e de metástases pulmonares (51, 43 e 49 %), respectivamente, nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg (Figura 10C).

O modelo de carcinoma de mama 4T1 é classificado como tumor inflamatório, uma vez que, tem seu desenvolvimento associado à presença de células e de mediadores inflamatórios (Dupré *et al.*, 2007). Viana e col. (2013) ao analisarem parâmetros inflamatórios e angiogênicos de três diferentes modelos tumorais murinos (CT26.WT, B16F10 e 4T1) mostram que o carcinoma de mama 4T1 se destaca como o mais inflamatório por apresentar níveis intratumorais elevados de nitrito, de citocinas como TNF- $\alpha$ ; VEGF; TGF- $\beta$ , e de marcadores leucocitários como atividade de mieloperoxidase (MPO) e de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG). Resultados anteriores mostram que a fração proteolítica P1G10 (1 - 5 mg/kg) foi

capaz de interferir no crescimento do carcinoma de mama 4T1 ao reduzir em até 51% o peso dos tumores. A redução dos tumores pelo tratamento dos animais com P1G10 foi associada à redução da inflamação tumoral pela diminuição, em torno de 50%, dos níveis intratumorais de citocinas pró-inflamatórias/angiogênicas, como IL-1 $\beta$ ; IL-6; KC/CXCL1-3 e VEGF, e do número de leucócitos aderidos a vasos peritumorais (52%) (BRAGA *et al.*, 2013).

Neste trabalho CMS2, sub-fração obtida de P1G10, também foi capaz de reduzir os níveis intratumorais de mediadores pró-inflamatórias/angiogênicas, como IL-1 $\beta$  (Figura 11A), TGF- $\beta$  (Figura 12A) e VEGF (Figura 12C) e não alterou os níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 11B), IL-10 (Figura 12B) ou CCL2/MCP-1 (Figura 11D), em tumores de animais portadores do carcinoma de mama 4T1. CMS2, ainda, promove aumento nos níveis intratumorais de IL-12 (Figura 11C), dessa forma aumenta a proporção IL-12/IL-10 que associada a baixos níveis de TGF- $\beta$  se caracteriza como um cenário propício para o desenvolvimento do fenótipo tumoricida de macrófagos e a promoção, *in vivo*, de uma resposta imune antitumoral mediada por TAMs (TUGUES *et al.*, 2015). A não alteração dos níveis intratumorais de TNF- $\alpha$  (Figura 11B) em adição a redução dos níveis de IL-1 $\beta$  pelo tratamento dos animais com CMS2, de certa forma nos leva a pensar em uma ação seletiva sobre mediadores canonicamente inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>), a qual posteriormente precisaria ser investigada. Por outro lado, acreditamos que a não alteração dos níveis intratumorais de CCL2/MCP-1 (Figura 11D) seja importante para os efeitos promovidos pelo tratamento com CMS2, já que essa quimiocina é capaz de promover a infiltração, a ativação e por consequência a citotoxicidade mediada por macrófagos (LIU & CAO, 2014; CARSON *et al.*, 2017).

A avaliação da atividade intratumoral de MMPs (Figura 13) revelou que o tratamento com CMS2 não é capaz de alterar a atividade de MMP-9 (Figura 13B), porém reduz de forma expressiva (79%) a atividade de MMP-2 (Figura 13C). Metaloproteinases do tipo 2 e 9 (gelatinases), são capazes de promover a degradação de moléculas de colágeno do tipo IV e contribuir para o remodelamento e angiogênese tumorais (GILLES *et al.*, 2013). A forma latente de MMP-2 pode sofrer ativação pela ação de uma sub-classe de MMPs denominadas MMPs membrana-associadas (MT-MMPs,

do inglês *Membrane-Type MMPs*). Já foram identificados seis sub-tipos de MT-MMPs (MMP-14, 15, 16, 17, 24, 25) e todos, exceto o sub-tipo MMP-17, apresentam capacidade pró-ativadora de MMP-2 (ZUCKER *et al.*, 2003). Assim, a inibição de MMP-2 levaria a inibição indireta do efeito de todos os sub-tipos de MT-MMPs citados cima. Dados estes, que demonstram a importante participação de MMP-2 para o crescimento tumoral e o impacto de tratamentos que promovam, assim como CMS2, a inibição de sua atividade.

A atividade de MMPs pode ser regulada, *in vivo*, por inibidores teciduais específicos para MMPs (TIMPs, do inglês *Tissue Inhibitors Metallo Proteinase*) (GILLES *et al.*, 2013). A inibição ocorre por ligação direta da porção N-terminal, do inibidor, ao sítio de ativação de MMPs (MASKOS, 2005; LOFFEK *et. al.*, 2011; KHALID, A. & JAVAID, 2016). Os diferentes sub-tipos de TIMPs compartilham 40% da estrutura básica, que consiste em porções N- e C-terminais os quais contêm seis resíduos de cisteína cada um (MURPHY, 2011; KHALID, A. & JAVAID, 2016) .

Baseado nisso, podemos sugerir que o efeito de inibição, *in vivo*, da atividade de MMPs observado pelo tratamento com CMS2 possa ser, em parte, atribuído à atividade proteolítica intrínseca de cisteino-proteínas que compõem essa sub-fração. A proteólise levaria a liberação de TIMPs, ou de partes dos mesmos, pelo tecido tumoral que seriam capazes de se ligar a MMPs e inibir a atividade dessas enzimas. Observações em vários sistemas experimentais confirmam a importância de TIMPs e/ou da inibição de MMPs no combate a formação tumoral, ao demonstrarem atividades inibidoras sobre a angiogênese, assim como, sobre o crescimento de tumores e metástases (LOFFEK *et. al.*, 2011; KHALID, A. & JAVAID, 2016). Contudo, para confirmação de tal hipótese a quantificação e/ou expressão intratumoral de TIMPs deve ser realizada.

Com base nos resultados aqui descritos, e os obtidos em estudos paralelos do grupo, acredita-se que o efeito de CMS2 sobre tais enzimas seja tempo-dependente do desenvolvimento tumoral. Após 15 dias do inóculo, é possível observar apenas a atividade de MMP-9, onde o tratamento com CMS2 reduz a atividade dessa enzima em 12% (Apêndice D- Figura 1A). Com isso, pode-se concluir que o efeito de CMS2 ocorre de forma distinta sobre as diferentes MMPs. O efeito de redução ocorreria, primeiramente, sobre MMP-9 e, posteriormente, sobre MMP-2 (Figura 13C). Os



efeitos de redução sobre ambas as MMPs seriam importantes para a atividade antitumoral e antimetastática de CMS2 observadas, respectivamente, a partir 17<sup>o</sup> (Figura 10A) e no 25<sup>o</sup> dia de desenvolvimento tumoral (Figura 10B). Assim, com base no resultado do Apêndice D (Figura 1A) e no atual trabalho, sugere-se que a redução da atividade de MMP-9 por CMS2 não é sustentada pela continuidade do tratamento e que, além disso, ocorra uma transição de enzimas-alvo.

### **6.5 Modulação de macrófagos associados a tumores**

Com base na plasticidade gênica de TAMs, vários estudos têm demonstrado que estes quando expostos e ativados a estímulos apropriados se tornam capazes de desempenhar papel de grande relevância na montagem de resposta imune antitumoral não-específica (GERMANO *et al.*, 2013; STOCK *et al.*, 2013; HIROSHIMA *et al.*, 2014; NIU *et al.*, 2016)

A enzima NAG se caracteriza como um marcador da ativação macrofágica, uma vez que é produzida por macrófagos ativados (BARCELOS *et al.*, 2005). Resultados anteriores levam a hipótese de que a fração P1G10 promoveria sua atividade antitumoral pela ativação do fenótipo tumoricida de TAMs, já que a redução da inflamação no tumor esteve associada a um aumento de 157% da atividade de NAG intratumoral (BRAGA *et al.*, 2013). Neste trabalho a atividade de NAG em tumores de animais tratados por 22 dias, com CMS2, não apresenta alterações com relação à observada em tumores de animais controle (Figura 14). Contudo, resultados obtidos após, apenas, 14 dias de tratamento (Apêndice D – Figura 1B) mostram que a atividade de NAG intratumoral se apresenta 36% aumentada em relação a atividade de animais controle. Os resultados, em conjunto, sugerem que a modulação de TAMs pelo tratamento com CMS2 ocorre no início do desenvolvimento do carcinoma e que, tal atividade, é importante para o efeito antitumoral observado (Figura 10A), porém, este efeito se perde ou se dilui à medida que o tumor se desenvolve.

Macrófagos alternativamente ativados (M $\phi$ -AA), ou ditos M2, ao contrário de M $\phi$ -Ca, são caracterizados pela baixa responsividade a agonistas de TLRs o que resulta em baixos níveis de citocinas pró- e aumento das anti-inflamatórias. Ao passo que

apresentam aumentos na expressão de receptores “scavengers”; para manose (MR *do inglês, Manose Receptor*) e para galactose, e de proteínas membranares como FIZZ-1 (do inglês, *Found in Inflammatory Zone 1*) e de Ym1/Chi3I3 (do inglês, *Chitinase 3-like Protein 3*) (STEIN *et al.*, 1992; RAES *et al.*, 2002; GORDON & MARTINEZ, 2010; RHEE, 2016). A avaliação da expressão de alguns desses genes (MR-1, FIZZ-1 e Ym-1) foi realizada com o objetivo de investigar de forma específica a modulação, *in vivo*, do fenótipo de TAMs pelo tratamento com CMS2.

Os resultados mostram que tumores de animais tratados com CMS2 não apresentam alteração quanto à expressão do gene para MR ( $p > 0,05$ ), enquanto que, a de FIZZ-1 (42%,  $p < 0,05$ ) e de Ym-1 (59%,  $p > 0,05$ ) se encontra reduzida (Figura 15). O MR é um importante receptor de fagocitose/endocitose que medeia a ligação e a ingestão de proteínas e macromoléculas manosiladas, incluindo microorganismos, que possuam manose em seus resíduos de superfície, e glicoproteínas solúveis. MR é expresso por macrófagos residentes e elicitados, porém, não são expressos por monócitos ou por macrófagos IFN- $\gamma$ -ativados (ALLAVENA *et al.*, 2004).

Stein e col. (1992) relatam (como dados não mostrados) que outras citocinas, como TGF- $\beta$ ; IFN- $\alpha$  e  $\beta$ ; TNF- $\alpha$ ; IL-2; IL-6; GM-CSF ou IL-10, apresentam, *in vitro*, pouco ou nenhum efeito sobre a atividade de MR, quando comparados ao promovido por IL-4. Assim, a não alteração na expressão intratumoral de MR pelo tratamento com CMS2 pode ser explicada pela modulação de citocinas intratumorais que não interferem diretamente na expressão desse receptor, sendo que a quantificação de IL-4 não foi realizada.

Com a redução da expressão intratumoral de FIZZ-1 e de Ym-1, esta última mesmo que não significativa, sugere-se que esteja ocorrendo uma modulação de CMS2 sobre o estado ativacional de macrófagos, ou seja, o tratamento com a sub-fração estaria, a princípio, promovendo a descaracterização do fenótipo M2 de TAMs. Resultados anteriormente obtidos reforçam que essa descaracterização de fato ocorra, pois, em culturas de macrófagos M2, IL-4-induzidos, observa-se redução em torno de 50% da expressão dos genes para FIZZ-1 e Ym-1 (Apêndice E – Figuras

1A e 1B). A utilização do termo descaracterização se faz necessária pelo fato da não avaliação de marcadores específicos que caracterizariam o fenótipo tumoricida (M1) de macrófagos. Contudo, a redução na expressão intratumoral de FIZZ-1 e, possivelmente, de Ym-1 pelo tratamento com CMS2, juntamente com o aumento dos níveis de IL-12 (resposta imune do tipo Th1), em detrimento da resposta imune Th2, demonstrada aqui pela diminuição dos níveis de TGF- $\beta$ , nos mostra um cenário que favorece a competência imunológica e tumoricida inerente a tal fenótipo. Adicionalmente, os resultados *in vitro* com macrófagos peritoneais, já discutidos, reforçam a idéia de que o tratamento *in vivo* com CMS2 possa promover o fenótipo tumoricida em macrófagos. Neste sentido, temos indícios de que a descaracterização de M2 pela sub-fração teria grandes chances de, de fato, ser uma reversão do fenótipo de TAMs, de M2 para M1.

Vários outros trabalhos corroboram os resultados aqui mostrados, ao descreverem a importância e a capacidade de tratamentos imunomoduladores em prevenir ou de reverter o fenótipo M2 de TAMs, e assim, serem eficazes no combate a formação tumoral (RHEE, 2016). Como exemplo desse tipo de tratamento, temos relatos do uso de compostos de diferentes etiologias, os quais demonstram atividade antitumoral em diferentes modelos murinos. Tymosin- $\alpha$ , hormônio imunomodulador, é capaz de reeducar TAMs em células dendríticas, que participam da resposta antitumoral do organismo e produzem elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias (GARACIET *et al.*, 2012). Celecoxibe, inibidor seletivo de COX-2, e  $\beta$ -Glucan, polissacarídeo derivado de leveduras, se mostram potentes imunomoduladores com propriedades antitumorais e de diferenciação do fenótipo de TAMs para o tumoricida/pró-inflamatório M1 (CHAN *et al.*, 2009; NAKANISHI *et al.*, 2011). Ferumoxytol inibe, significativamente, o crescimento do adenocarcinoma subcutâneo em camundongos, e a inibição está acompanhada do aumento de macrófagos M1 no tecido tumoral (ZANGANEH *et al.*, 2016). Nesse sentido, Yang & Zhang (2017) descrevem que a modulação das propriedades antitumorais de macrófagos, por vários modificadores da resposta biológica, compreende área de interesse ativo na quimioterapia do câncer.

Complementariamente, com o propósito de avaliar a participação, *in vivo*, de TAMs no efeito antitumoral de CMS2, utilizamos modelo descrito por Cho e col, (2012). Nesse modelo experimental, os autores demonstraram que macrófagos-M2, quando co-inoculados com células de carcinoma de mama 4T1, são capazes de promover o aumento do tumor e o número de metástases pulmonares em relação a animais que receberam inóculo único da linhagem 4T1. Ao utilizar modelo adaptado ao descrito por Cho e colaboradores, foi possível observar que o efeito antitumoral de CMS2 surge, precocemente, já no 15<sup>o</sup> dia de desenvolvimento tumoral, apenas em tumores 4T1 acrescidos do inóculo de macrófagos-M2 (Figuras 16A e 16B). Dosagens de citocinas intratumorais, posteriormente realizadas, revelaram que o tratamento com CMS2 aumenta em 143% os níveis de IL-12 em tumores provenientes do co-inóculo. Nesse sentido, Wang e col. (2017) mostram que nanopartículas com carga útil de IL-12 já foram utilizadas como tratamento de combate a tumores e possuem atividade antitumoral por favorecerem o estabelecimento do fenótipo tumoricida em TAMs. Com isso podemos propor que o aumento de IL-12 pelo tratamento com CMS2 poderia, em parte, justificar a atividade antitumoral observada, também, no modelo 4T1/M2. Assim, os resultados em conjunto reforçam, mais uma vez, a hipótese de que a sub-fração CMS2 promova modificações tumorais que dependam da presença de TAMs e, provavelmente, da modulação do fenótipo destes para exercer seus efeitos antitumoral e antimetastático.

## 7 CONCLUSÃO

Pelo exposto, podemos concluir que CMS2 apresenta atividade antitumoral e antimetastática, dentre outros mecanismos, pela modulação da atividade de TAMs. Tal modulação ocorre no sentido da ativação do fenótipo tumoricida, observada *in vitro*, e pela descaracterização do fenótipo-M2, mostrada *in vivo*. Acredita-se que essa ativação de TAMs possa ocorrer por ação direta de CMS2 sobre vias intracelulares macrofágicas, ou indireta, pela modulação dos níveis de mediadores intratumorais que favoreceriam o desenvolvimento do fenótipo tumoricida.

## REFERÊNCIAS

- AGA, M.; WATTERS, J.J.; PFEIFFER, Z.A. et al. **Evidence for nucleotide receptor modulation of cross talk between MAP kinase and NF-kappa B signaling pathways in murine RAW 264.7 macrophages.** *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 286:923–30, 2004.
- AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. **Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe.** *Clin. Cancer Res.*, 15:425–30, 2009.
- ALLAVENA, P.; CHIEPPA, M.; MONTI, P. et al. **From Pattern Recognition Receptor to Regulator of Homeostasis: The Double-Faced Macrophage Mannose Receptor.** *Critical Review in Immunology*, 24(3):179–92, 2004.
- ARAUJO E SILVA, A.C.; LEMOS, F. O. ; GOMES, M.T. et al. **Role of gastric acid inhibition, prostaglandins and endogenous-free thiol groups on the gastroprotective effect of a proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* latex.** *J. Pharm. Pharmacol.*, 67(1):133-41, 2015.
- ARAÚJO, J.R.; ZAGO, M. M. F.; DA SILVA, S. R. **Percepções sobre a Vida e a Doença por Mulheres Submetidas à Quimioterapia Antineoplásica.** *Rev. Min. Enferm.* 10(3): 247-52, 2006.
- ARRANZ, A.; DOXAKI, C.; VERGADI, E. et al. **Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization.** *PNAS*, 109(24):9517-22, 2012.
- BÁEZ, R.; LOPES, M. T.; SALAS, C. E. et al. **In vivo antitumoral activity of stem pineapple (*Ananas comosus*) bromelain.** *Planta Med.*, 73(13):1377-83, 2007.
- BAEZA, G.; CORREA, D.; SALAS, C. E. **Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*.** *J. Sci. Food Agric.*, 51:1-9, 1990.
- BAILAR, J. C. & GORNINK, H. L. **Cancer undefeated.** *N. Engl. J. Med.*, 336:1569-74, 1997.

BAO, L.; HAQUE, A.; JACKSON, K. et al **Increased expression of P-glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model.** *Am. J. Pathol.*, 178(2):838-52, 2011.

BARCELOS, L. S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A. S. et al. **Impaired inflammatory angiogenesis, but not Leukocyte influx, in mice lacking TNFR1.** *J. Leukoc. Biol.*, 78(2):352-8, 2005.

BARREIRO, E. J. & BOLZANI, V. S. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos.** *Revista Química Nova*, 32(3):679- 88, 2009.

BARSKY, S.H.; SIEGAL, G.P.; JANNOTTA, F. et al. **Loss of basement membrane components by invasive tumours but not by their benign counterparts.** *Lab. Invest.*, 49(2):140–7,1983.

BEN-BARUCH, A. **Inflammatory cells and cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interaction.** *Breast Cancer Res.*, 5:31–6, 2002.

BHUI, K.; PRASAD, S.; GEORGE, J. et al. **Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway.** *Cancer Lett.*, 282(2):167-76, 2009.

BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. **The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies.** *J. Pathol.*, 196: 254–65, 2002.

BISWAS, S.K.; GANGI, L.; PAUL, S. et al. **A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-κB and enhanced IRF-3/STAT1activation).** *Blood.*,107:2112–22, 2006.

BISWAS, S.K; MANTOVANI, A. **Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm.** *Nat Immunol* 11:889–896, 2010.

BILHEIRO, R.P.; BRAGA, A. D.; LIMBORÇO, M. et al., **The thrombolytic action of a proteolytic fraction (P1G10) from *Carica candamarcensis*.** *Thrombosis Research* , 131:175–82, 2013.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitative estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.** Anal Biochem., 72: 248-54, 1976.

BRAGA, A. D.; FREITAS, K. M.; OLIVEIRA-LIMA, O. C. et al. **Proteolytic fraction from *Vasconcellea cundinamarcensis* latex shows antitumor effect by reducing the inflammation in tumor microenvironment.** 11<sup>th</sup> World Congress on Inflammation and XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology. Setembro 21-15, 2013. Natal, RN, Brasil.

BRAHIMI, C. & POUYSSÉGUR, J. **The role of the Hypoxia Inducible Factor in tumor metabolism growth and invasion.** J. Bull. Cancer, 93(8): 73-80, 2006.

BRAVO, L. M.; HERMOSILLA, J.; SALAS, C. **A biochemical comparison between latex from *C. candamarcensis* and *C. papaya*.** Braz. J. Med. Biol. Res., 27:2831-2862, 1994.

BROWDER, T.; BUTTERFIELD, C. E.; KRÄLING, B. M. et al. **Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer.** Cancer Res., 60: 1878–86, 2000.

CARSON, W. F.; SALTER-GREEN, S. E.; SCOLA, M. M et al. **Enhancement of macrophage inflammatory responses by CCL2 is correlated with increased miR-9 expression and downregulation of the ERK1/2 phosphatase Dusp6.** Cell Immunol., 314: 63–72, 2017.

CARTER, A.B.; KNUDTSON, K.L.; MONICK, M.M. et al. **The p38 mitogen activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP).** J. Biol. Chem.; 274:30858–63, 1999.

CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. **Macrophage polarization in health and disease.** Scientific World Journal, 11: 2391-2402, 2011.

CHAN, G.C.; CHAN, W.K.; SZE, D.M. **The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells.** J. Hematol. Oncol., 2:25, 2009.

CHEN, J. J. W.; YAO, P. L.; YUAN, A. et al. **Upregulation of tumoral interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: Its correlation with tumor**



**angiogenesis and patient survival in nonsmall cell lung cancer.** Clin. Cancer Res., 9:729-37, 2003.

CHO, H. J.; JUNG, J. I.; LIM, D.Y. et al. **Bone marrow-derived, alternatively activated macrophages enhance solid tumor growth and lung metastasis of mammary carcinoma cells in a Balb/C mouse orthotopic model.** Breast Cancer Res., 14(3):R81, 2012.

CHOBOTOVA, K.; VERNALLIS, A. B.; MAJID, F. A. A. **Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives.** Cancer Lett., 290:148–15, 2010.

CHORIKI, M.; FREUDENBERG, M.; GALANOS, C. et al. **Antitumoral effects of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, interferon and activated macrophages: synergism and tissue distribution.** Anticancer Res., 9:1185–90, 1989.

CHRISTIANO, S. C. **Avaliação das atividades pró e antiinflamatória de fração proteolítica obtida do látex de *Carica candamarcensis*.** 2008. 75 f. (Dissertação de mestrado em Farmacologia e Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

CONDEELIS, J. & POLLARD, J.W. **Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis.** Cell., 124(2):263–66, 2006.

COVARRUBIAS, A. J.; AKSOYLAR, H. I.; HORNG, T. **Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling.** Semin. Immunol., 27(4): 286–96, 2015.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. **Paradoxical roles of the immune system during cancer development.** Nat. Rev. Cancer, 6:24–37, 2006.

DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M.L.; GIFFORD, G.E. **Cell associated tumor necrosis factor as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages.** J Immunol., 138(3):957-62, 1987.

DERYUGINA, E. I.; RATNIKOV, B. I.; BOURDON, M. A. et al. **Identification of a Growth Factor for Primary Murine Stroma as Macrophage Colony-Stimulating Factor.** Blood, 86(7):2568-78, 1995.

DESSER, L.; REHBERGER, A.; KOKRON, E. et al. **Cytokine synthesis in human peripheral blood mononuclear cells after oral administration of polyenzyme preparations.** Oncology, 50:403-7, 1993.

DITZ, D. Jr. **Efeito Antimetastático e Mecanismos de Ação de Proteases do Látex de Vasconcellea cundinamarcensis (Carica candamarcensis)** 2011 (Dissertação de mestrado em Farmacologia e Fisiologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

DITZ, D.; FIGUEIREDO, C.; LEMOS, F. O. et al. **Antiangiogenesis, Loss of Cell Adhesion and Apoptosis Are Involved in the Antitumoral Activity of Proteases from V. cundinamarcensis (C. candamarcensis) in Murine Melanoma B16F1.** Int. J. Mol. Sci., 16:7027-44, 2015.

DONG, Z.; O'BRIAN, C.A.; FIDLER, I.J. **Activation of tumoricidal properties in macrophages by lipopolysaccharide requires protein- tyrosine kinase activity.** J. Leukoc. Biol. 53(1):53–60, 1993.

ECKERT, K.; GRABOWSKA, E.; STANGE, R. et al. **Effects of oral bromelain administration on the impaired immunocytotoxicity of mononuclear cells from mammary tumor patients.** Oncol Rep., 6(6):1191-9, 1999.

EDWARDS, J.P.; ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K.A. et al. **Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations.** Journal of Leukocyte Biology, 80(6):1298-307, 2006.

EDWARDS, C.K. ; GHASUDDIN, S.M. ; SCHEPPER, J.M. et al. **A newly defined property of somatotropin: priming of macrophages for production of superoxide anion.** Science, 239 (4841 Pt 1):769-1, 1988.

FERRARI, M.; FORNASIERO, M. C.; ISETTA, A. M. **MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro.** J. Immunol. Methods, 131:165-172, 1990.

FREITAS, K. M.; STEHLING, L. F. O.; BARCELOS L. S. et al. **Fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* HOOK F. 1875 acelera a cicatrização de feridas excisionais cutâneas em camundongos.** In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa. . Anais do XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010.

FU, Y. X.; WATSON, G. A.; KASAHARA, M. et al. **The role of tumor-derived cytokines on the immune system of mice bearing a mammary adenocarcinoma. I. Induction of regulatory macrophages in normal mice by the in vivo administration of rGM-CSF.** J. Immunol., 146(2):783-9, 1991.

FUKAO, T.; TANABE, M.; TERAUCHI, Y. et al. **PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs.** Nat. Immunol., 3(9):875-81, 2002.

FUKUDA, K.; KOBAYASHI, A.; WATABE, K. **The role of tumor associated macrophage in tumor progression.** Front Biosci 4:787–798, 2012.

GARACI, E.; PICA, F.; SERAFINO, A. et al. **Thymosin alpha1 and cancer: action on immune effector and tumor target cells.** Ann. N. Y. Acad. Sci., 1269:26–33, 2012.

GERMANO, G.; FRAPOLLI, R.; BELGIOVINE, C. et al. **Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin.** Cancer Cell 23:249–262, 2013.

GHONEUM, M.; BADR EL-DIN, N. K.; NOAMAN, E. et al. **Saccharomyces cerevisiae, the Baker's Yeast, suppresses the growth of Ehrlich carcinoma-bearing mice.** Cancer Immunol. Immunother., 57:581-92, 2008.

GIESELER, F.; UNGEFROREN, H.; SETTMACHER, U. et al. **Proteinase-activated receptors (PARs) – focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact.** Cell Commun Signal., 11: 86-116, 2013.

GILLES, C.; NEWGREEN, D.F.; SATO, H. et al. **Matrix Metalloproteases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Implications for Carcinoma Metastasis.** Madame Curie Bioscience Database, Landes Bioscience; 2000-2013.

GOENKA, S.; DAS T.; SA, G.; RAY, P.K. **Protein A induces NO production: involvement of tyrosine kinase, phospholipase C, and protein kinase C.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 250:425–29, 1998.

GOMES, M. T. R.; TURCHETTI, A. P.; LOPES, M. T.P. et al. **Stimulation of fibroblast proliferation by the plant cysteine protease CMS2MS2 is independent of its proteolytic activity and requires ERK activation.** Biol. Chem., 390: 1285–91, 2009.

GOMES, M. T. R.; RIBEIRO, H. A.; LOPES, M. T.P. et al. **Biochemical comparison of two proteolytic enzymes from *Carica candamarcensis*: Structural motifs underlying resistance to cystatin inhibition.** Phytochemistry, 71:524–530, 2010.

GOMES, F. S. L.; SPÍNOLA, C. V.; RIBEIRO, H. A. et al. **Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn.** Burns, 36:277-283, 2010.

GOMES, M. T. R.; MELLO, V. J.; RODRIGUES, K. C. et al. **Isolation of two plant proteinases in látex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells.** Plant Med.,71:244-248, 2005.

GOMES, M.T.R.; BEMQUERER, M.P.; LOPES, M.T.P. et al. **The structure of CMS2MS2, a mitogenic protein isolated from latex of *Carica candamarcensis*.** Biol. Chem. 388, 819–822, 2007.

GRAVINA, M. C.; TERMIGNONI, C.; SALAS, C. E. **Biochemical characterization of a new cysteine endopeptidase from *Carica candamarcensis*.** Plant Sci., 102: 11-18, 1995.

GREEN, C. E.; LIU, T.; MONTEL, V. et al. **Chemoattractant signaling between tumor cells and macrophages regulates cancer cell migration, metastasis and neovascularization.** PLoS One, 4(8):6713-28, 2009.

GRIVENNIKOV, S. I.; FLORIAN, R. G.; KARIN, M. **Immunity, Inflammation, and Cancer.** Cell, 140(6): 883–99, 2010.

GUIMARÃES, C. A. & LINDEN, R. **Programmed cell deaths.** Eur. J. Bioc., 271(9): 1638-50, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HANAHAN, D. & COUSSENS, L.M. **Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment.** Cancer Cell. 21:309–22, 2012.

HANNA, E.; QUICK, J.; LIBUTTI, S. K. **The tumour microenvironment: a novel target for cancer therapy.** Oral Dis., 15:8–17, 2009.

HEUSINKVELD, M. & VAN DER BURG, S. H. **Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers.** J. Medicine, 9:216, 2011.

HIROSHIMA, Y.; MAAWY, A.; HASSANEIN, M.K. et al. **The tumor-educated-macrophage increase of malignancy of human pancreatic cancer is prevented by zoledronic acid.** PLoS One 9:e103382, 2014.

HU, X. & BEETON, C. **Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography.** J. Vis. Exp. (45), e 2445, 2010.

JOHANSSON, U. ; LAWSON, C. ; DABARE, M. et al. **Human peripheral blood monocytes express protease receptor-2 and respond to receptor activation by production of IL-6, IL-8, and IL-1 $\beta$ .** J. Leukoc. Biol., 78(4):967–975, 2005.

JUHAS, U.; RYBA-STANISLAWOWSKA M.; SZARGIEJ P. et al. **Different pathways of macrophage activation and polarization.** Postepy. Hig. Med. Dosw., 69:496-502, 2015.

JUNTTILA, M. R., & de SAUVAGE, F. J. **Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response.** Nature, 501(7467): 346–54, 2013.

KALRA, N.; BHUI, K.; ROY, P. et al. **Regulation of p53 nuclear factor kappaB and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin.** Toxicol. Appl. Pharmacol., 226:30–7, 2008.

KASIBHATLA, S.; GOURDEAU, H.; MEEROVITCH, K. et al. **Discovery and mechanism of action of a novel series of apoptosis inducers with potential vascular targeting activity.** *Mol. Cancer Ther.*, 3(11):1365-74, 2004.

KELLER, R.; KEIST, R.; FREI, K. **Lymphokines and bacteria that induce tumoricidal activity, trigger a different secretory response in macrophages.** *Eur. J. Immunol.*, 20(30):695–8, 1990.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. **Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment.** *Cell*. 2010; 141(1):52-67

KILLION, J. J. & FIDLER, I. J. **Therapy of cancer metastasis by tumoricidal activation of tissue macrophages using liposome-encapsulated immunomodulators.** *Pharmacol. Ther.*, 78(3):141-54, 1998.

KHALID, A. & JAVAID, M. A. **Matrix Metalloproteinases: New Targets in Cancer Therapy.** *J Cancer Sci Ther*, 8(6): 143-53, 2016.

KOEBEL, C. M.; VERMI, W.; SWANN, J. B. et al. **Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state.** *Nature*, 450:903–907, 2007.

KUMAR, P.A. & MENON, R.K. **New insights into growth hormone's actions on the macrophage: implications for non-growth-related actions of growth hormone.** *OA Biochemistry*, 1(2):15, 2013.

KURAHARA, H. et al. **Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer.** *J Surg Res*, v. 167, n. 2, p. e211-9, 2011.

LANDMAN, D.; GEORGESCU, C.; MARTIN, D. A. et al. **Polymyxins Revisited.** *Clin. Microbiol. Rev.*, 449–65, 2008.

LEIPNER, J. & SALLER, R. **Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action.** *Drugs*, 59(4): 769-780, 2000.

LEMOS, F. O.; VILLALBA, M. I. C.; TAGLIATI, C. A. et al. **Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity of a *Vasconcellea cundinamarcensis* proteinase fraction with pharmacological activity.** *Rev. Brasileira de Farmacognosia*, 26:94–101, 2016.

LEMOS, F.O. **Análise proteômica comparativa de linhagens celulares de melanoma e melanócito murinos frente ao tratamento com fração proteolítica derivada do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*.** (Tese de doutorado em Farmacologia e Fisiologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

LEON, J. **Botánica de Los Cultivos Tropicales.** San Jose: IICA, 445, 1987.

LIN, W. & KARIN, M. **Cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer.** J. Clin. Invest., 117(5): 175-83, 2007.

LOFFEK, S.; SCHILLING, O.; FRANZKE, C-W. **Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance.** Eur Respir J; 38:191–208, 2011.

LIU, Y. & CAO, X. **The origin and function of tumor-associated macrophages.** Cellular & Molecular Immunology 1–4, 2014.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D. et al. **NF- $\kappa$ B signaling in inflammation.** Signal Transduction and Targeted Therapy 2, e17023, 2017.

MACE, K. F.; EHRKE, M. J.; HORI, K. et al. **Role of Tumor Necrosis Factor in Macrophage Activation and Tumoricidal Activity.** Cancer Res., 48:5427-32, 1988.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A. et al. **Cancer-related inflammation.** Nature, 454:436–44, 2008.

MANTOVANI, A.; BISWAS, S.K.; GALDIERO, M.R. et al. **Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling.** J. Pathol., 229: 176–85, 2013.

MANTOVANI, A.; MARCHESI, F.; PORTA, C. et al. **Inflammation and cancer: Breast cancer as a prototype.** The Breast, 16:S27–33, 2007.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S. et al. **The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.** Trends Immunol., 25:677-86, 2004.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M. et al. **Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes.** Trends Immunol., 23:549-555, 2002.

MASKOS, K. **Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors.** *Biochimie.*, 87:249–63, 2005.

MAVIER, P. & EDINGTON, T.S. **Human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. I. Demonstration of an oxygen dependent myeloperoxidase-independent mechanism.** *J. Immunol.*, 132:1980–84, 1984.

MEDVEDEV, A.E.; KOPYDLOWSKI, K.M.; VOGEL, S.N. **Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression.** *J. Immunol.*, 164(11):5564-74, 2000.

MELLO, V. J., GOMES, M. T. R., RODRIGUES, K. C. L. et al. **Plant Proteinases: their potential as therapeutic drugs.** In: Govil, J.N., Singh, V.K., Arunachalam, C. *Drug Develop Molec Texas Studium Press*, 211-224, 2006.

MELLO, V. J.; GOMES, M. T. R.; LEMOS, F. O. et al. **The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*.** *Phytomedicine*, 15(4):237-44, 2008.

MORRISON, D.C. & JACOBS, D.M. **Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides.** *Immunochemistry*, 13(10): 813-81, 1976.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J. Immunol. Methods*, 65(1-2):55-63, 1983.

MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** *Nat. Rev. Immunol.*, 10(6):460, 2010.

MURPHY, G. **Tissue inhibitors of metalloproteinases.** *Genome Biol.* 12:233, 2011.

MURRAY, P.J.; ALLEN, J.E.; BISWAS, S.K. et al. **Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines.** *Immunity* 41(1):14-20, 2014.



NAKANISHI, Y.; NAKATSUJI, M.; SENO, H. et al. **COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin/1 mouse polyps.** *Carcinogenesis*, 32(9):1333–9, 2011.

NIU, M.; VALDES, S.; NAGUIB, Y.W. et al. **Tumor associated macrophage-mediated targeted therapy of triple negative breast cancer.** *Mol Pharm* 13:1833–1842, 2016.

PACE, J. L. & RUSSELL, S. W. **Activation of mouse macrophages for tumor cell killing. I. Quantitative analysis of interactions between lymphokine and lipopolysaccharide.** *J. Immunol.*, 126(5):1863-7, 1981.

PALUCKA, A.K. & COUSSENS, L.M. **The basis of oncoimmunology.** *Cell* 164:1233–47, 2016.

PHARES, K. & KUBIK, J. **The growth factor from plerocercoids of *Spirometra mansonioides* is both a growth hormone agonist and a cysteine proteinase.** *J Parasitol.*, 82(2): 210-215, 1996.

PHARES, K. **An unusual host-parasite relationship: the growth hormone-like factor from plerocercoids of *Spirometrid* Tapeworms.** *Int. J. Parasitol.*, 26(6): 575-588, 1996.

POLLARD, J. W. **Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis.** *Nature Rev. Cancer*, 4: 71-78, 2004.

RAES, G.; DE BAETSELIER, P.; NOËL, W. et al. **Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages.** *J. Leukoc. Biol.*, 71: 597–602; 2002.

RAJABI, M. & MOUSA, S. A. **The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment.** *Biomedicines*. 5(2): 34-46, 2017.

RAKOFF-NAHOUM, S. **Why Cancer and Inflammation?** *Yale J. Biol. Med.* 79:123-30, 2006.

RAO, K.M. **MAP kinase activation in macrophages.** J. Leukoc. Biol., 69(1):3-10, 2001.

REINER, N. E. **Macrophages and Dendritic Cells.** Methods and Protocols. Methods in molecular biology, 2009.

RIVLIN, N.; BROSH, R.; OREN, M. et al. **Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis.** Genes & Cancer, 2(4):466–74, 2011.

RHEE, I. **Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment.** Arch Pharm Res, 39(11):1588-96, 2016.

ROMAN, A.; ROGÓ, Z.; KUBERA, M. et al. **Concomitant administration of fluoxetine and amantadine modulates the activity of peritoneal macrophages of rats subjected to a forced swimming test.** Pharmacol. Rep., 61(6):1069-77, 2009.

ROSZER, T. **Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms.** Mediators of Inflammation, 2015.

SALAS, C. E.; VILLALBA, M. I. C; MELLO, V. et al. **Oral subchronic toxicity evaluation of a latex proteolytic fraction from *Carica candamarcensis*.** Toxicol. Lett., 196:S258, 2010.

SANSON, M.; DISTEL, E.; FISHER, E.A. **HDL induces the expression of the M2 macrophage markers arginase 1 and Fizz-1 in a STAT6- dependent process.** PLoS One 8:E74676, 2013.

SEYFRIED, T. N & HUYSENTRUYT, L. C. **On the Origin of Cancer Metastasis.** Crit Rev Oncog, 18(1-2): 43–73, 2013.

SCHUMANN, R.R.; LEONG, S.R.; FLAGGS, G.W. et al. **Structure and function of lipopolysaccharide binding protein.** Science, 249:1429–31, 1990.

SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. **Cancer related inflammation: the macrophage connection.** Cancer Lett., 267:204–15, 2008.

STEIN, M.; KESHAV, S.; HARRIS, N. et al. **Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation.** J. Exp. Med., 176:287-92, 1992.

STOCK, M.K.; HAMMERICH, L.; DO, O.N. et al. **Met-CCL5 modifies monocyte subpopulations during liver fibrosis regression.** Int J Clin Exp Pathol 6:678–685, 2013.

STUEHR, D.J. & MARLETTA, M.A. **Synthesis of nitrite and nitrate in macrophage cell lines.** Cancer Res., 47:5590–94, 1987.

TAN, H-Y; WANG, N.; LI, S et al. **The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Review Article, volume 2016, 16 pages, 2016

TRINCHIERI, G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 677-706, 2012.

TSAI, MJ; CHANG, WA; HUANG, MS et. al. **Tumor microenvironment: a new treatment target for cancer.** ISRN Biochemistry. Article ID 351959, 8 pages, 2014.

TUGUES, S., BURKHARD, S.H., OHS, I et al. **New insights into IL-12-mediated tumor suppression.** Cell Death and Differentiation, 22:237–46, 2015.

URONEN-HANSSON, H.; ALLEN, M.L.; LICHTAROWICZ-KRYNSKA, E. et al. **Growth hormone enhances proinflammatory cytokine production by monocytes in whole blood.** Growth. Horm. IGF Res., 13(5):282-6, 2003.

VIANA, C. T. R. **Avaliação da atividade antitumoral e imunomodulatória de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* Hook 1835 em modelo de carcinoma de Ehrlich.** 2010. 104 f. (Dissertação de mestrado em Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

VIANA, C.T.; CAMPOS, P.P.; CARVALHO, L.A. et al. **Distinct types of tumors exhibit differential grade of inflammation and angiogenesis in mice.** *Microvasc. Res.*, 86:44-51, 2013.

WALRAEVEENS, V.; VANDERMEERS-PIRET, M. C.; VANDERMEERS, A. et al. **Isolation and primary structure of the CCI papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* hook.** *Biol. Chem.*, 380(4):485-8, 1999.

WAHL, L. M. & KLEINMAN, H. K. **Tumor-Associated Macrophages as Targets for Cancer Therapy.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 90(21):1583-4, 1998.

Wang, N.; Liang, H.; Zen, K. **Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance.** *Front Immunol.*, 5: 614, 2014.

WANG, Y.; LIN, Y.X.; QIAO, S.L. et al. **Polymeric nanoparticles promote macrophage reversal from M2 to M1 phenotypes in the tumor microenvironment.** *Biomaterials*, 112:153–63, 2017.

WEISCHENFELDT, J. & PORSE, B. **Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, pdb.prot5080, 2008.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. **Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease.** *Nature*, 496(7446): 445–55, 2013.

WRIGHT, S. D. **Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity.** *J. Exp. Med.*, 189:605–9, 1999.

XIAO-XIAO, L.; YI-FAN, J.; HONG, L. et al. **Polymyxin B as an inhibitor of lipopolysaccharides contamination of herb crude polysaccharides in mononuclear cells.** *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(7): 0487, 2017.

XIE, Q. W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. **Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase.** *J. Biol. Chem.*, 269:4705–08, 1994.

XING, Z.; ZGANIACZ, A.; SANTOSUOSSO, M. **Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically**

**release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction.** *J. Leukoc. Biol.*, 68(6):897-902, 2000.

**YANG, L. & ZHANG, Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application.** *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1):58, 2017.

**YOSHIMOTO, T.; NAGASE, H.; ISHIDA, T. et al. Induction of interleukin-12 p40 transcript by CD40 ligation via activation of nuclear factor- B.** *Eur. J. Immunol.*, 27:3461–70, 1997.

**ZANGANEH, S.; HUTTER, G.; SPITLER, R. et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues.** *Nat. Nanotechnol.*, 11:986–94, 2016.

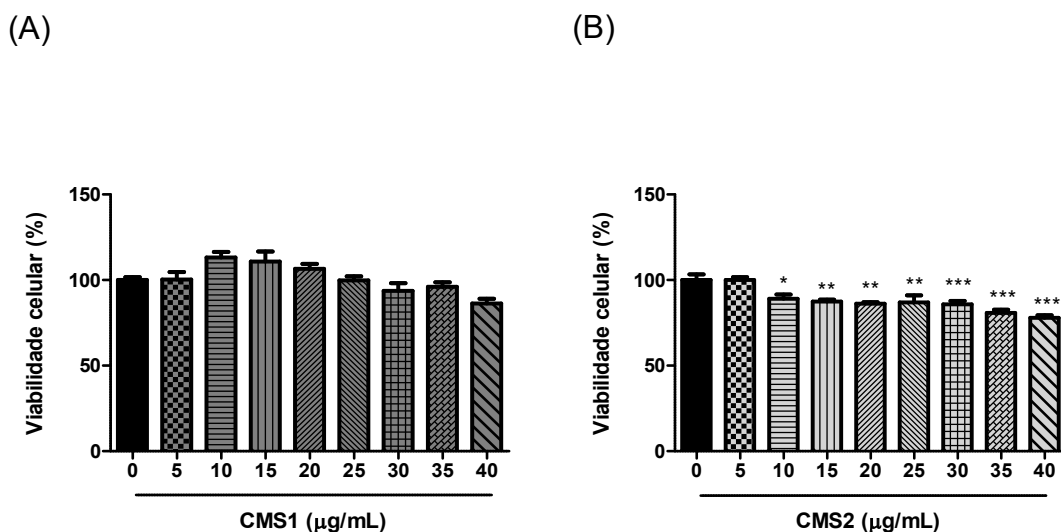
**ZHANG, H.; ZENG, X.; HE, S. Evaluation on Potential Contributions of Protease Activated Receptors Related Mediators in Allergic Inflammation.** *Mediators of Inflammation*. Volume 2014. 20 pages.

**ZAVADOVA, E.; DESSER, L.; MOHR, T. Stimulation of reactive oxygen species production and cytotoxicity in human neutrophils in vitro and after oral administration of a polyenzyme preparation.** *Cancer Biother.*, 10:147-52, 1995.

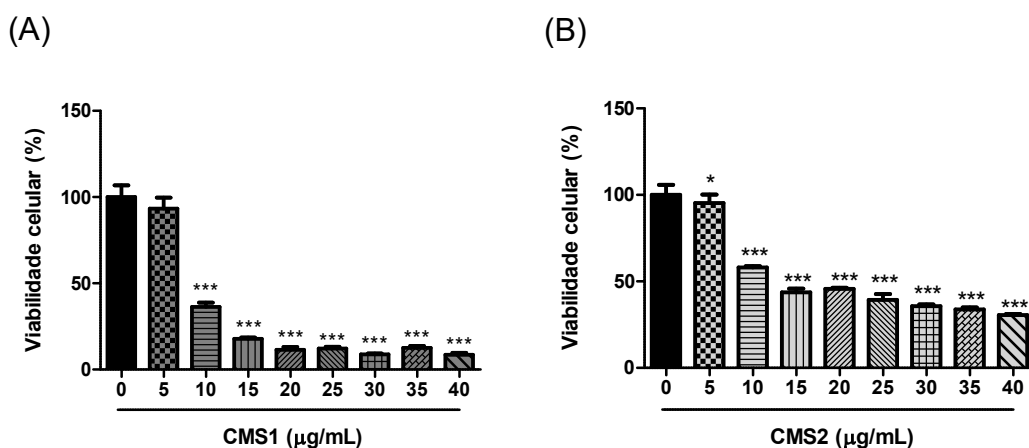
**ZHOU, G.L.; TUCKER, D.F.; BAE, S.S. et al. Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration.** *J. Biol. Chem.*, 281(47):36443–53, 2006.

**ZUCKER, S.; PEI, D.; CAO, J. et al. Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP).** *Curr. Top. Dev. Biol.*, 54:1–74, 2003.

## APÊNDICE A – Determinação da viabilidade de macrófagos e células 4T1 após tratamento com CMS1 e CMS2

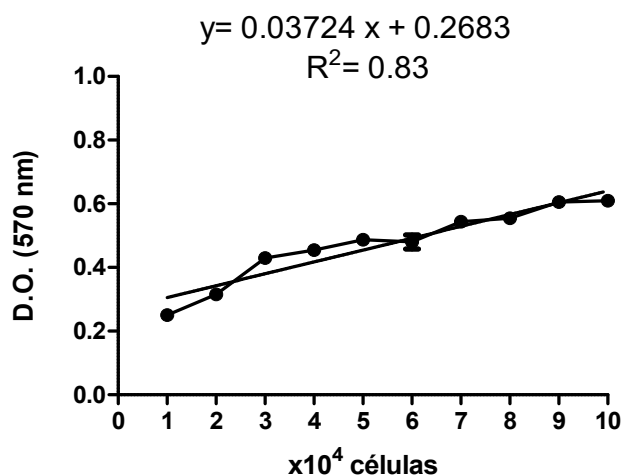


**Figura 1: Avaliação da viabilidade de macrófagos peritoneais após exposição a CMS1 ou CMS2.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados em placas de 96 poços ( $1 \times 10^5$  céls/poço) e expostos a CMS1, CMS2 (5- 40  $\mu\text{g/mL}$ ) ou controle (RPMI 1640) por 24 h. Posteriormente, as culturas foram expostas ao MTT (0,5mg/mL) e a metabolização do MTT em formazan foi determinado após 3h. Cada coluna representa a porcentagem média de viabilidade celular  $\pm$  e.p.m. (n=6). Resultados estatisticamente diferentes do grupo controle - \* $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

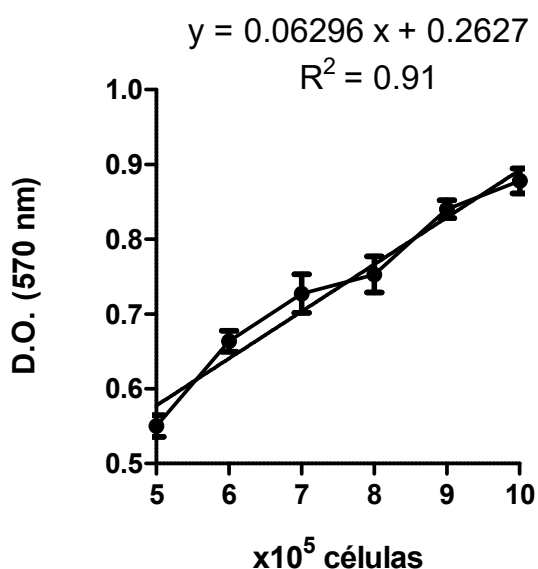


**Figura 2: Avaliação da viabilidade da linhagem tumoral 4T1 após exposição a CMS1 ou CMS2.** As células foram semeadas em placas de 96 poços ( $4 \times 10^3$  céls/poço) e expostas a CMS1, CMS2 (5- 40  $\mu\text{g/mL}$ ) ou controle (RPMI 1640) por 24 h. Posteriormente, as culturas foram expostas ao MTT (0,5mg/mL) e a metabolização do MTT em formazan foi determinado após 3h. Cada coluna representa a porcentagem média de viabilidade  $\pm$  e.p.m. (n=6). Resultados estatisticamente diferentes do grupo controle - \* $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

## APÊNDICE B – Curvas D.O. versus número de macrófagos



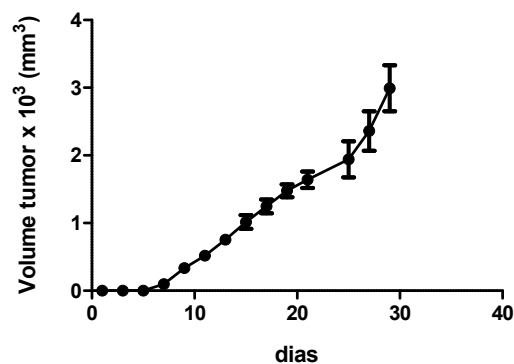
**Figura 1: Curva para correção dos níveis NO e ROS pelo número de macrófagos em cultura.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados em placas de 96 poços em diferentes densidades celulares ( $10^4$  -  $10^5$  céls/poço). Posteriormente, as culturas foram expostas ao MTT (0,5mg/mL) e a metabolização em formazan foi determinada após 3 h. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em 570 nm. Cada ponto representa a média  $\pm$  e.p.m da densidade óptica obtida (n=4).



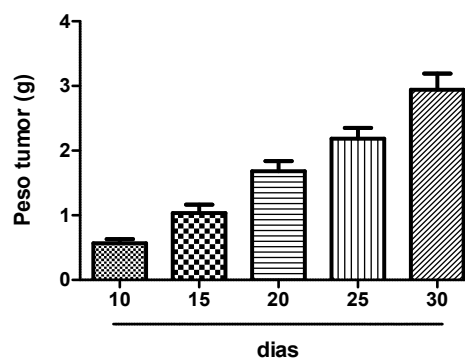
**Figura 2: Curva para correção dos níveis de citocinas pelo número de macrófagos em cultura.** Macrófagos peritoneais foram obtidos após estimulação com tioglicolato (3%, *i.p.*, 3 dias), cultivados em placas de 24 poços em diferentes densidades celulares ( $5 \times 10^5$  -  $10^6$  céls/poço). Posteriormente, as culturas foram expostas ao MTT (0,5mg/mL) e a metabolização em formazan foi determinada após 90 min. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em 570nm. Cada ponto representa a média  $\pm$  e.p.m da densidade óptica (n=4).

## APÊNDICE C – Padronização do modelo de carcinoma de mama 4T1

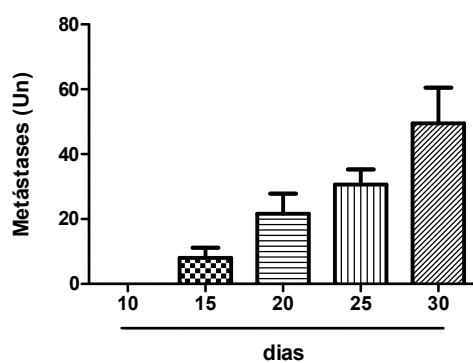
(A)



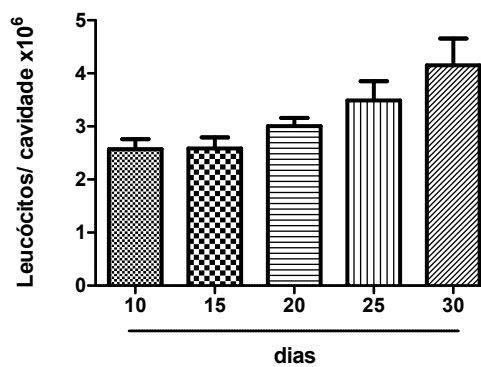
(B)



(C)



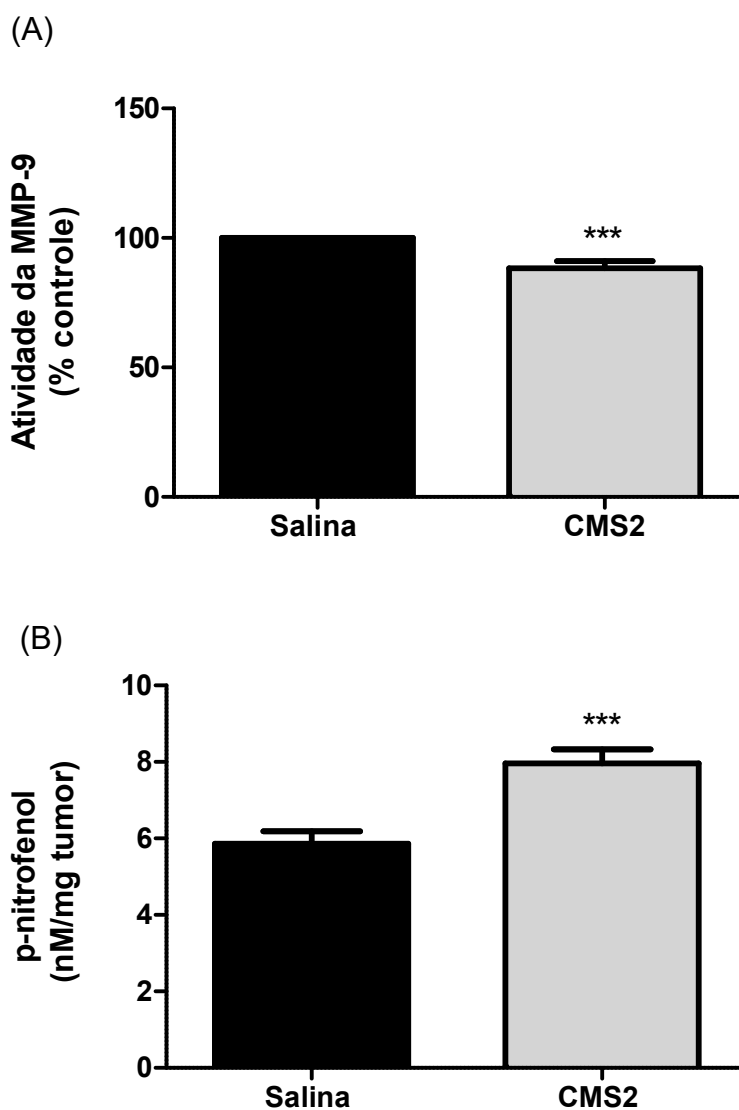
(D)



**Figura 1: Curva de crescimento do carcinoma de mama 4T1.** Camundongos BALB/c fêmeas receberam no flanco esquerdo inóculo de células 4T1 ( $10^6$  céls/100  $\mu$ L). O crescimento tumoral foi acompanhado, do 1º ao 30º dia, através da medida de volume dos tumores com auxílio de um paquímetro (A), da massa dos tumores (B), do número de metástases pulmonares (C), contabilizados em pulmões corados com tinta nanquim e (D) do número de leucócitos presentes em lavado broncoalveolar.

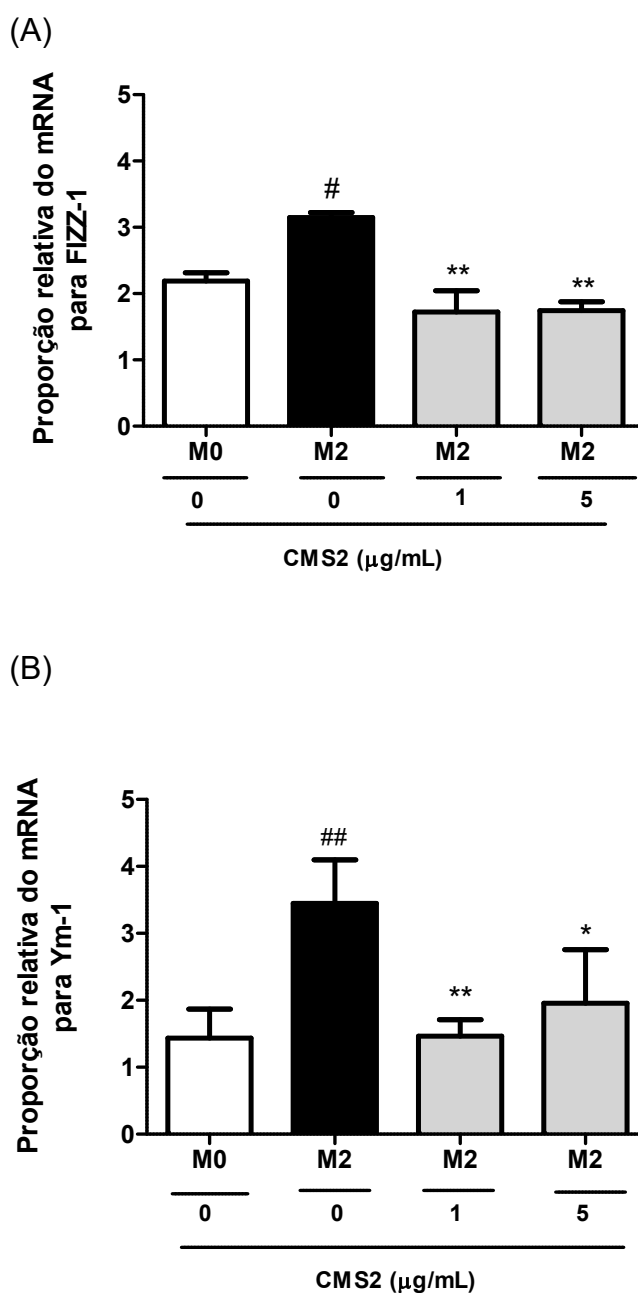


## APÊNDICE D – Avaliação de MMP-9 e NAG em carcinomas 4T1 após 15 dias de desenvolvimento tumoral



**Figura 1: Efeito de CMS2 sobre a atividade das enzimas metaloprotease-9 e NAG em carcinoma de mama 4T1.** Camundongos BALB/c fêmeas receberam no flanco esquerdo inóculo de células 4T1 (106 céls/100 $\mu$ L). Os animais foram tratados durante 14 dias com CMS2 (1,0mg/Kg) ou salina. No 15<sup>o</sup> dia, os animais foram eutanasiados e os tumores processados. (A) O homogenato tumoral (15  $\mu$ g) foi aplicado em gel para eletroforese em acrilamida/gelatina. A análise semiquantitativa, das bandas não marcadas, foi realizada usando o programa de análise de imagem ImageJ® (B) O homogenato tumoral foi colocado juntamente com o substrato p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase, para a determinação da atividade de NAG. Os resultados foram expressos em (A) porcentagem do controle e (B) em concentração de p-nitrofenol/mg de tecido. Os dados representam média  $\pm$  e.p.m. (\*\*p<0,001), Teste t de Student. *Resultados obtidos durante o desenvolvimento do Trabalho de Conclusão de curso da aluna Livia Cristina Teixeira.*

## APÊNDICE E – Avaliação da expressão de FIZZ-1 e Ym-1 em macrófagos



**Figura 1: Efeito de CMS2 sobre a expressão de genes codificadores para FIZZ-1 e Ym-1.** Células medulares foram cultivadas em DMEM/meio condicionado da célula L929 para diferenciação de macrófagos (M0). Para a obtenção de macrófagos com fenótipo M2, macrófagos M0 foram tratados com IL-4 *overnight*. Dois grupos de macrófagos M2 receberam o tratamento de CMS2 1µg/mL ou 5µg/mL por 24h. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com *primers* específicos para os genes citados. A Proporção relativa do mRNA para FIZZ-1 (A) e Ym-1 (B) foi realizada mediante quantificação da densidade óptica de bandas, visualizadas em luz UV, provenientes da corrida eletroforética em gel de agarose 1% dos produtos de reação e após incubação em solução de brometo de etídio. As análises de densidade óptica das bandas foram realizadas com auxílio do software Image-J. Os dados representam média ± e.p.m. (\*p < 0,05 e \*\* p < 0,01), One-Way ANOVA, pós teste Bonferroni. *Resultados obtidos durante o desenvolvimento do Trabalho de Conclusão de curso da aluna Livia Cristina Teixeira.*

**ANEXO A – Protocolo de aprovação para o uso de animais experimentais****UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Senhor(a) Professor(a) Miriam Teresa Paz Lopes,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Efeito antitumoral e antimetastático de frações proteolíticas advindas do látex de *V. cundinamarcensis* sobre modelo tumoral inflamatório, submetido a esta comissão pelo protocolo 219 / 2012, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 17/08/2015.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>  
Belo Horizonte, 18/08/2015.

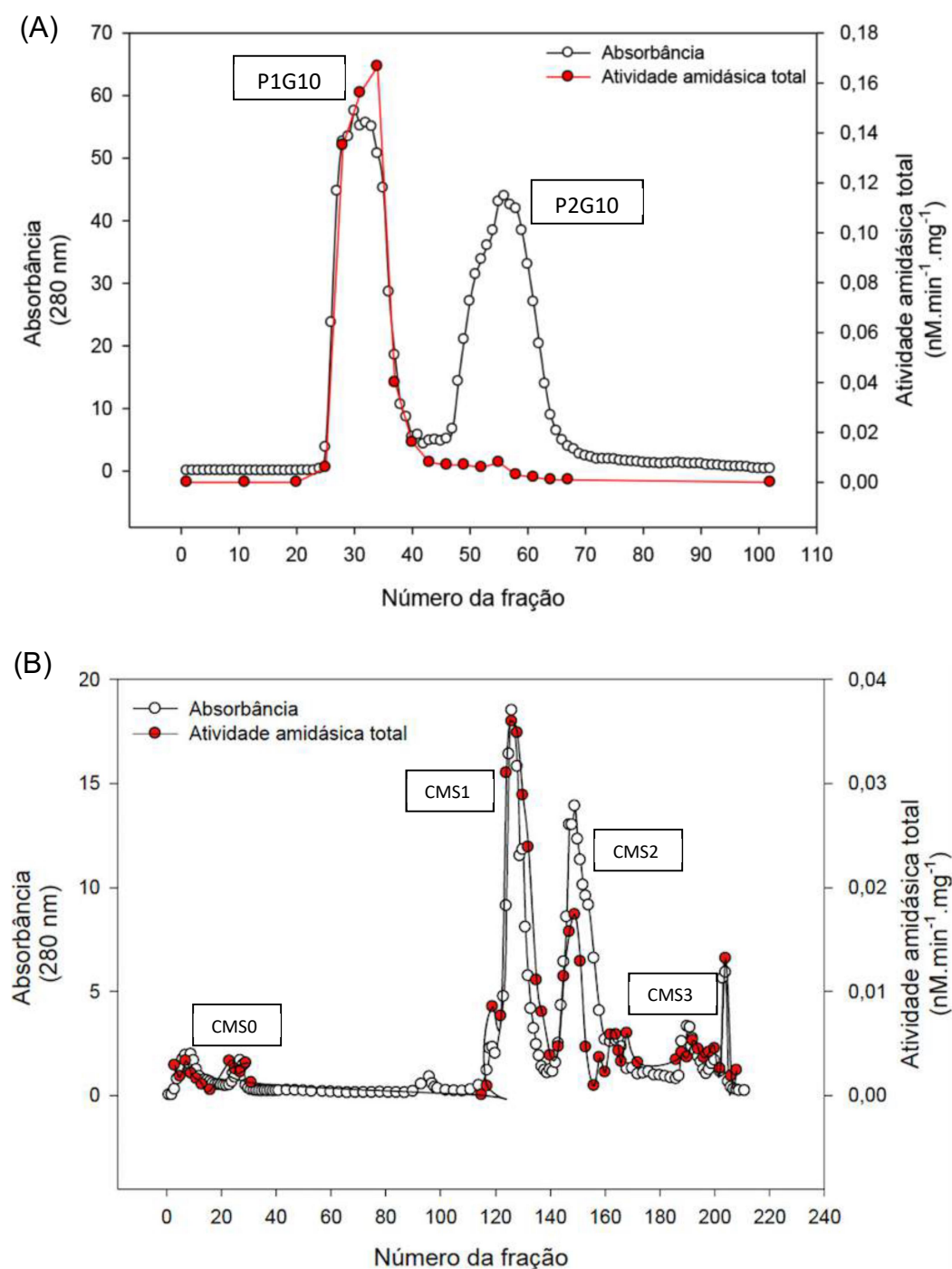
Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

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

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

## ANEXO B – Perfis cromatográficos de isolamento das proteases de *V. Cundinamarcensis*



**Figura 1: Perfis cromatográficos de frações do látex de *V. cundinamarcensis*.** A – A solução do látex foi aplicada sobre a coluna Sephadex G10 e a determinação do perfil protéico (280 nm) e da atividade amidásica (BAPNA) permitiram a separação de dois picos bem definidos, P1G10 e P2G10. B – Em um segundo passo cromatográfico, a fração P1G10 foi aplicada em coluna de troca iônica, CM-Sephadex, e obteve-se a eluição de 4 picos (CMS0-CMS3), sendo CMS1 e CMS2 os detentores da maior quantidade de proteínas e atividade amidásica.