

CELSO TARSO RODRIGUES VIANA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO E ANGIOGÊNICO  
ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE TUMORES MURINOS**

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Passos Andrade  
(Dep. Fisiologia e Biofísica)

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Peixoto  
Campos (Dep. Patologia Geral)

Belo Horizonte / MG  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

2014

CELSO TARSO RODRIGUES VIANA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO E ANGIOGÊNICO  
ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE TUMORES MURINOS**

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

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Passos Andrade  
(Dep. Fisiologia e Biofísica)

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Peixoto  
Campos (Dep. Patologia Geral)

Belo Horizonte / MG  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

2014

## AGRADECIMENTOS

As vitórias só são completas quando compartilhadas.

### Agradeço

A minha mãe Maria Josina de Pinho Rodrigues, por iluminar meu caminho.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Silvia Passos Andrade, pela oportunidade, eloquência, estilo, raciocínio, grandeza.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Paula Peixoto Campos Lopes, pelo apoio durante a realização dos experimentos pelos conselhos dados e por toda atenção.

Aos meus amigos do Laboratório de Angiogênese, que mantiveram meus dias congestionados da alegria.

Aos meus amigos do Laboratório de Substâncias Antitumorais (LSAT), sempre presentes.

Ao pessoal da Secretaria da Pós-Graduação, por toda ajuda, presteza e gentileza.

A Universidade Federal de Minas Gerais e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, pelo aprendizado e a CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro concedido.

## RESUMO

A inflamação e a angiogênese são características comuns de quase, se não de todos, os tumores sólidos, no entanto não encontramos estudos que avaliaram comparativamente estes processos em diferentes tipos de tumores visando identificar o padrão dominante em neoplasias de origens distintas. Os objetivos deste estudo foram identificar os padrões da inflamação e angiogênese em tumores experimentais murinos de diferentes origens (melanoma, cólon e mama) e caracterizar as alterações vasculares no tecido cutâneo adjacentes a estes tumores. Além disso, avaliamos a contribuição da inflamação aguda e crônica para o desenvolvimento do tumor mamário, utilizando implantes sintéticos de polieter-poliuretano para alojar as células 4T1, 24h ou 10 dias pós-implantação. A inoculação de células tumorais ( $10^6$ ) de B16F10, CT26.WT e 4T1 no flanco de camundongos resultou em massas tumorais que diferiram entre si. Melanomas (B16F10) foram duas vezes maiores do que o tumor de colón (CT26.WT) e dez vezes maiores do que o tumor mamário (4T1). Localmente, as células CT26.WT induziram maior número de vasos no tecido cutâneo adjacente ao tumor, e sistemicamente, os níveis do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) foram duas vezes mais altos comparados aos níveis dos dois outros tumores. A inflamação, avaliada pela atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) e pelos níveis da citocina inflamatória, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e da quimiocina CCL2 foi mais intensa no tumor mamário. O índice vascular, determinado pela quantidade de hemoglobina (Hb) e número de vasos nas áreas mais vascularizadas dos tumores, foi duas vezes maior no melanoma. A

análise por citometria de fluxo da população celular de implantes de 24h era predominantemente de neutrófilos (42.53% +/- 8.45) e monócitos (37.53% +/- 7.48). Em implantes de 10 dias, macrófagos eram predominantes (37.10% +/- 4.54), seguidos por linfócitos (28.1% +/- 4.77) e monócitos (22.33% +/- 3.05). O tumor mamário foi duas vezes maior quando desenvolvido na inflamação crônica comparado ao tumor desenvolvido na inflamação aguda e cinco vezes maior comparado ao tumor desenvolvido sem o suporte inflamatório do implante. A maioria dos parâmetros inflamatórios e angiogênicos também foi mais exacerbado nos tumores alojados nos implantes. Nossos resultados mostraram que tipos distintos de tumores apresentam crescimento e componentes inflamatórios e angiogênicos diferenciais quanto à intensidade dos processos. Além disso, foi mostrado que a inflamação crônica foi mais eficaz para o desenvolvimento do tumor mamário do que a inflamação aguda. Este estudo contribuiu para elucidar a participação da inflamação e angiogênese na progressão tumoral, levantando a possibilidade de uma abordagem terapêutica para o câncer com base na intensidade destes marcadores tumorais.

## ABSTRACT

Inflammation and angiogenesis are common features of almost, if not all tumors, however we found no studies that comparatively evaluated these processes in different types of tumors in order to identify the dominant pattern in tumors of different origins. The objectives of this study were to identify the patterns of these processes in murine experimental tumors of different origins (melanoma, breast and colon) and characterize vascular changes in the skin tissue adjacent to these tumors. Furthermore, we evaluated the contribution of acute and chronic inflammation in the development of mammary tumor using synthetic implants (polyether-polyurethane) to host 4T1 cells, 24 hours or 10 days post-implantation. The tumor cell inoculation ( $10^6$ ) of B16F10, 4T1 and CT26.WT at the flank of mice resulted in tumor masses that differ among them. Melanomas were two times larger than the tumors of the colon and ten times greater than the mammary tumor. Locally, the CT26.WT cells induced higher number of vessels in the skin tissue adjacent to the tumor, but systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) were twice as high compared to the levels of the two other tumors. Inflammation as assessed by the enzyme myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) and the levels of inflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and chemokine CCL2 were more intense in the mammary tumor. The vascular index, determined by the amount of hemoglobin (Hb) and number of vessels in the most vascularized areas of the tumor, was twice higher in melanoma. The flow cytometric analysis of the cell population in 24h implants was predominantly of neutrophils (8.45 +/- 42.53%) and monocytes (37.53% +/- 7.48). In 10 day old

implants, macrophages were the predominant cell population (37.10% +/- 4.54), followed by lymphocytes (28.1 +/- 4.77%) and monocytes (22:33 3:05 +/-%). The mammary tumor was two times bigger when developed in chronic inflammation when compared to tumors developed in acute phase of inflammation and five times higher compared with tumor developed without the inflammatory implant support. Inflammatory and angiogenic parameters were also more exacerbated in tumor bearing implants. Our results showed that different types of tumors have inflammatory and angiogenic growth and differential in the intensity components of the evaluated processes (growth, angiogenesis and inflammation). Furthermore, it was shown that chronic inflammation was more effective for the development of mammary tumor than acute inflammation. This study may have contributed to elucidate the involvement of inflammation and angiogenesis in tumor progression, raising the possibility of a therapeutic approach for cancer based on the intensity of these tumor markers.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Ag:** antígeno

**ANOVA :** analysis of variance

**BMDCs:** bone marrow-derived cells

**CAF:** fibroblastos associados ao câncer

**CCL2:** chemokine C-C motif ligand 2

**CCR2:** C-C chemokine receptor type 2

**CD:** cluster of differentiation

**CEUA/UFMG:** Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de Carbono

**D.O :** densidade óptica

**DMSO :** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Deoxyribonucleic acid

**e.p.m:** erro padrão da média

**EBSS:** Earle's balanced salt solution

**EDTA:** Ethylenediamine tetraacetic acid - ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELISA:** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

**EMT:** transição epitelial/mesenquimal

**eNOS:** enzima óxido nítrico sintase endotelial

**EPCs:** células progenitoras endoteliais

**FBS:** Fetal bovine serum (fetal bovine calf serum)

**FPV:** fator de permeabilidade vascular

**GM-CSF:** fatores estimulantes de colônias granulócitos-macrófagos



**H.E; H&E:** hematoxilina e eosina

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** ácido sulfúrico

**Hb:** hemoglobina

**HIF-1:** fator induzido por hipóxia - 1

**HRP:** horseradish peroxidase

**HTAB :** Brometo de hexa – 1,6 - bisdeciltrimetilamônio

**i.p.:** intraperitoneal

**IA:** inflamação aguda

**IC:** inflamação crônica

**IFN (s):** interferons

**IFN-  $\gamma$ :** Interferon-gamma

**IgG:** imunoglobulina G

**IgM:** imunoglobulina M

**IL-1:** interleucina 1

**iNOS:** enzima *óxido nítrico sintase induzida*

**L-10:** interleucina 10

**L-6 :** interleucina 6

**M1:** macrófagos classicamente ativados

**M2:** macrófagos alternativamente ativados

**MCP-1:** proteína quimiotática 1 para monócitos

**MDSC:** myeloid-derived supressor cells

**MHC:** major histocompatibility complex

**MPO:** mieloperoxidase

**RNA:** *Ribonucleic acid*

**mRNA:** messenger RNA

**MVD:** densidade microvascular

**N1:** neutrófilo fenótipo anti-tumorigênico

**N2:** neutrófilo com fenótipo pró-tumorigênico

**NAG:** N-acetilglucosaminidase

**NK:** Natural Killer Cell

**nNOs:** óxido nítrico sintase neuronal

**NO:** óxido nítrico

**NOs:** NO sintase

**OD; DO:** densidade óptica

**OPD:** o-fenilenodiamina

**NO:** óxido nítrico

**P.A.:** Padrão Analítico

**PBS:** phosphate buffered saline

**PGE:** prostaglandina E

**pH:** potencial hidrogeniônico

**PIGF:** fator de crescimento placentário

**ROS:** espécies reativas de oxigênio

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**s.c; SC:** subcutâneo

**SCYA2:** small inducible cytokine A2

**siRNA:** small interfering RNA

**TAA:** antígenos associados ao tumor

**TAMs :** macrófagos associados aos tumores

**TAN (s):** neutrófilo(s) associado(s) ao tumor

**TEMED-** Tetramethylethylenediamine

**TGF  $\beta$  1, 2 or 3:** Transforming growth factor beta 1, 2 or 3

***TGF $\beta$  RII:*** receptor do tipo II do *TGF $\beta$*

**TIL:** linfócitos infiltrantes tumorais

**TMD:** 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina

**TNF  $\alpha$ :** Tumor necrosis factor- alpha

**V.T:** volume tumoral

**VEGF-A/B/C/D:** Vascular endothelial growth factor A, B, C or D

**VSMC:** vascular smooth muscle cells

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Representação esquemática do papel das citocinas na carcinogênese.....p.31

**Figura 2:** Modos de formação de vasos.....p.36

**Figura 3.** Cinética de crescimento (A) e massa (B) dos tumores, melanoma, do cólon e mama.....p.61

**Figura 4.** Secções histológicas representativas (HE) da interface melanoma / tecido cutâneo (A), tumor do cólon / tecido cutâneo (B) tumor mamário / tecido cutâneo (C).....p.62

**Figura 5.** Marcadores inflamatórios no melanoma, tumor de cólon e tumor de mama.....p.64

**Figura 6.** Conteúdo de citocinas nos tumores, melanoma, cólon e mama.  
.....p.65

**Figura 7.** Marcadores angiogênicos nos tumores: melanoma, cólon e mama.  
.....p.66

<b>Figura 8.</b> Cortes histológicos representativos dos tumores corados com HE (A,B,C) e realizada a imunohistoquímica para o fator VIII, (A1,B1,C1).....	p.67
<b>Figura 9.</b> Níveis sistêmicos de VEGF e TNF- $\alpha$ em camundongos portadores de tumor.....	p. 68
<b>Figura 10.</b> A estratégia o para definir as populações mielóides e linfóides por citometria de fluxo de células isoladas de implantes de esponja.....	p. 72
<b>Figura 11.</b> A análise de citometria de fluxo de leucócitos isolados a partir de implantes de esponja. ....	p. 74
<b>Figura 12.</b> A análise de citometria de fluxo de sub-populações de monócitos, isolados a partir de esponjas. ....	p.75
<b>Figura 13.</b> Volume (A) e massa (B) do tumor 4T1, sozinho ou inoculado dentro da esponja implantada 24 horas ou 10 dias antes. ....	p.77
<b>Figura 14.</b> Marcadores inflamatórios no tumor 4T1, sozinho ou inoculado dentro da esponja implantada 24 horas ou 10 dias antes. ....	p.78
<b>Figura 15.</b> Conteúdo de citocinas no tumor 4T1, sozinho ou inoculado dentro da esponja implantada 24 horas ou 10 dias antes. ....	p.79

**Figura 16.** Marcadores angiogênicos no tumor 4T1, sozinho ou inoculado dentro da esponja implantada 24 horas ou 10 dias antes. ....p.80

**Figura 17.** Níveis sistêmicos de VEGF e TNF- $\alpha$  no tumor 4T1, sozinho ou inoculado dentro da esponja implantada 24 horas ou 10 dias antes, e no animal não portador de tumor. ....p.82

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Tipos mais comuns de câncer e estimativa de novos casos e mortes  
.....p.38

**Tabela 2.** Diferenças no grau de angiogênese, inflamação e na produção de citocinas entre os tumores .....p.69

**Tabela 3.** Marcadores inflamatórios na esponja livre de tumor 24h e 10 dias pós-implantação.....p.70

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1 O Câncer.....	20
1.2 A inflamação e o desenvolvimento tumoral.....	22
1.3 As citocinas, o óxido nítrico e o desenvolvimento tumoral.....	26
1.4 A angiogênese e o desenvolvimento tumoral.....	32
1.5 Tumores experimentais murinos.....	37
1.5.1 Melanoma B16F10.....	40
1.5.2 Tumor de cólon CT26.WT.....	41
1.5.2 Tumor de mamário 4T1.....	42
1.6 Estratégias experimentais para o estudo da influência da inflamação e angiogênese no desenvolvimento de tumores experimentais.....	42
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>45</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
3.1 Objetivo geral.....	47



3.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	47
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
4.1 <i>Células tumorais, inoculação do tumor experimental e mensuração</i>	49
4.2 <i>Preparação de discos de esponja e implante</i> .....	50
4.3 <i>Digestão enzimática dos implantes de esponja e citometria de fluxo</i>	51
4.4 <i>Implante de esponja e co-implante de células tumorais em esponja</i>	52
4.5 <i>Avaliação do desenvolvimento tumoral</i> .....	53
4.6 <i>Extração de hemoglobina</i> .....	54
4.7 <i>Extração de tecido e determinação das atividades de mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase</i> .....	54
4.8 <i>Dosagens de VEGF-A, TNF-<math>\alpha</math>, CCL2 e TGF-<math>\beta</math></i> .....	55
4.9 <i>Dosagem do óxido nítrico (NO)</i> .....	56
4.10 <i>Análise histológica e coloração</i> .....	57
4.11 <i>Análise Estatística</i> .....	58
<b>5. RESULTADOS</b> .....	59
5.1 <i>Crescimento tumoral e características histológicas</i> .....	59

5.2 Grau diferencial do processo inflamatório no melanoma e tumor de cólon e tumor mamário.....	63
5.3 Grau diferencial de angiogênese no melanoma, tumor de cólon e tumor mamário.....	66
5.4 Níveis sistêmicos de VEGF e TNF- $\alpha$ .....	68
5.5 Avaliação do conteúdo inflamatório e das populações celulares por citometria de fluxo nos implante de 24 horas ou 10 dias.....	69
5.6 Avaliação do papel da inflamação aguda ou crônica no desenvolvimento tumoral.....	75
5.7 Avaliação do processo inflamatório do tumor formado quando as células tumorais foram inoculadas intra-implante.....	77
5.8 Avaliação do grau de angiogênese do tumor formado quando as células tumorais foram inoculadas intra-implante.....	80
5.9 Avaliação dos níveis sistêmicos de VEGF e TNF- $\alpha$ no soro de animais quando células tumorais foram inoculadas intra-implante.....	81
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>

<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>109</b>
9.1 <i>Certificado CEUA.....</i>	110
9.2 <i>Paper 1 :Distinct types of tumors exhibit differential grade of inflammation and angiogenesis in mice.....</i>	111
9.2 <i>Paper 2: Differential contribution of acute and chronic inflammation to the development of murine mammary 4T1 tumor .....</i>	117

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O Câncer

O estudo do câncer é de fundamental importância na atualidade, visto que, mundialmente, é uma das principais causas de morte. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o número estimado de novos casos crescerá de 10 milhões em 2000 para 15 milhões em 2020. No Brasil, em 2006, foram registrados 130 mil óbitos e 470 mil novos casos. O aumento das taxas de mortalidade relacionadas ao câncer ocorreu devido à industrialização, que gerou mudanças e uma maior uniformidade das condições de vida, trabalho, nutrição e consumo. Desta forma, houve uma mudança no perfil de mortalidade, com diminuição destas taxas para doenças infecciosas e aumento para doenças crônicas degenerativas como o câncer, doença de Alzheimer e doenças cardiovasculares em função do aumento da expectativa de vida (Waters, 2001). As altas taxas de morbidade/mortalidade se devem especialmente a tumores com alta capacidade de metastatização e à falta de terapias que sejam efetivas nos estágios avançados da doença. Além disto, o diagnóstico nas fases iniciais da doença é difícil, visto que, o padrão ouro para o diagnóstico definitivo continua sendo, em muitos casos, a biópsia com análise histológica, que é uma técnica invasiva e executada em fases tardias (Goodson e Grossman, 2009). Microscopicamente, as células tumorais apresentam algumas características que as distinguem das normais como: alta proporção do núcleo em relação ao citoplasma, nucléolo proeminente, mitocôndria com menor funcionalidade, alterações no citoesqueleto e poucas estruturas especializadas (Alonso et al.,

2004). As células modificadas se multiplicam e formam uma massa tumoral que é constituída não só por células transformadas, mas também por outras do hospedeiro como as células endoteliais, musculares lisas, fibroblastos e as células do sistema imune, que interagem entre si. Estas populações celulares produzem uma variedade de citocinas, mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) que suportam o crescimento das células cancerosas em um microambiente que favorece o desenvolvimento tumoral (Hussain et al., 2003). Essa formação denominada de microambiente tumoral é determinante para o processo de progressão do tumor, que em contraste com o microambiente de órgãos e tecidos normais, nos quais estruturas e funções são estáveis e rigorosamente controladas por alças de retroalimentação, é caracterizado pela perda progressiva de funções especializadas e diferenciadas das células (Hanahan e Weinberg, 2000; Tarin, 2012). O microambiente do tumor foi recentemente reconhecido como o produto de uma comunicação entre diferentes tipos de células. Por exemplo, em tumores epiteliais estas células incluem o carcinoma invasivo e os seus elementos de estroma. Elementos estromais críticos incluem fibroblastos associados ao câncer, que fornecem uma rede de comunicação essencial através da secreção de fatores de crescimento e quimiocinas, induzindo uma matriz extracelular alterada proporcionando assim sinais oncogênicos adicionais que levarão ao aumento da proliferação das células tumorais e invasão (Mbeunkui e Johann, 2009).

Para o tumor progredir e se desenvolver como uma entidade de ameaça à vida, ele deve desenvolver quatro habilidades críticas. Primeiro, a habilidade de migrar, segundo, a capacidade de degradar (a matriz extracelular), terceiro, a

aptidão para sobreviver (no sangue) e quarto, competência de se estabelecer em um ambiente tecidual novo. Evidências científicas recentes indicam que as células cancerígenas, usando fatores de transcrição ativados, adquirem habilidades pleiotrópicas. O microambiente das células cancerosas fornece a sinalização necessária que transforma os fatores de transcrição. Assim, o estroma ou células não malignas induzem programas de transcrição que permitem fenótipos mesenquimais necessários para invasão de tecidos (Mbeunkui e Johann, 2009). Quando chegam ao seu destino, as células cancerosas devem, então, desligar os fatores transcrição mesenquimais e deve ocorrer a re-conversão para fatores de transcrição epiteliais, recriando-se, um foco tumoral. Considera-se que o papel do microambiente seja essencial em todos estes eventos (Mbeunkui e Johann, 2009).

### ***1.2 A inflamação e o desenvolvimento tumoral***

A relação funcional entre inflamação e câncer não é recente. Em 1863, Virchow hipotetizou que o câncer teria origem em locais de inflamação crônica (Balkwill e Mantovani, 2012). Em parte, esta hipótese foi baseada no fato de que algumas classes de substâncias juntamente com a lesão tecidual e consequente inflamação, aumentam a proliferação celular, embora seja claro que somente a proliferação celular não induza o câncer. De fato, a proliferação de células em um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativado e agentes promotores de danos do DNA, certamente potencializam e/ou promovem risco de transformação neoplásica (Coussens e Werb, 2002). A principal associação entre inflamação crônica e

doenças malignas é vista na carcinogênese do cólon que ocorre em indivíduos com doenças inflamatórias do intestino, por exemplo, colite ulcerosa crônica e doença de Crohn. Além disso, infecção por hepatite C no fígado predispõe ao carcinoma hepático e um aumento do risco de carcinoma da bexiga e do cólon esta associado à esquistossomose, enquanto a infecção crônica por *Helicobacter pylori* é a principal causa mundial de câncer de estômago (Coussens e Werb, 2002).

Durante a transformação maligna, células residentes no tecido produzem fatores pró-inflamatórios que previnem a malignidade. Além disso, as próprias células tumorais produzem várias citocinas e quimiocinas que recrutam leucócitos. Assim, o componente inflamatório de uma neoplasia pode incluir uma população de leucócitos diversificada como neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos mastócitos, e linfócitos - todos os quais são capazes de produzir um conjunto variado de citocinas, mediadores citotóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, serino e cisteíno proteases, metaloproteinases e agentes e mediadores solúveis indutores de morte celular, tais como TNF- $\alpha$ , interleucinas e interferons (IFNs). Os monócitos, na presença de fatores estimulantes de colônias granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e interleucina (IL)-4, se diferenciam em células dendríticas imaturas. As células dendríticas migram para o tecido inflamado, onde elas capturam os antígenos e, após a maturação, migram para os linfonodos para estimular a ativação de linfócitos T. As células dendríticas encontradas em neoplasias são frequentemente imaturas e deficientes na capacidade de estimular as células T. Embora os neutrófilos sejam tradicionalmente considerados no contexto das suas funções anti-bacterianas,

desempenhando um papel estabelecido na defesa do hospedeiro e na morte microrganismos invasores, vem se tornando cada vez mais claro que os neutrófilos associados ao tumor (TANs), desempenham um papel importante na biologia do tumor (Galdiero et al., 2013). Os neutrófilos são uma porção significativa do infiltrado inflamatório em muitos modelos de câncer. Como todos os outros leucócitos, eles se movem nos tecidos sob a influência de quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão específicas. Descobriu-se que os TANs são uma população distinta de neutrófilos, diferindo acentuadamente em seu perfil transcriptômico dos neutrófilos *naive* da fração de células supressoras derivadas da medula (*myeloid-derived suppressor cells*- MDSC). Estudos têm demonstrado exemplos específicos de sinalizadores tumorais (como por exemplo, o TGF- $\beta$ ) que induzem a formação de um neutrófilo com fenótipo pró-tumorigênico (N2) capaz de estimular o crescimento do tumor e suprimir a resposta imune antitumoral. No entanto, também existem estudos mostrando que os TANs podem ter um fenótipo anti-tumorigênico (N1). Nessa linha, Lozupone e colaboradores (2000) demonstraram que a administração *in vivo* de anticorpos específicos contra granulócitos em camundongos portadores de tumores aumentava o crescimento tumoral, indicando a ação direta dessas células inflamatórias na contenção das células tumorais. Assim, a influência da inflamação na carcinogênese e no desenvolvimento de tumores é controversa. A relação entre eles parece depender do tecido afetado e da causa, da natureza do estímulo e/ou da intensidade da reação inflamatória. Essa relação pode depender também do estágio do desenvolvimento do tumor. Além disso, vários estudos têm mostrado o papel de neutrófilos na conversão tumorigênica. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas pelas células



inflamatórias podem causar danos oxidativos e nitrativos ao DNA e em proteínas, contribuindo assim para a iniciação e/ou promoção de câncer (Ishikawa et al., 1987; Rymaszewski et al., 2014; Tazawa et al., 2003; Weitzman et al., 1985).

Durante a progressão tumoral, monócitos circulantes e macrófagos são ativamente recrutados para os tumores, onde, alteram o microambiente tumoral e aceleram sua progressão. Com base em suas funções, macrófagos são divididos em duas categorias principais: macrófagos M1 clássicos e macrófagos M2 alternativos. O macrófago M1 está envolvido na resposta inflamatória, limpeza de patógenos e imunidade anti-tumoral. Por outro lado, macrófago M2 influencia a resposta anti-inflamatória, o reparo tecidual e a tumorigênese. Os macrófagos associados aos tumores (TAMs) são um importante componente inflamatório que infiltra os tecidos neoplásicos e são derivados de monócitos que são recrutados em grande parte pela proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) hoje chamada de CCL2. Durante o desenvolvimento tumoral, macrófagos M1 promovem respostas imunes prevenindo o desenvolvimento/instalação do tumor. Em fases mais tardias da progressão tumoral os TAMs adquirem o fenótipo M2 que apresentam baixa atividade tumoricida. Os TAMs produzem um grande número de potentes fatores pró-angiogênicos e linfangiogênicos, citocinas e proteases, os quais são mediadores que potencializam a progressão neoplásica (Chanmee et al., 2014).

### **1.3 As citocinas, o óxido nítrico e o desenvolvimento tumoral**

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular que participam da comunicação entre as células. No ambiente tumoral elas são sintetizadas tanto por células do sistema imune quanto por células tumorais e do estroma (células endoteliais, fibroblastos). Estas moléculas regulam a proliferação, sobrevivência, diferenciação, ativação, migração e morte celular (Figura 1). As citocinas podem também modular a resposta anti-tumoral, mas em processos inflamatórios crônicos, elas podem também induzir a transformação maligna de vários tipos celulares, dependendo de fatores como concentração, intensidade da expressão de receptores e estado de ativação de células adjacentes (Zamarron e Chen, 2011). Muitas evidências também apontam para o papel determinante de citocinas/quimiocinas na progressão tumoral por seus efeitos na promoção de angiogênese, recrutamento de leucócitos, metástase, subversão da imunidade, etc. O TNF- $\alpha$  está entre as citocinas mais estudadas no microambiente tumoral, pois é encontrado em muitos tipos de tumores humanos produzidos tanto por células tumorais como por células do estroma. Níveis elevados desta citocina estão presentes em pacientes com câncer avançado (Balkwill, 2009). Estudos com o TNF- $\alpha$  demonstraram seu efeito promovendo invasão de células tumorais e interação com outras citocinas induzindo transição de células epiteliais para mesenquimais. Existem também, evidências em modelos animais de que esta citocina aumentaria o crescimento e a invasão de tumores cutâneos, de ovário, de pâncreas, da cavidade pleural e bexiga (Balkwill e Mantovani, 2012). O TNF- $\alpha$  é também um fator pró-angiogênico, provavelmente por sua ação na diferenciação de células

progenitoras mielóides em células endoteliais no tumor (Li et al., 2009). A maioria das ações pro-tumorais do TNF- $\alpha$  parecem ser mediadas pelo receptor 1 encontrado em células do estroma e tumorais (Al-Lamki et al., 2010).

O fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é uma potente citocina pleiotrópica, com propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras. Sob condições fisiológicas, TGF- $\beta$  tem um papel bem documentado na embriogênese, proliferação celular, diferenciação, apoptose, adesão, e invasão. Três isoformas foram identificadas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, e TGF- $\beta$ 3. O papel de TGF- $\beta$  no câncer é complexo e paradoxal, variando de acordo com tipo de célula e fase de desenvolvimento das neoplasias. Nas fases iniciais, o TGF- $\beta$  atua como um supressor de tumor, inibindo a progressão do ciclo celular e promovendo a apoptose. Posteriormente, o TGF- $\beta$  promove invasão e metástase. Usando um modelo de camundongos *knock-out* TGF- $\beta$  RII, Guasch et al., 2007 descreveram que epitélios altamente proliferativos (por exemplo retal e genital) desenvolveram espontaneamente carcinomas de células escamosas. Além disso, foi observado uma progressão neoplásica acelerada, e redução da apoptose sugerindo que uma via de TGF- $\beta$  deficiente contribui para tumorigênese ( Landskron, 2014).

Existem outras evidências consistentes demonstrando que mudanças na sinalização do TGF- $\beta$  estão envolvidas no câncer humano. Aumento no mRNA do TGF- $\beta$ 1 e na proteína foram observados em carcinomas gástricos, câncer de pulmão e câncer do colo retal e de próstata, e a deleção do receptor de TGF- $\beta$  ou mutações têm sido associados com câncer colo-retal, de próstata, de mama e de bexiga, sendo correlacionado com cânceres mais invasivos e mais avançados e pior prognóstico. No microambiente tumoral, fontes comuns de

TGF- $\beta$  são: células tumorais e do estroma, o que inclui células do sistema imunológico e fibroblastos. A matriz óssea é também uma fonte abundante de TGF- $\beta$  e um sítio comum de metástases em diversos cânceres, correlacionando a promoção tumoral e invasão com os efeitos dessa citocina (Landskron, 2014).

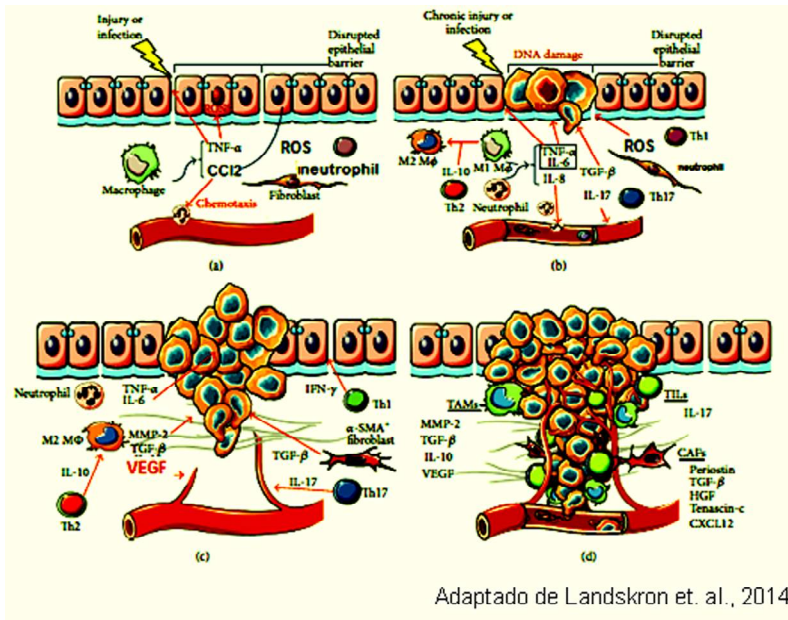
Além destas citocinas, uma família de citocinas quimiotáticas, denominadas quimiocinas, possuem um grau relativamente elevado de especificidade para quimiotaxia de leucócitos, ou seja, as quimiocinas são fatores solúveis que regulam a migração direcional dos leucócitos. Recentemente, foi demonstrado que algumas regiões de tumores epiteliais expressam mais do que outras regiões do tumor, altos níveis do ligante 2 da quimiocina de padrão C-C (chemokine C-C motif ligand 2: CCL2), e que os níveis de CCL2 podem ser correlacionados com o recrutamento de monócitos/macrófagos nos tecidos tumorais.

A CCL2, também conhecida como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) ou ainda pequena citocina induzível A2 (SCYA2), é uma pequena citocina altamente potente na quimiotaxia de monócitos/macrófagos para os locais de injúria tecidual, inflamação e sítio tumoral. Tem sido demonstrado que vários tumores expressam CCL2 *in vivo*, incluindo glioma, melanoma, carcinoma de ovário e carcinoma de células escamosas do colo uterino. Tornou-se claro que CCL2 é o principal determinante do recrutamento de monócitos/macrófagos para os tumores. A expressão de CCL2 por tumores foi positivamente associada com o acúmulo TAMs em tumores de mama, de ovário, de células escamosas, e de células de câncer do pulmão e também em glioblastoma. Em adição a esta evidência clínica, vários estudos utilizando

modelos animais também suportam essa perspectiva, demonstrando a correlação entre níveis CCL2 e acúmulo de TAMs dentro dos tumores. Quando uma linhagem celular de melanoma murino foi transduzida com o gene CCL2 e subsequentemente inoculadas *in vivo*, o melanoma produtor de CCL2 exibiu aumento acentuado na infiltração de macrófagos. Além disso, usando diversas linhagens celulares de melanomas que expressam diferentes níveis de CCL2, foi observada uma correlação positiva entre os níveis de expressão da CCL2 e o recrutamento de monócitos/macrófagos. Além disso, o bloqueio da interação CCR2/CCL2 usando um anticorpo CCL2, CCR2 ou siRNA específico reduziu acentuadamente o recrutamento de monócitos/macrófagos e diminuiu a progressão tumoral e metástases (Lee et al., 2013). A CCL2 é altamente expressa por certos tumores primários e minimamente expressa por tecidos normais. Ela é produzida por células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais, células do músculo liso, astrócitos, macrófagos, micróglia e certas células tumorais. Apesar de existir várias fontes celulares de CCL2, ela não está distribuída uniformemente no tumor. Investigações recentes indicam que a expressão do gene CCL2 é regulada negativamente em regiões hipóxicas e o VEGF-A, que é induzido em regiões hipóxicas nos tumores, também regula negativamente expressão da CCL2 no tumor. Embora a maioria das quimiocinas possam se ligar a vários receptores diferentes com afinidades semelhantes, o único receptor de CCL2 é CCR2. Isto sugere que a distribuição de CCL2 na área do tumor pode ser um determinante crítico do recrutamento de monócitos, porque o CCR2 é expresso em monócitos classicamente ativados na região epitelial de tumores, desempenhando assim, um papel

crucial no recrutamento destas células e no desenvolvimento tumoral (Lee et al., 2013).

Além das citocinas mencionadas acima dentre outras, vários mediadores e moléculas inflamatórias participam da progressão tumoral. Dentre eles, o NO (molécula gasosa) que é reconhecido como um mediador químico envolvido em vasodilatação, neurotransmissão, anti-agregação plaquetária, bem como na regulação de respostas inflamatórias. Ele tem propriedades citotóxicas que podem agir contra agentes patogênicos, mas também pode ter efeitos nocivos sobre os tecidos do hospedeiro (Moncada e Higgs, 2006). Em tecidos tumorais, o NO é produzido e liberado por três diferentes isoformas de NO sintase (NOS): nNOs (neuronal) e eNOS (endotelial), expressas constitutivamente, e a iNOS (induzida) que é induzida por citocinas como o TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , HIF-1 (fator de hipóxia induzido). A expressão da iNOs foi primeiramente demonstrada por Buttery et al. (1993) em melanoma e tumor de cólon murino. O NO é associado a vários processos tumorais como: apoptose, ciclo celular, metástase, angiogênese (Yasuda, 2009). A figura 1 representa esquematicamente o papel das citocinas na progressão tumoral.



**Figura 1:** Representação esquemática do papel das citocinas na carcinogênese. **(a)** Durante a lesão do tecido ou infecção, de uma resposta imunitária ativa a expressão de mediadores pró-inflamatórios, tais como as espécies reativas a oxigênio (ROS) e TNF- $\alpha$ , por neutrófilos e a produção de CCL2 por células residentes e macrófagos. A CCL2 irá atrair monócitos e ROS e TNF- $\alpha$  podem perturbar a barreira epitelial, e induzir e promover a infiltração de outras células inflamatórias. **(b)** Na inflamação crônica ROS e outros mediadores podem induzir danos no DNA, o que leva a iniciação do tumor. TGF- $\beta$  pode promover a transformação maligna por meio da ativação da transição epitelial/mesenquimal (EMT). **(c)** O crescimento do tumor e invasão são também favorecidos por citocinas pró-inflamatórias que estimulam a proliferação das células, reduzem a apoptose, e aumentar a transição epitelial/mesenquimal (EMT) e angiogênese; esta última é facilitada pelo VEGF. Citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e TGF- $\beta$ , contribuem para a evasão imune do tumor. **(d)** macrófagos associados ao tumor (TAM), linfócitos infiltrantes tumoral (TIL) e fibroblastos associados ao câncer (CAF) secretam

vários fatores que contribuem para o crescimento de tumores e metástases, enquanto se mantém o meio imunossupressor.

#### **1.4 A angiogênese e o desenvolvimento tumoral**

Folkman (1971) elaborou a teoria da angiogênese tumoral, que preconizou a importância da angiogênese para o desenvolvimento tumoral e forneceu as bases por quase quatro décadas de sua futura pesquisa e de um campo de descoberta que praticamente não existia na época (Zetter, 2008). A hipótese por ele delineada teve diversas premissas. A principal contribuição de Folkman foi, não apenas descrever que os tumores poderiam formar vasos sanguíneos – evento observado anteriormente – o *insight* importante neste trabalho foi que: "tumores sólidos são muito mais dependentes de novos brotos capilares do que tínhamos previamente acreditado". Ou seja, a noção de que o crescimento tumoral na verdade, dependia do recrutamento desses vasos (Folkman, 1995). Essa percepção também foi a fonte das implicações terapêuticas da sua teoria (Folkman, 2006; Albini et al., 2012). Folkman (1971) também observou que as células tumorais e as células endoteliais dos novos vasos sanguíneos constituíam um "ecossistema altamente integrado no qual o índice mitótico de duas populações celulares dependeria um do outro". Em termos contemporâneos, esta percepção anteciparia o papel do microambiente tumoral na regulação do crescimento de células tumorais. Um importante aspecto da teoria da angiogênese tumoral foi que as células tumorais deveriam ser capazes de liberar fatores solúveis estimulantes da proliferação de células endoteliais (Zetter, 2008).

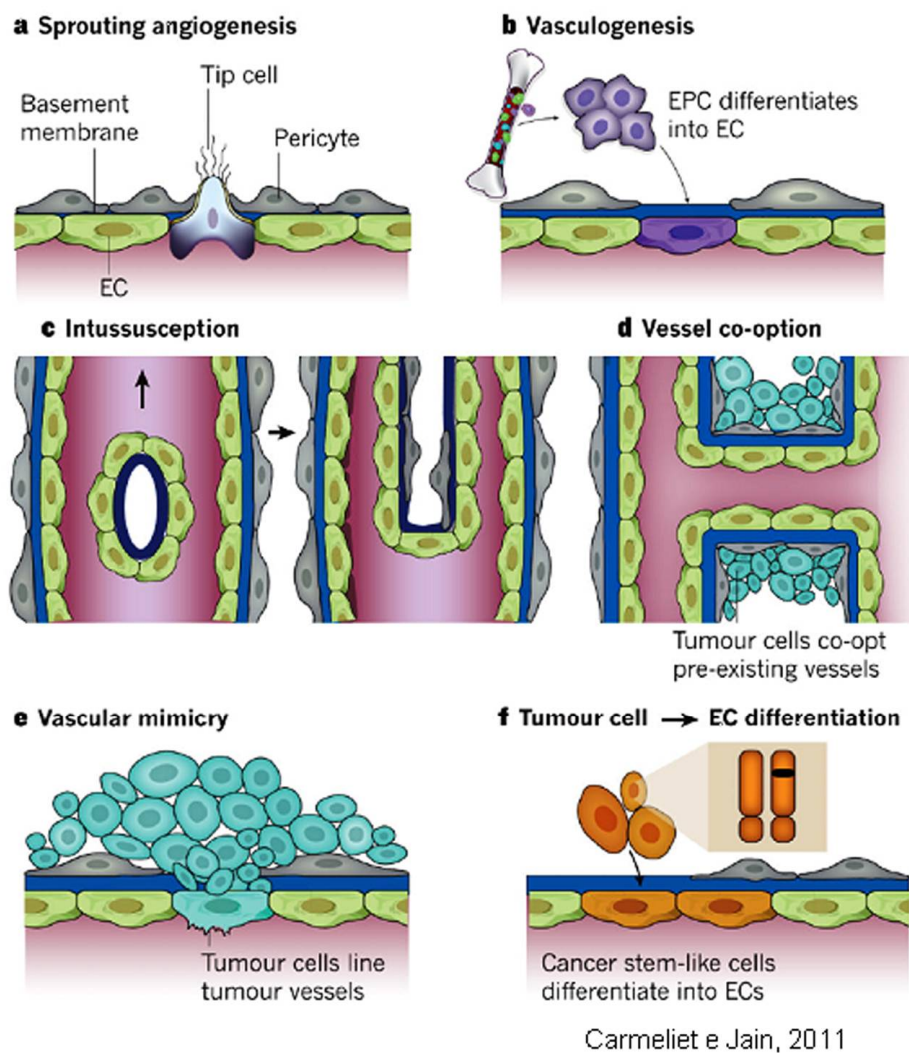


Inicialmente, todos os vasos sanguíneos são formados a partir de células progenitoras endoteliais processo chamado de vasculogênese que ocorre na vida embrionária, a angiogênese é o processo pelo qual novos vasos sanguíneos são formados, a partir de um leito vascular existente (Carmeliet e Jain, 2011). A angiogênese fisiológica é crucial para o desenvolvimento embrionário, diferenciação e crescimento em indivíduos jovens, reparo de feridas, e funções de reprodução (crescimento de folículos e endométrio, desenvolvimento de corpo lúteo). Por outro lado, a angiogênese patológica, particularmente a tumoral e outras patologias angiogênese-dependente é responsável pela manutenção e progressão das lesões constituindo um alvo terapêutico promissor (Folkman, 1971). A angiogênese patológica envolve um número de etapas consecutivas complexas, que levam à formação de novos vasos que fornecem sangue e nutrientes para o microambiente das lesões. Portanto, é um processo essencial para o crescimento do tumor em si.

Existem vários componentes que regulam a angiogênese, no entanto, acredita-se que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tenha um papel central na neoformação vascular. A família VEGF consiste de pelo menos cinco membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PlGF), mas o papel do VEGF-A (uma glicoproteína dimérica) na angiogênese tumoral, foi e tem sido investigado em maior proporção. O VEGF-A, originalmente chamado de FPV (fator de permeabilidade vascular), tem sido reconhecido como o principal fator de crescimento que é relativamente específico para células endoteliais sendo essencial para muitos processos angiogênicos em estados normais e patológicos como um exemplo, a vascularização do tumor (Weis e Cheresh, 2011).

Vários modos de formação de vasos já foram identificados, conforme representado esquematicamente na figura 2. No desenvolvimento de embrião de mamífero, angioblastos se diferenciam em células endoteliais, que irão formar o labirinto vascular desse novo mamífero - um processo conhecido como **vasculogênese**. Distintos sinais arteriais ou venosos irão garantir o surgimento e posterior expansão vascular, processo conhecido como **angiogênese**. A **arteriogênese** ocorre, quando canais de células endoteliais tornam-se coberto por pericitos ou células de músculo liso vascular (VSMC), que irão proporcionar a estabilidade e o controle da perfusão. Os tecidos também podem tornar-se vascularizados por outros mecanismos, mas a relevância desses processos não é bem compreendida. Por exemplo, vasos pré-existente podem dividir-se por um processo conhecido como **intussuscepção**, dando origem a um vaso filho. Em outros casos, o ocorre a **cooptação vascular**, em que as células tumorais sequestram vasos pré-existentes, além disso, as células tumorais podem se alinhar formando tubos, um fenômeno conhecido como **mimetismo vascular**. Também é descrito que células-tronco tumorais poderiam se diferenciar em células endoteliais processo chamado de **diferenciação**. Embora muito debatido, o reparo em adultos ou a expansão patológica de vasos poderia ocorrer pelo recrutamento de células derivadas da medula óssea (BMDCs) e/ou células progenitoras endoteliais da parede vascular, as células progenitoras se incorporariam a linha endotelial em um processo conhecido como **vasculogênese pós-natal**. Tecidos normais são revascularizados por meio de angiogênese e vasculogênese, enquanto tumores podem usar todos os modos de formação de vasos para o suprimento sanguíneo (Carmeliet e Jain, 2011).

Como mencionado anteriormente, durante o desenvolvimento embrionário, os vasos sanguíneos se formam inicialmente por meio de vasculogênese, que envolve a produção de novas células endoteliais, a partir de angioblastos, que são recrutadas para diferenciar em resposta a sinais locais. A vasculogênese é normalmente seguida pelo **modo clássico de angiogênese, o brotamento**. Uma variedade de sinais angiogênicos induzem as células endoteliais a adotar um fenótipo ativado: células endoteliais se separam das suas aderências juncionais que as unem às células adjacentes, e “brotam” em direção a gradientes de fatores pró-angiogênicos, formando tubos provisórios, que posteriormente são envolvidos por células perivasculares recrutadas (pericitos) que asseguram estabilidade e maturação ao neo-vaso. Finalmente, ocorre o remodelamento formando uma rede funcional. Embora o recrutamento de vasos associados ao tumor tenha sido tradicionalmente definido como o surgimento a partir de vasos pré-existentes (angiogênese), torna-se claro que os vasos sanguíneos que dão suporte ao crescimento ou recidiva de tumores pode também se originar de células recrutadas a partir da medula óssea (vasculogênese pós-natal), ou podem mesmo se diferenciar a partir de células-tronco tumorais (diferenciação) (Weis e Cheresh, 2011) e ainda as células tumorais podem se alinhar formando tubos (**mimetismo vascular**) (Carmeliet e Jain, 2011).



**Figura 2:** Modos de formação de vasos. **(a)** Brotamento- células endoteliais “brotam” em direção a gradientes de fatores pró-angiogênicos; **(b)** Vasculogênese – recrutamento de células progenitoras endoteliais da medula ou da parede vascular irão se diferenciar-se em células endoteliais; **(c)** intussuscepção- um processo de divisão vascular; **(d)** Cooptação- células tumorais podem cooptar vasos pré-existentes; **(e)** mimetismo vascular – além de serem revestidos pelas células endoteliais os vasos tumorais podem ser revestida por células tumorais; **(f)** diferenciação – células endoteliais com

anomalias citogenéticas em seus cromossomos, derivadas supostamente de células-tronco tumorais. Tecidos normais podem se valer do brotamento, vasculogênese e intussuscepção **(a-c)**, já os tumores podem usar todos os seis modos de formação de vasos **(a-f)**.

### **1.5 Tumores experimentais murinos**

Inúmeros esforços têm sido empregados nas últimas décadas para a compreensão do processo de tumorigênese. A maior parte do conhecimento a respeito de carcinogênese provém da análise *in vitro* de tecidos tumorais em estágios avançados de desenvolvimento, removidos de pacientes. Essa prática elucidou muitas questões referentes às células tumorais, mas pouco contribuiu na obtenção de informações sobre os fatores que influenciam os estágios iniciais do seu desenvolvimento *in vivo*. Vários modelos animais foram desenvolvidos nas últimas décadas, visando elucidar diversas questões referentes ao câncer *in vivo*. A utilização de camundongos como instrumentos de estudos biológicos ocorrem de modo intenso, principalmente nas áreas de imunologia, oncologia e genética. Essa prática ocorre por diversas razões, dentre elas, o fato das linhagens de camundongos serem altamente padronizadas, possuírem características conhecidas e monitoradas após várias gerações. Além disso, estes animais compartilham similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos, permitindo que múltiplas características da doença sejam estudadas nestes modelos. Existem critérios fundamentais para que um modelo tumoral murino possa ser utilizado no esclarecimento da tumorigênese: origem e progressão clonal do tumor; evidências da progressão

tumoral; patologia e histologia tumoral semelhante à doença em humanos; possibilidade de estudar aspectos de invasão tecidual e o papel da resposta imune contra tumores; padrões de expressão gênica e a possibilidade de estudo de terapias antitumorais (Frese e Tuveson, 2007; Das Thakur et al., 2014).

Os tipos de câncer utilizados para este estudo aparecem dentre os 5 tipos mais comuns em humanos, de acordo com as estatísticas de incidência e mortalidade por câncer reportados pela Sociedade Americana de Câncer e outras Instituições Americanas. Neste levantamento os tipos de câncer mais comuns (cânceres que são diagnosticados com maior frequência nos Estados Unidos), excluindo os cânceres de pele não melanoma (que são os mais frequentes) são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Tipos mais comuns de câncer e estimativa de novos casos e mortes.

Tipo de câncer de	Estimativa de novos casos	Mortes estimadas
<b>Mama (Feminino - Masculino)</b>	232.670	40000
<b>Próstata</b>	233000	29480
<b>Pulmonares (incluindo brônquios)</b>	224210	159260

<b>Cólon e Reto (combinado)</b>	136830	50310
<b>Melanoma</b>	76.100	9710
<b>Bexiga</b>	74.690	15580
<b>Endometrial</b>	52.630	8590
<b>Rim (células renais e pelve renal)</b>	63.920	13860
<b>Leucemia (todos os tipos)</b>	52.380	24090
<b>Linfoma não-Hodgkin</b>	70.800	18990
<b>Pâncreas</b>	4.6420	39590
<b>Tireóide</b>	62.980	1890

American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2014 Atlanta, GA:

American Cancer Society, 2014

Para se qualificar para a lista, a incidência anual estimada para 2014 teve que ser 40.000 casos ou mais. O tipo mais comum de câncer na lista americana é o câncer de mama, com cerca de 235 mil novos casos esperados nos Estados Unidos em 2014 seguido pelo câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de

cólon e reto e melanoma respectivamente. Como muitas vezes câncer de cólon e reto são referidos como "câncer colorretal", estes dois tipos de câncer são combinados para a lista. Para 2014, o número estimado de novos casos de câncer de cólon e câncer retal são 96.830 e 40.000, respectivamente, somando-se um total de 136.830 novos casos de câncer colorretal.

### *1.5.1 Melanoma B16F10*

Esta linhagem surgiu a partir da observação de que a mera presença de células tumorais no o sangue não constitui uma metástase já que a maioria células tumorais circulantes morrem rapidamente, apenas 0,1% sobrevivem para formar tumores secundários. Em 1975, Fidler se propôs responder as seguintes questões: O que afeta a invasão, embolia, distribuição, e a sobrevivência de células de tumor? é o processo metastático essencialmente dependente de defesa do hospedeiro? É também dependente de qualidades únicas para malignidade de células tumorais? O que fazem as células tumorais para invadirem, circularem, e sobreviverem ao acaso para produzir metástases, ou como as poucas células sobreviventes conseguem sucesso? Foi decidido a criação de uma linhagem celular de alto potencial metastático, que foram selecionadas de células tumorais de melanoma da linhagem B16 conforme a sua capacidade para formar com sucesso colônias pulmonares de tumor em seu hospedeiro singênico, a linhagem de camundongo C57BL/6. Camundongos C57BL/6 receberam injeções intravenosas de 50.000 células de melanoma B16 viáveis. Três semanas mais tarde, seus nódulos pulmonares de melanoma (colônias) foram removidos assepticamente e cultivados in vitro.



Quando as culturas tornaram-se células confluentes foram colhidas e injetadas em novos camundongos C57BL / 6, e o processo foi repetido 10 vezes. Foram então nomeadas B16 F1 para a 1ª linhagem após a passagem pelo pulmão e, em seguida, numeradas consecutivamente, isto é, a linhagem F2, F3, e assim por diante, até a B16F10 após a décima passagem pelo pulmão (Filder, 1975). As células da linhagem F10 foram as mais agressivas promovendo metástase pulmonar em 100% dos animais inoculados.

### *1.5.2 Tumor de cólon CT26.WT*

A partir da clonagem, por vários grupos independentes, de antígenos associados ao tumor (TAA) reconhecido por células T CD8 + (TCD8 +) novas possibilidades foram propostas para o tratamento do câncer baseado em imunoterapia do câncer (Wang et al., 1995). Este então recém-descoberto TAA potencialmente poderia ser utilizado no desenvolvimento de vacinas recombinantes sintéticas anti-cancer. Então, desenvolveu-se um experimento que consistia em um clone letal da linhagem do tumor de camundongos BALB/c chamado de CT26, chamado de CT26.WT, que foi retroviralmente transduzida com o gene de codificação de lacZ β-galactosidase, para criar CT26.CL25. A taxa de crescimento e a letalidade do CT26.CL25 e CT26.WT eram virtualmente idênticos, apesar da expressão de lacZ β-galactosidase por CT26.CL25. (Wang et al., 1995).

Para estabelecer um modelo de tumor murino com um Ag definido, o carcinoma do cólon indiferenciado, CT26, de camundongos BALB / c que é gerado por um carcinógeno químico o N-nitroso-N-metiluretano (Wang et al.,

1995) foi clonado para gerar a linha celular CT26.WT, a clonagem foi feita para minimizar sua heterogenicidade e foi, em seguida, retroviralmente transduzidas com o gene de lacZ e subclonado para gerar CT26.CL25 (Wang et al., 1995).

### *1.5.2 Tumor mamário 4T1*

Aslakson e Miller (1992) desenvolveram a linhagem 4T1, uma variante tioguanina resistente que foi selecionada a partir de 410.4 sem qualquer tratamento mutagênico. A linhagem 4T1 metastatiza espontaneamente para ambos o pulmão e fígado, como evidenciado pela formação de nódulos visíveis nesses órgãos. Subpopulações de linhagens tumorais 66, 67, 168 e 410.4 foram isolados a partir de um único tumor mamário que surgiu espontaneamente em um camundongo BALB/cfC3H (Aslakson e Miller, 1992).

## ***1.6 Estratégias experimentais para o estudo da influência da inflamação e angiogênese no desenvolvimento de tumores.***

A resposta do hospedeiro às lesões mecânicas e à injeção de células normais ou malignas, têm possibilitado identificar vários componentes do tecido que se forma dentro e/ou ao redor da lesão. A técnica de implantação de matrizes sintéticas é um procedimento antigo utilizado para a investigação da inflamação e tumorigênese e mais recentemente para o estudo da angiogênese. Grindlay e Waugh (1951), Woessner e Boucek (1951), Edwards et al. (1960) foram os primeiros a utilizar implantes de polivinil em cães, ratos e coelhos para investigar o crescimento do tecido conjuntivo vascularizado bem como a

atividade enzimática no tecido recém-formado. Esta técnica foi posteriormente utilizada para estudar a inflamação aguda e crônica, a cicatrização de ferida interna e a reação tipo corpo estranho em ratos e camundongos. Vários fatores como desnutrição, doenças inflamatórias sistêmicas, diabetes, tumores e outros já mostraram afetar o processo de reparo neste e em outros modelos (Andrade et al., 1997; Belo et al., 2005; Bradshaw et al., 2001; Campos et al., 2006; Ferreira et al., 2004; Teixeira et al., 1999). Além disso, o modelo permite o estudo temporal do infiltrado inflamatório, a análise bioquímica dos fluidos coletados, os efeitos de drogas sobre o processo, além de estudos histológicos (Andrade et al., 1997; Bailey, 1988; Barcelos et al., 2005). Utilizando-se esta abordagem metodológica tem sido possível caracterizar vários componentes envolvidos na neoformação vascular bem como sua associação com eventos inflamatórios (recrutamento e ativação de leucócitos). A avaliação do desenvolvimento de estruturas vasculares na esponja pode ser feita a partir da estimativa do desenvolvimento do fluxo sanguíneo utilizando-se marcador radioativo (Andrade et al., 1992) ou fluorescente (Andrade et al., 1993) ou a partir da dosagem do conteúdo de hemoglobina (índice indireto de vascularização) (Plunkett e Hailey, 1990; Teixeira et al., 1999). A análise histológica associada a estudos imunohistoquímicos e morfométricos apresenta-se, também, como aliada importante para a avaliação da angiogênese. Além disso, pode-se determinar a funcionalidade das estruturas vasculares neoformadas por meio de parâmetros que avaliam a reatividade dos vasos (Andrade et al., 1992).

A co-implantação de matrizes sintéticas e células tumorais tem também sido utilizada para avaliar a associação entre inflamação e tumorigênese. Por

exemplo, a persistência de corpos estranhos (pedaços de vidro e plástico) induziu o desenvolvimento de sarcoma em camundongos (Brand et al., 1977; Brand et al., 1975; Tazawa et al., 2003; Tazawa et al., 2007). Em 1992, Andrade e colaboradores estabeleceram um modelo in vivo no qual o desenvolvimento de tumores derivados do adenocarcinoma de cólon 26 e melanoma B16 pôde ser monitorado após a injeção intraimplante (poliéter-poliuretano) dessas células tumorais. Nesse estudo, foi mostrado que a angiogênese (determinada pelo fluxo sanguíneo local) e a inflamação (determinada pela expressão da sintase induzida do óxido nítrico) estavam mais exacerbadas em implantes portadores de tumores quando comparadas aos implantes controles (não portadores de tumores) (Buttery et al., 1993). Esta estratégia experimental foi então, explorada para estudar a contribuição da inflamação induzida pelo implante de esponja para o desenvolvimento do tumor de Ehrlich. Nesse estudo, o crescimento das células do tumor alojadas nos implantes foi retardado quando os animais foram tratados com dexametasona (Lage e Andrade, 2000). Em outra série de publicações, a contribuição da inflamação para o desenvolvimento tumoral foi mostrada usando abordagem similar. Em um desses estudos, o clone (QR32) derivado de um fibrosarcoma tornou-se tumorigênico e metastático quando co-implantado com esponja de gelatina subcutaneamente em camundongos. Além disso, a progressão tumoral induzida pela inflamação foi inibida pela administração de um anticorpo contra granulócitos (Okada et al., 1992; Tazawa et al., 2003). Assim, enquanto esses estudos contribuíram para confirmar a positiva associação entre inflamação e tumorigênese, há pouca informação sobre a influência de distintos ambientes inflamatórios (agudo e crônico) no desenvolvimento tumoral e em eventos-

chave (recrutamento/ativação de células inflamatórias, angiogênese e produção de citocinas local e sistêmica) do processo. Neste trabalho, também foi proposto então, utilizar o modelo de implante de esponja para estudar a influência da inflamação aguda e crônica no desenvolvimento do tumor mamário murino 4T1 e em seus componentes principais (produtos celulares inflamatórios e angiogênicos locais e sistêmicos).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Nos últimos anos, o conhecimento de mecanismos de carcinogênese, do processo de metástase, da imunologia dos tumores e do microambiente tumoral tem avançado e contribuído para novas perspectivas no tratamento do câncer. No entanto, as altas taxas de morbidade/mortalidade decorrentes da doença se devem, especialmente a tumores com alta capacidade de metastatização e à falta de terapias que sejam efetivas nos estágios avançados da doença. Além disto, o diagnóstico nas fases iniciais da doença é difícil, visto que, o padrão ouro para o diagnóstico definitivo continua sendo, em muitos casos, a biópsia com análise histológica, que é uma técnica invasiva e executada em fases tardias (Goodson e Grossman, 2009). Evidências científicas demonstram que o ambiente tumoral caracteriza-se por dois componentes básicos, um componente neoplásico constituído de células transformadas, e um componente não neoplásico constituído de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e células inflamatórias (Mbeunkui e Johann, 2009). Além disso, os produtos celulares do processo tumoral (fatores pró-angiogênicos, pró-inflamatórios, enzimas proteolíticas, proteoglicanos,

componentes da matriz extracelular, radicais livres e óxido nítrico) participam ativamente do desenvolvimento tumoral. Embora a inflamação, a angiogênese e a produção de citocinas e demais produtos do microambiente tumoral sejam características comuns de quase, se não de todos os tumores, a relevância destes processos no desenvolvimento tumoral é controversa e as terapias baseadas nestes alvos têm sido ineficazes, possivelmente porque as informações sobre a intensidade destes componentes tumorais em diferentes tipos de neoplasias não têm sido completamente estabelecidas. Assim, não tem sido possível comparar a extensão/grau destes processos em diferentes tipos de tumores e promover terapias diferenciais. A primeira hipótese deste trabalho foi que, tumores de origens distintas possuiriam perfis inflamatórios e angiogênicos diferenciais os quais poderiam influenciar sua progressão. Além disso, hipotetizamos que o processo inflamatório agudo e o crônico poderiam influenciar o desenvolvimento tumoral distintamente. Estas hipóteses foram testadas analisando-se o padrão de desenvolvimento e intensidade dos componentes inflamatório e angiogênico de tumores experimentais murinos, B16F10 (melanoma), CT26.WT (carcinoma de cólon) e 4T1 (carcinoma mamário). A contribuição do processo inflamatório agudo e crônico no desenvolvimento tumoral foi avaliada, utilizando-se o modelo de implante de esponja para alojar células 4T1 (tumor de glândula mamária), uma estratégia experimental utilizada para avaliar a influência de células do hospedeiro e sua interação na progressão tumoral. Ao se caracterizar componente/s dominante/s em neoplasias de origens distintas e a contribuição da inflamação para o desenvolvimento tumoral será possível propor novas abordagens terapêuticas baseadas nas características dominantes de cada tumor.

### **3. OBJETIVOS**

#### *3.1 Objetivo geral:*

Caracterizar o perfil inflamatório e angiogênico associados ao desenvolvimento de tumores murinos B16F10, 4T1 E CT26.WT e a influência da inflamação induzida por implante sintético na progressão do tumor mamário 4T1.

#### *3.2 Objetivos específicos:*

- Estabelecer a curva de crescimento dos tumores primários murinos induzidos por inóculos de células das linhagens B16F10 (melanoma), CT26.WT (carcinoma de cólon) e 4T1 (tumor de glândula mamária).
  
- Determinar nas linhagens B16F10 (melanoma), CT26.WT (carcinoma de cólon) e 4T1 (tumor de glândula mamária), por meio de marcadores inflamatórios, a infiltração de neutrófilos (mieloperoxidase-MPO) e de macrófagos (N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase- NAG) nos tumores.
  
- Mensurar a produção de óxido nítrico (NO) indiretamente por meio da dosagem de nitrito nas massas tumorais.
  
- Determinar a angiogênese tumoral indiretamente por meio da dosagem de hemoglobina e diretamente utilizando-se marcadores específicos de vasos sanguíneos tumorais.

- Avaliar a produção de citocinas/quimiocinas nos tumores primários e sistemicamente através dosagem de VEGF, TNF- $\alpha$ , e/ou TGF- $\beta$ 1 e CCL2 por ELISA.
- Caracterizar a influência dos processos inflamatórios agudo e crônico induzido por implantes sintéticos no desenvolvimento do tumor mamário 4T1.
- Avaliar por citometria de fluxo as populações de células inflamatórias em implantes de 24h e 10 dias.



## **4.MATERIAL E MÉTODOS**

### ***4.1 Células tumorais, inoculação do tumor experimental e mensuração***

B16F10 (melanoma), CT26.WT (carcinoma do cólon) e 4T1 (tumor de glândula mamária) (American Type Culture Collection, Manassas, VA) foram utilizadas neste estudo. As células do cólon CT26.WT foram derivadas a partir de um adenocarcinoma do cólon induzida por um carcinógeno (Tsuru et al., 1983), e foram clonadas para gerar CT26.WT (Wang et al., 1995). Clones de B16F10 foram obtidos a partir de melanomas malignos espontâneos (Fidler e Kripke 1977). A linhagem 4T1 é uma variante tioguanina resistente que foi selecionada a partir da linhagem 410.4 sem tratamento mutagênico (Aslakson et al., 1992). As células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT) contendo 10% FBS, a 37 ° C numa atmosfera umidificada de CO<sub>2</sub> a 5%. Uma vez que a monocamada confluenta foi colhida por incubação de 2 minutos com tripsina / EDTA (ácido etileno-diamina-tetra-acético 0,025 e 0,02% w/v). As células foram centrifugadas durante 10 minutos e foi ajustada a concentração apropriada em PBS, (100 µl/1x10<sup>6</sup> células) foram injetados no flanco direito de camundongos singênicos. Quarenta machos Balb/c (8 semanas, peso 20 g) foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 10 animais que receberam células 4T1 ou CT26.WT. As células B16F10 foram inoculadas em camundongos machos C57/BL6, paralelamente, grupos de animais Balb/c e C57/BL6 não portadores de tumores (n=5) foram utilizados para excisão da pele do dorso, e contagem de vasos na pele normal e para obtenção do soro, para determinação dos níveis basais de citocinas. Todos os animais foram

fornecidos pelo Centro de Bioterismo - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais; Belo Horizonte - Brasil. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com as normas e regulamentos do com o comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), protocolo de autorização nº 45/2014.

#### **4.2 Preparação de discos de esponja e implante**

Os implantes foram discos de 5 mm de espessura x 8 mm de diâmetro de esponjas de poliéter-poliuretano (VITAFOAM Ltd., Manchester, Reino Unido) elas foram embebidas durante a noite em 70% v / v de etanol e esterilizadas por fervura em água destilada durante 15 minutos antes da implantação, os animais foram anestesiados com, os animais foram anestesiados com a mistura de xilazina 2% e cetamina 10 %, por via *i.p.*,o pelo dorsal tricomizado e a pele limpa com etanol a 70%. Os discos de esponja foram assepticamente implantados numa bolsa subcutânea, previamente preparada por divulsão do tecido cutâneo no flanco do animal. No pós-operatório, os animais foram monitorados quanto a sinais de infecção no local operatório, desconforto ou sofrimento, quaisquer que demonstraram esses sinais foram imediatamente e humanamente sacrificados. Os implantes foram retirados 24 horas ou 10 após a realização do seu implante para análise.

#### **4.3 Digestão enzimática dos implantes de esponja e imunofenotipagem de leucócitos por citometria de fluxo.**

Três implantes de esponja de cada grupo (24 horas e 10 dias pós-implante) foram cuidadosamente excisados, e cortados em placa de petri com uma tesoura, e em seguida digerido em colagenase tipo I 0,2% (Sigma Chemicals, St Louis, MO) 500µL por esponja. Após incubação durante 30 min a 37 °, as células foram centrifugadas (500 g durante 10 min a 4 ° C). O sobrenadante foi descartado e foram adicionado 500 µL de tripsina 0,25% diluída em PBS/SBF 10% e testados quanto à viabilidade com azul de tripan. As células isoladas a partir de esponjas foram suspensas em PBS/BSA 2% . Após as células foram lavadas com tampão FACS, e incubadas com anticorpos contra as as moléculas da superfície durante 20 minutos a 4 ° C, e fixadas, em 200 ul de PBS/paraformaldeído 2% (Sigma Aldrich). 30.000 eventos foram adquiridos para análise usando FACSCanto-II (BD Biosciences). Os painéis de anticorpos incluíam os seguintes anticorpos: anti-F4 / 80 (clone BM8)-Pacific blue, anti-CD11b (clone M1 / 70)-PE / Cy7, anti-CD11c (clone N418) -APC / Cy7, adquirido de BioLegend ; anti-IA / IE (MHC-II), (clone 2G9) FITC, anti-GR1 (clone RB6-8C5) -Percp-Cy5.5 e anti-CD3 (clone 17A2)-PE, anti-CD8 (clone 53-6.7) adquirido de BD Biosciences, anti-CD4 (clone GK1.5)-PE / Cy7 e anti-F4 / 80 (clone BM8)-PE, adquirido de eBiosciences. Os dados foram analisados usando FlowJo Versão 9.7.5 (TreeStar).

Cada célula é avaliada com relação ao tamanho (dispersão de luz frontal-FSC-A) e granularidade e complexidade interna (dispersão de luz lateral SSC-A), bem como para a intensidade de fluorescência para detecção de diferentes marcadores de superfície (imunofenotipagem). Uma áera (*gate*) de dispersão

frontal (FSC-A) e dispersão lateral (SSC-A) foram usadas para remover inicialmente detritos e para capturar os leucócitos (Figura 10A). Os leucócitos foram identificados com base na expressão de CD11b (Figura 10B) e, em seguida baixa expressão de F4 / 80 contra GR1 para selecionar monócitos (GR1+ e GR1Low) e neutrófilos (GR1+ F4/80Neg) (Figura 10C e 10D). Uma análise mais detalhada de subpopulações de monócitos foi feito com base na expressão GR1 e aqui designado como: monócitos inflamatórios (F4 / 80 + CD11b + GR1-alta) e monócitos *patrulhadores* (F4 / 80 + CD11b + GR1-Low) (Figura 10C). Alta expressão de F4 / 80 e baixa ou negativa de GR1 foi usada para caracterizar os macrófagos (Figura 10D). CD11c positivos contra alta expressão de IA / IE- (CD11c + IA / IEH) foi usado para caracterizar as células dendríticas (Figura 10E). Os linfócitos T foram os CD3 + (Figura 10F). Os dados são apresentados em frequências (%).

#### **4.4 Implante de esponja e co-implante de células tumorais em esponja**

Para essa avaliação os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: **(1)** um grupo de animais que somente possuíam tumor, e para tanto camundongos receberam injeções subcutâneas (SC) de  $1 \times 10^6$  células de 4T1/100 $\mu$ l de PBS (n = 13), **(2)** camundongos que receberam implantes SC esponjas de poliéter-poliuretano (n = 10) sendo estas retiradas no tempo de 24 horas ou 10 dias pós implante e **(3)** camundongos que receberam implantes de esponjas e 24 horas após foi realizado o inóculo de  $1 \times 10^6$  células de 4T1/100 $\mu$ l de PBS dentro da esponja (n = 14/grupo), **(4)** camundongos que receberam

implantes de esponjas e 10 dias após foi realizado o inóculo de  $1 \times 10^6$  células de 4T1/100 $\mu$ l de PBS dentro da esponja (n = 14/grupo).

A célula tumoral escolhida 4T1 foi obtida e cultivada conforme descrito no item 4.1 a densidade apropriada foi ajustada em PBS; 100  $\mu$ l da suspensão de células ( $1 \times 10^6$  células).

O grupo que recebeu implantes de esponja e inoculados com  $1 \times 10^6$  células de 4T1 a inflamação foi induzida pela inserção de um corpo estranho, o implante subcutâneo do de esponja de poliéter-poliuretano tal como descrito anteriormente (Castro et al., 2012, Marques et al., 2011) 24 horas ou 10 dias após os implantes de esponja foram injetados  $1 \times 10^6$  células 4T1 na esponja pré-inserida.

#### **4.5 Avaliação do desenvolvimento tumoral**

O volume do tumor foi determinado periodicamente e ao final do período experimental. Um paquímetro foi utilizado para coleta dos dados de volume do tumor a cada 48 horas nos experimentos de caracterização do perfil inflamatório e angiogênico das três linhagens avaliadas (B16F10, 4T1 e CT26.WT) e a cada 5 dias no experimento onde foi avaliado a influência da inflamação induzida por implante sintético na progressão do tumor mamário 4T1. O volume foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $TV \text{ (mm}^3\text{)} = 0,52 AB^2$ , onde A é o eixo menor e B é o eixo maior (Ghoneum et al., 2008). Aos 15 dias pós-inoculação, o sacrifício foi realizado por sobredose anestésica, e os tumores foram removidos e pesados, e posteriormente foram utilizados para

determinação da angiogênese, inflamação, produção de citocinas e análise histopatológica.

#### ***4.6 Extração de hemoglobina***

O índice de vascularização da amostra foi avaliado por meio da quantidade de hemoglobina (Hb) detectada no tecido utilizando o método de Drabkin (Drabkin e Austin, 1932). As amostras, foram homogeneizadas com Ultra-Turrax, (Schlappmuhler, Usingen, Alemanha) em 2 ml de reagente de Drabkin (Labtest, São Paulo, Brasil), e centrifugado a 10.000 g durante 40 min. Os sobrenadantes foram filtrados através de um filtro 0,22 microns (Millipore, Danvers, MA, EUA). A concentração de hemoglobina nas amostras foi determinada espectrofotometricamente por medição da absorbância a 540 nm utilizando um leitor de placas de ELISA e comparados com uma curva padrão de hemoglobina. Os resultados obtidos são expressos em concentração de hemoglobina ( $\mu\text{g}$ ) por (mg) de peso úmido de tecido.

#### ***4.7 Extração de tecido e determinação das atividades de mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase***

A presença de neutrófilos nos tumores e/ou esponja, foi medido por ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO), como anteriormente descrito (Marques et al., 2011; Mendes et al., 2007; Teixeira et al., 1999). As amostras foram pesadas e homogeneizadas em tampão de pH 4,7 (NaCl 0,1 M, NaPO<sub>4</sub> 0,02 M, 0,015 M NaEDTA), processou-se a centrifugação a 10.000 g durante 40

min. Os sedimentos foram então ressuspensos em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05 M (pH 5,4), contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% (HTAB) seguido por três ciclos de congelamento-descongelamento, utilizando nitrogênio líquido. A atividade de MPO no sobrenadante das amostras foi determinada por medição da alteração na absorvância (densidade óptica; OD) a 450 nm, utilizando setetrametilbenzidina (1,6 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3 mM). A reação foi terminada pela adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4M). Os resultados foram expressos como alteração na OD por g de tecido úmido.

A infiltração de células mononucleares nas amostras foi quantificada através da medição dos níveis da enzima lisossomal N-acetilglucosaminidase (NAG) presente em níveis elevados no macrófago ativado (Marques et al., 2011; Mendes et al., 2009; Teixeira et al., 2005). Os tumores foram homogeneizados em solução de NaCl a 0,9% (w / v) contendo 0,1% v / v de Triton X-100 (Promega, Madison, WI, EUA) e centrifugadas (3000 x g, 10 min a 4 ° C). Amostras (100 µl) do sobrenadante resultante foi incubada durante 10 min com 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-beta-D-glucosaminide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) preparado em tampão citrato / fosfato (0,1 M de ácido cítrico, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M; pH 4,5) para se obter uma concentração final de 2.24mM. A reação foi paralisada pela adição de 100 µl de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6). A hidrólise do substrato foi determinada por medição da absorção a 400 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de tecido úmido.

#### **4.8 Dosagens de VEGF-A, TNF- $\alpha$ , CCL2 e TGF- $\beta$**

Fragmentos de tumores e/ou esponjas foram pesados e homogeneizados em PBS (1 ml por 100 mg de tecido) a pH 7,4 contendo 0,05% de Tween e centrifugado a 10.000 x g durante 30 min. As citocinas VEGF, TNF- $\alpha$ , MCP-1 e TGF- $\beta$ 1, no sobrenadante foram medidas em 50  $\mu$ l do sobrenadante utilizando kits de imunoenensaio (R&D Systems, EUA) e seguindo o protocolo do fabricante. A dosagem de VEGF e TNF foi realizada no soro dos animais não portadores (níveis basais) e portadores dos tumores, B16F10 (melanoma), CT26.WT (carcinoma de cólon) e 4T1 (tumor de glândula mamária). Resumidamente, diluições de sobrenadantes livres de células foram adicionadas em duplicata a placas de ELISA revestidas com um anticorpo monoclonal murino específico contra a citocina, seguido pela adição de um segundo anticorpo policlonal conjugado a peroxidase contra a citocina. Após lavagem para remover qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado, uma solução de substrato (50  $\mu$ l de uma solução a 1:1 de peróxido de hidrogênio e 10mg/ml tetrametilbenzidina em DMSO) foi adicionada aos poços. O desenvolvimento da cor foi parado, após 20 minutos de incubação, com ácido sulfúrico 2 N (50  $\mu$ L) e a intensidade da cor foi medida a 450nm em um espectrofotômetro (E max - Molecular Devices). Padrões foram de 0.5- $\log_{10}$  diluições de citocinas recombinantes de murinos a partir de 7.5 pg ml<sup>-1</sup> até 1000 pg ml<sup>-1</sup> (100  $\mu$ L). Os resultados foram expressos como pg de citocinas por mg de tecido úmido.

#### **4.9 Dosagem do óxido nítrico (NO)**

A produção de NO foi avaliada por medição de níveis de nitrito de acordo com o método descrito por Green et al., (1982). Fragmentos de tumores removidos



15 dias pós-implantação foram pesados e incubados durante 15 min a 37 ° C com PBS (500 µl). O meio de incubação (100 µl) foi misturado com 10 µl de reagente de Griess (0,1% de N-1-naphthylediamine, 1% de sulfanilamida em 5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e a densidade óptica foi medida a 540 nm. A quantidade de nitrito no meio de incubação foi calculada utilizando-se o nitrito de sódio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) como padrão.

#### **4.10 Análise histológica e coloração**

Os tumores (n = 5 para cada um deles) e os fragmentos de pele adjacente a eles, foram retirados cuidadosamente, e fixados em formalina (10 % v/ v em solução salina isotônica). Secções (5 µm) foram coradas com hematoxilina e eosina (H & E) e processadas para análise ao microscópio óptico. A densidade microvascular (MVD) em áreas de “*hot spot*” em tumores foi determinada por meio da marcação com anticorpo para o fator VIII (clone A0082, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, EUA) de acordo com o método descrito por Maeda et al., 1995. As secções de tecido (5 µm) foram desparafinados e a recuperação antigênica foi realizada em tampão de citrato (pH 6,0), as lâminas foram submersas em tampão citrato durante 25 min a 95 ° C e, em seguida, resfriou-se durante 1h na mesma solução tampão. As secções foram incubadas durante 5 minutos em 3 % de peróxido de hidrogênio para extinguir a peroxidase tecidual endógena. Ligações não específicas foram bloqueadas utilizando soro de cabra durante 10 minutos (1:10 em PBS) com 1 % de albumina de soro bovino (PBS). As secções foram então imunocoradas com o anticorpo (1:40 diluição) durante 60 minutos à temperatura ambiente. Depois

de lavadas em tampão Tris –HCl os cortes foram incubadas durante 30 min à temperatura ambiente com Estreptavidina - HRP (Dako; Carpinteria , CA, EUA ). As reações foram reveladas pela aplicação de 3,3 ' –diaminobenzidina em solução de cromogênio (Dako, Carpinteria , CA , EUA ). As secções foram contrastadas com hematoxilina e montadas em Permount (Fisher Scientific; NJ ,EUA).

Para realizar a análise morfométrica, as imagens de secções transversais dos tumores ou de interface tumor/pele obtidos a partir de 15 campos (8533)  $\mu\text{m}^2$  foram capturadas com uma objetiva no aumento de 40 vezes em microscópio de luz (aumento final = 400x). As imagens foram digitalizadas através de um TK-1270/JCB microcâmara JVC e transferido para um analisador (Image Pro Plus 5.0). Um vaso contável foi definido como uma estrutura com um lúmen que continha ou não células sanguíneas.

#### **4.11 *Análise Estatística***

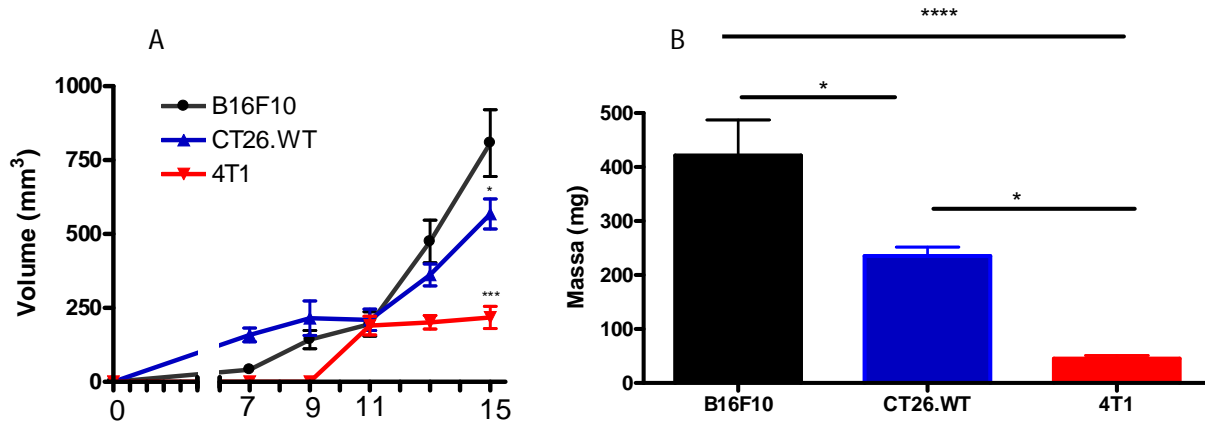
A construção dos gráficos e análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPadPrism 5. Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e comparados com os grupos controles. Foram realizadas análises de variância, one-Way ANOVA, seguidas de teste de Bonferroni, ou two-way ANOVA sendo consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

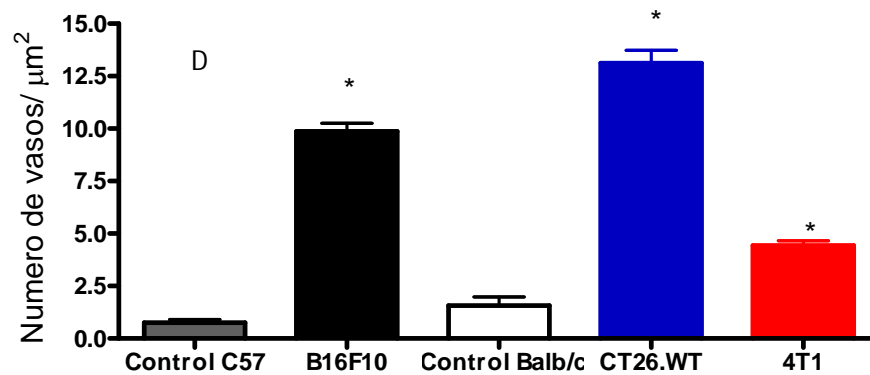
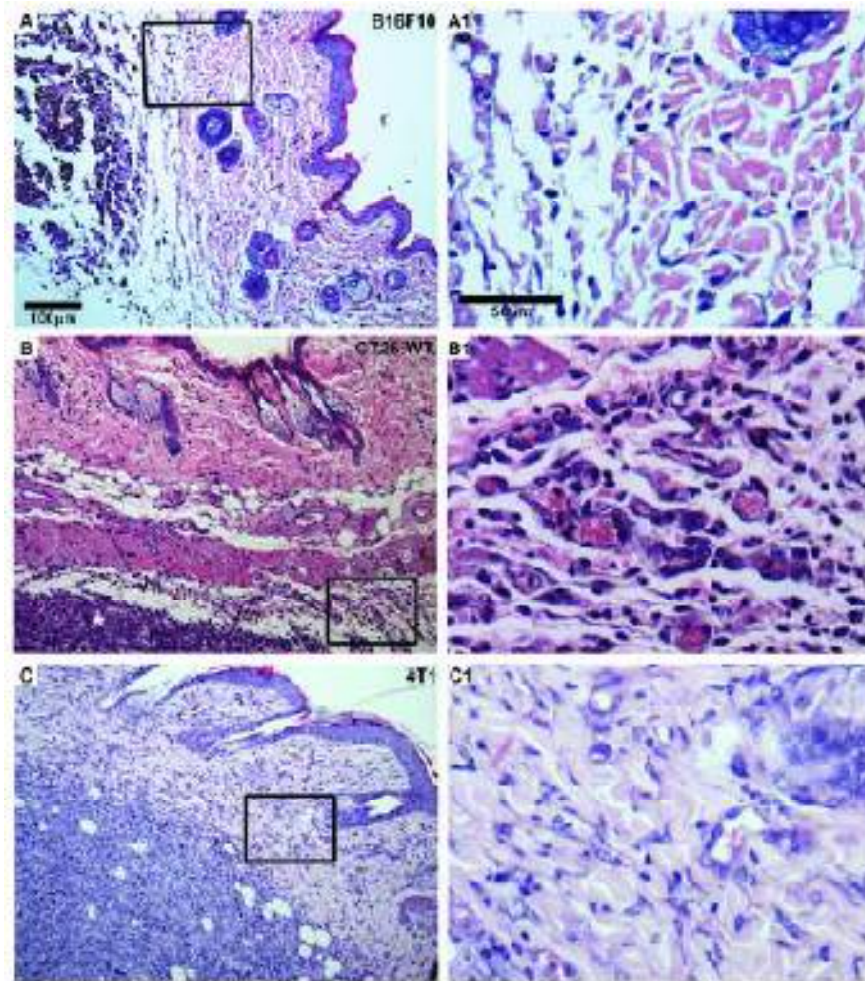
### *5.1 Crescimento tumoral e características histológicas*

A inoculação de  $1 \times 10^6$  de células tumorais (B16F10, CT26.WT e 4T1) em animais singênicos resultou no desenvolvimento de massas tumorais que foram diferentes para cada tipo de tumor. A cinética de crescimento do tumor mostrada na Fig. 3A mostra que o ritmo de crescimento do melanoma foi mais rápido do que o de cólon ou do tumor mamário. O último apresentou o crescimento mais lento e menor (Fig. 3B). A análise histológica de secções de tumor com coloração com H.E. mostrou um perfil distinto dos três tipos de tumores e alterações acentuadas no número de vasos no tecido cutâneo adjacente ao tumor. O melanoma apresentou-se como uma massa densa de células produtoras de melanina e com algumas células tumorais infiltrando a derme. Uma rica rede vascular preenchida com hemácias foi observada e também poucas áreas de tecido necrótico. As células neoplásicas apresentaram núcleos arredondados com cromatina densa e citoplasma moderadamente eosinofílico, limites celulares imprecisos e núcleos hipocrômicos com localização central a basal com um ou nenhum nucléolo, o pleomorfismo celular foi moderado com poucas figuras de mitoses. A anisocariose e anisocitose foram mínimas. Os vasos sanguíneos tumorais eram compostos por células alinhadas com formato alongado apresentando núcleo esférico a oval com pouco citoplasma. No tecido conjuntivo da pele em meio às fibras colágenas e as áreas de edema um infiltrado de células inflamatórias foi observado. Cortes histológicos de tumores do cólon

(CT26.WT) revelaram uma densa massa de células tumorais com pouco tecido fibrovascular. Áreas de necrose multifocais foram mais comuns e extensas quando comparado com os outros tumores. O tecido conjuntivo da pele apresentou-se altamente vascularizado e com distribuição difusa de células inflamatórias na borda da massa tumoral. As células neoplásicas apresentaram anisocariose e anisocitose e cromatina granular com citoplasma eosinofílico com limites celulares imprecisos, o pleomorfismo celular foi moderado. Poucas figuras de mitose foram observadas. Os cortes histológicos do tumor mamário 4T1 mostraram uma massa altamente vascularizada de crescimento compacto, pouco tecido fibrovascular embora em maior quantidade do que o tumor CT26.WT. No tecido conjuntivo da pele, as células inflamatórias estavam espalhadas entre as fibras colágenas e na margem do tumor. Um grande número de células inflamatórias foi observado na massa tumoral. As células neoplásicas apresentaram núcleos grandes com cromatina densa e citoplasma levemente eosinofílico com limites celulares imprecisos, grande pleomorfismo celular. Os núcleos variavam em tamanho, com cromatina pontilhada e um ou mais, pequenos nucléolos (Fig. 4A-C). O tecido conjuntivo peritumoral da pele dos animais portadores do tumor apresentou aumento de cerca de 10 vezes no número de vasos em comparação com o conjuntivo da pele dos animais não portadores do tumor, e o tumor de cólon induziu mais vasos na pele adjacente que os outros dois tumores (Fig. 4D).



**Figura 3.** Cinética de crescimento (A) e massa (B) dos tumores, melanoma, do cólon e mama. A inoculação de diferentes tipos de células tumorais ( $1 \times 10^6$ ) induziu crescimento diferencial. O melanoma cresceu mais em comparação com tumores de cólon ou mama. Os valores são média  $\pm$  SEM de 15-20 animais em cada grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



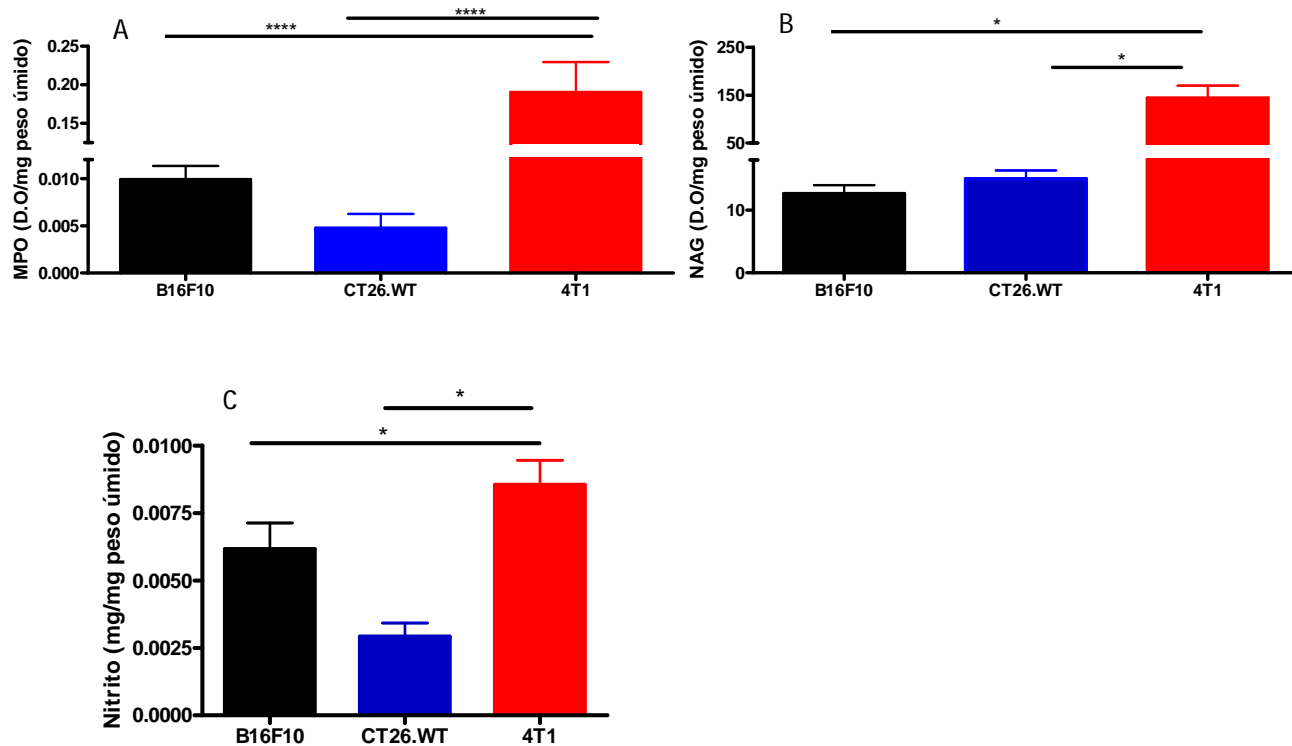
**Figura 4.** Secções histológicas representativas (HE) da interface melanoma / tecido cutâneo (A), tumor do cólon / tecido cutâneo (B) tumor mamário / tecido cutâneo (C). Os tumores apresentaram seu próprio fenótipo e induziram alterações na interface tumor e tecido cutâneo. Fibras de colágeno dispersas,

aumento do número de vasos sanguíneos hiperêmicos e infiltrado inflamatório puderam ser vistos. O número de vasos foi maior na interface tumor de cólon / tecido cutâneo. Os valores representam médias  $\pm$  SEM de 15 campos microscópicos. \*  $p < 0.05$ .

Painel direito (A1, B1, C1) alta ampliação de áreas representativas de cada interface tumor / pele mostrando os vasos sanguíneos mais claramente; C = controle (número de vasos em fragmento de pele próximos ao tecido de tumoral).

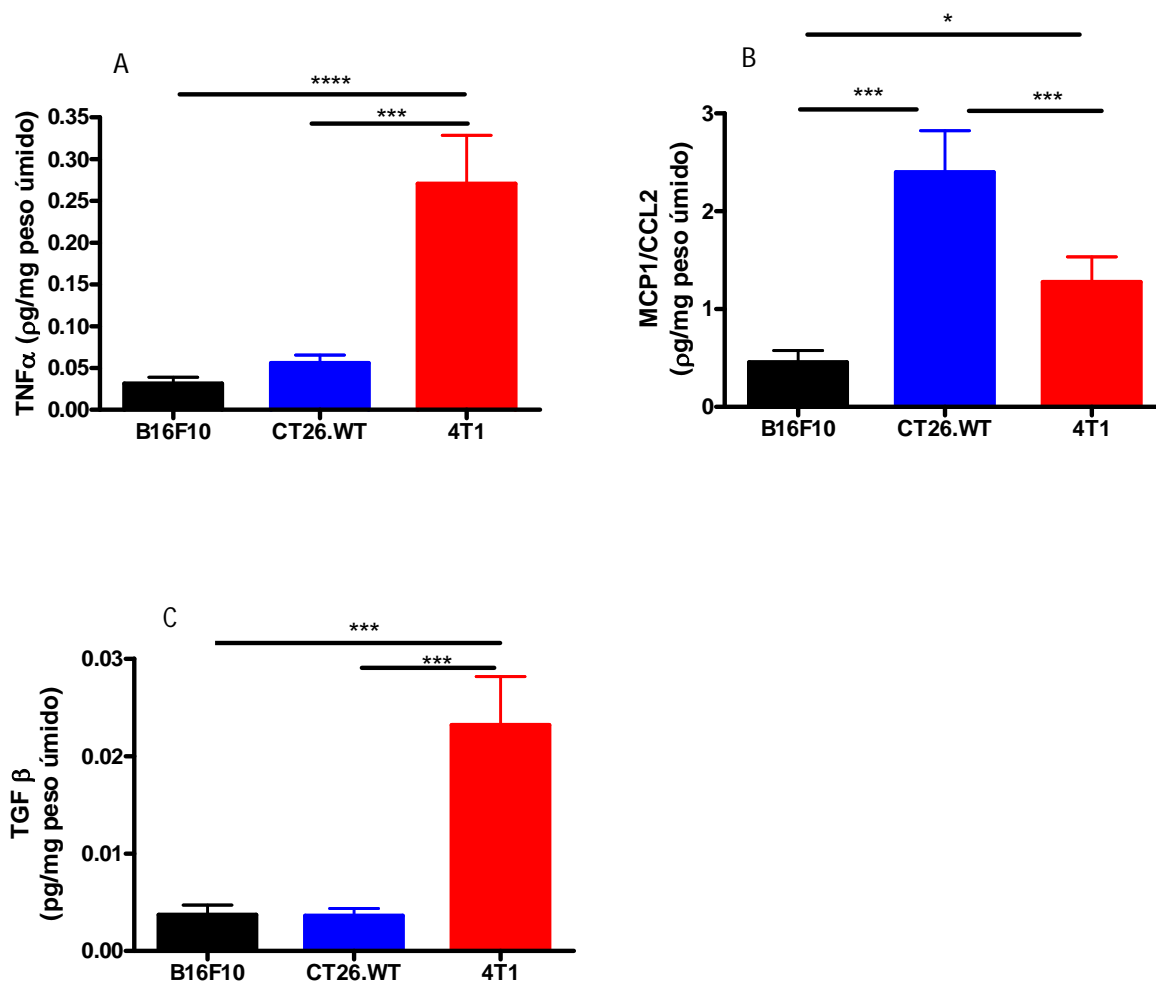
## ***5.2 Grau diferencial do processo inflamatório no melanoma e tumor de cólon e tumor mamário***

Os parâmetros inflamatórios foram avaliados por atividades de MPO e NAG e pelos níveis de nitrito na massa do tumor, estes dados variaram entre os tumores. Os maiores níveis de atividade das enzimas inflamatórias e nitrito foram detectados em tumores 4T1 (Fig. 5A-C). Os níveis da citocinas TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1 também foram maiores no tumor mamário. No entanto, o tumor do cólon produziu mais MCP-1 quando comparado com os outros dois tumores (Fig. 6A-C).



**Figura 5.** Marcadores inflamatórios no melanoma, tumor de cólon e tumor de mama. O tumor mamário apresentou os maiores níveis de MPO (A), NAG (B) e nitrito (C). Os valores são médias  $\pm$  SEM de 15-20 animais em cada grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

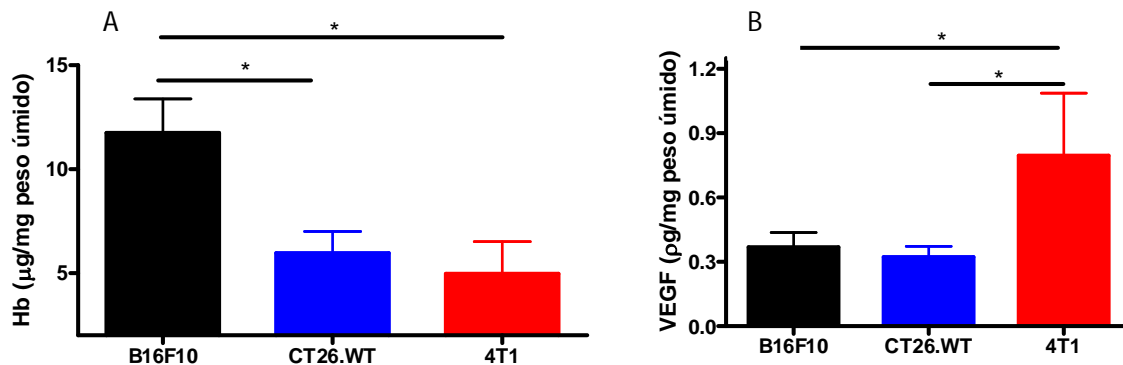




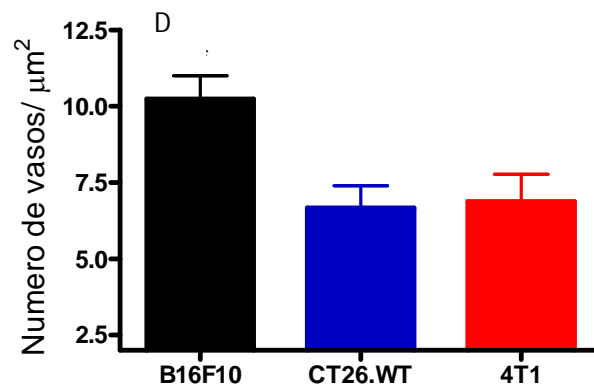
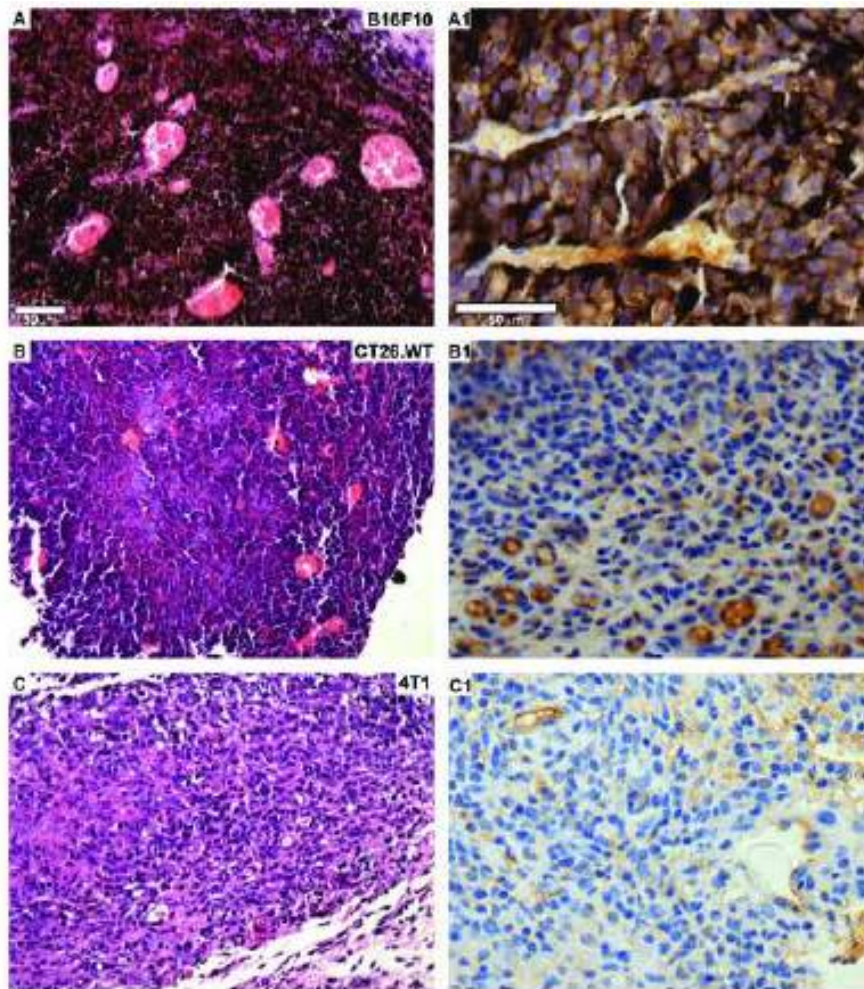
**Figura 6.** Conteúdo de citocinas nos tumores, melanoma, cólon e mama. O tumor mamário produziu mais TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1 do que os outros tumores, mas os níveis de MCP-1 /CCL2 foram maiores no tumor do cólon em comparação com melanoma ou tumor mamário. Valores representam médias  $\pm$  SEM de 15-20 animais em cada grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 5.3 Grau diferencial de angiogênese no melanoma, tumor de cólon e tumor mamário.

Os parâmetros angiogênicos, foram avaliados pelo conteúdo de hemoglobina, níveis de VEGF e número de vasos nos tumores, os resultados mostraram variabilidade entre estes dados nos diferentes tumores avaliados. Melanomas apresentaram maior conteúdo de hemoglobina (aproximadamente 2 vezes mais) do que os outros dois tumores. Em contraste, os níveis de VEGF foram mais elevados (aproximadamente 3 vezes) no tumor mamário, o tumor menos vascularizado (Fig. 7A-B). O número de vasos sanguíneos conforme determinado por análise morfométrica das secções de tumor corrobora com o parâmetro bioquímico avaliado pela dosagem de hemoglobina (Fig. 8 A-D).



**Figura 7.** Marcadores angiogênicos nos tumores: melanoma, cólon e mama. O melanoma teve maior conteúdo de hemoglobina, enquanto que o tumor de mama apresentou maiores níveis de VEGF. Os valores são média  $\pm$  SEM de 8-10 animais em cada grupo. \*  $p < 0.05$ .



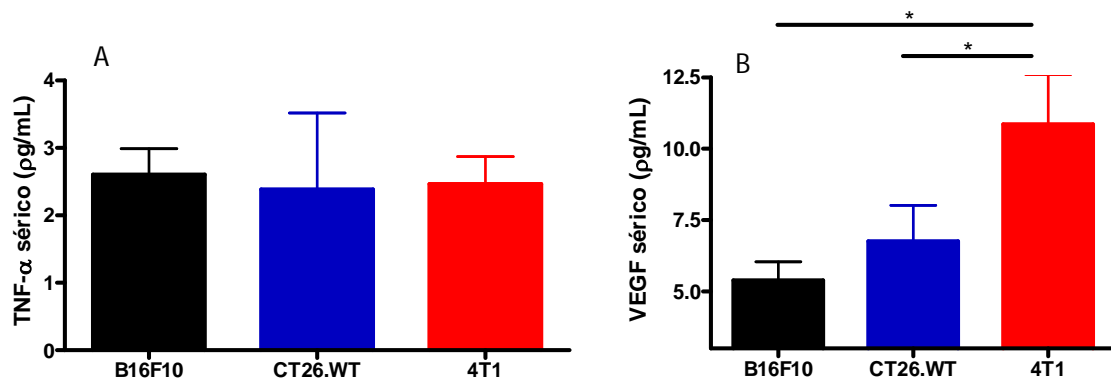
**Figura 8.** Cortes histológicos representativos do melanoma (B16F10)(A-A1) tumor de cólon (CT26. WT)(B-B1) e tumor mamário (4T1)(C-C1) corados com HE (A,B,C) e realizada a imunohistoquímica para o fator VIII, (A1,B1,C1) mostrando maior número de vasos em melanoma em comparação com os outros dois tipos tumorais. Além disso, neste tumor os vasos sanguíneos eram

mais hiperemiados. Em D, número de vasos nos três tipos de tumores.

\*  $p < 0.001$ .

#### 5.4 Níveis sistêmicos de VEGF e TNF- $\alpha$

Os níveis de citocinas (VEGF e TNF- $\alpha$ ) no soro de animais portadores de tumor aumentaram após a inoculação de células tumorais. Os níveis basais séricos de VEGF (pg/ml) dos animais sem tumor foram de  $1,2 \pm 0.07$  em camundongos C57/BL6 e  $2 \pm 0.03$  em camundongos Balb/c. Estes valores foram maiores em camundongos portadores do tumor 4T1 comparados aos demais tumores. Os níveis séricos basais de TNF- $\alpha$  ( $0.05 \pm 0.01$  e  $0.08 \pm 0.03$ - C57BL6 versus Balb/c) aumentaram igualmente para os três tipos de tumores (Figuras 9A-B).



**Figura 9.** Níveis sistêmicos de VEGF e TNF- $\alpha$  em camundongos portadores de tumor. Os níveis de VEGF (B) foram mais elevados nos camundongos portadores do tumor de mama em comparação com os outros dois grupos mas os níveis de TNF- $\alpha$  (A) não foram diferentes entre os grupos. Valores são média  $\pm$ SEM de 15-20 animais em cada grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

A Tabela 2 resume as diferenças obtidas entre os tumores na intensidade dos vários parâmetros analisados.

Tabela 2- Diferenças no grau de angiogênese, inflamação e na produção de citocinas entre os tumores melanoma (B16F10), cólon (CT26.WT) e mamário (4T1).

Tumor	crescimento	Hb	VEGF	Nº de vasos	MPO	NAG	Nitrito	CCL2	TNF	TGF
<b>B16F10</b>	+++	+++	++	+++	++	+	++	+	+	+
<b>CT26.WT</b>	++	+	+	+	+	+	+	+++	+	+
<b>4T1</b>	+	+	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++

+ baixa intensidade; ++ intensidade intermediária; +++ alta intensidade.

Hb = hemoglobina; MPO = mieloperoxidase, NAG = N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase.

### ***5.5 Avaliação do conteúdo inflamatório e das populações celulares por citometria de fluxo nos implantes de 24 horas ou 10 dias***

A implantação subcutânea de discos de esponja de poliéter-poliuretano em camundongos tem sido utilizado para provocar uma reação inflamatória, que evolui de aguda a crônica ao longo do tempo (Marques et al., 2011; Castro et al., 2012). A exsudação inflamatória dos implantes removidos 24 horas após a implantação foi composta de níveis mais elevados de mieloperoxidase (MPO), em comparação com implantes de 10 dias de idade, inversamente, os níveis de NAG foram maiores nos implantes de 10 dias em comparação com os

implantes de 24h. Os níveis de VEGF e TNF- $\alpha$  foram semelhantes nos dois momentos (Tabela 3).

Tabela 3- Marcadores inflamatórios na esponja livre de tumor 24h e 10 dias pós-implantação

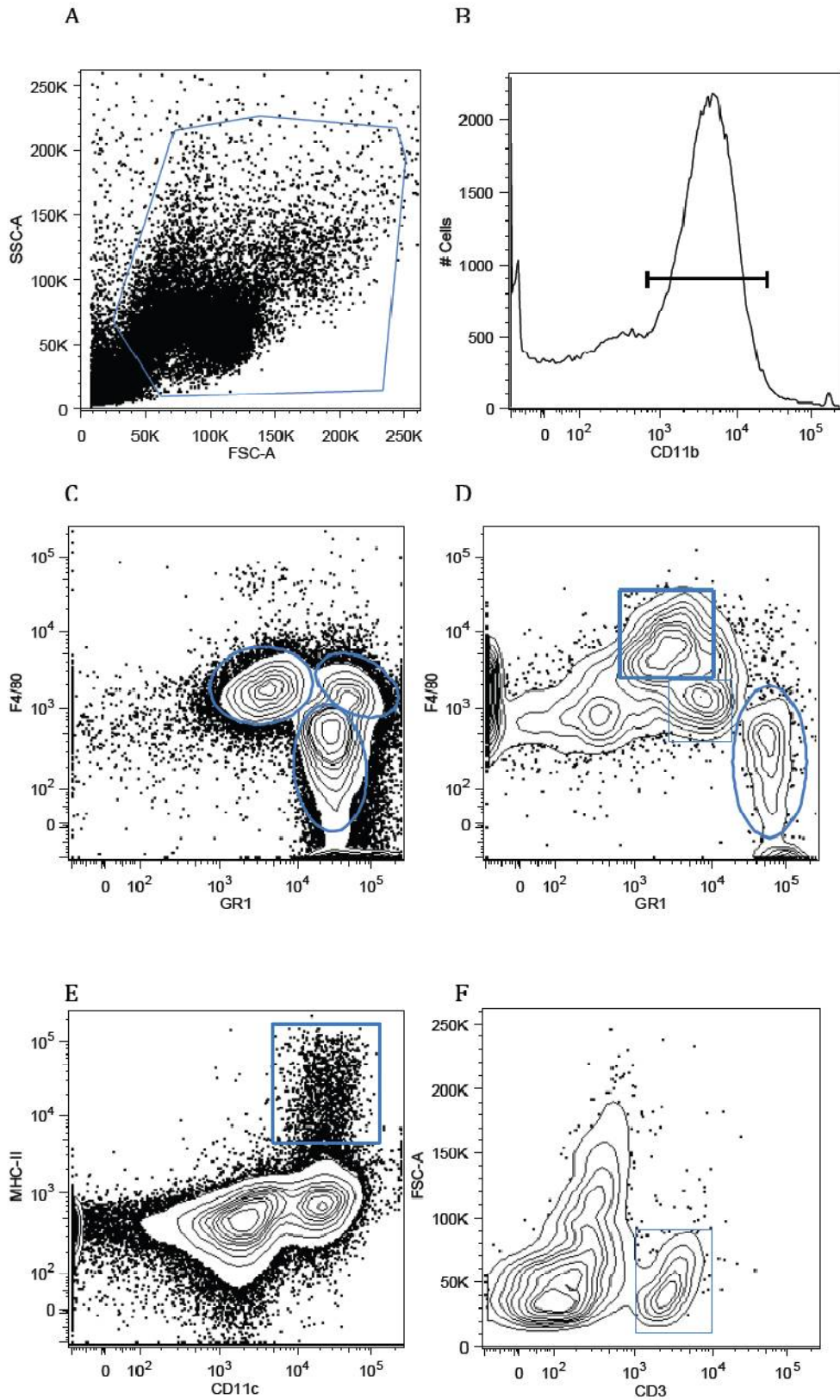
<b>Tempo após implante</b>	<b>MPO (OD/mg peso úmido)</b>	<b>NAG (nmol/mg peso úmido)</b>	<b>VEGF (pg/mg peso úmido)</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/mg peso úmido)</b>
<b>24 h</b>	6.4 $\pm$ 0.8 (n=6) *	1.02 $\pm$ 0.14 (n=3)*	0.6 $\pm$ 0.15 (n=4)	0.25 $\pm$ 0.06 (n=3)
<b>10 dias</b>	2.9 $\pm$ 0.5 (n=3)	1.55 $\pm$ 0.12 (n=3)	0.5 $\pm$ 0.18 (n=4)	0.18 $\pm$ 0.002 (n=3)

MPO-mieloperoxidase; NAG- n-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase;

Todos os resultados são a média  $\pm$  SEM; (n = número de animais); \* p <0,05 (teste-T) comparando 24 h com 10 dias.

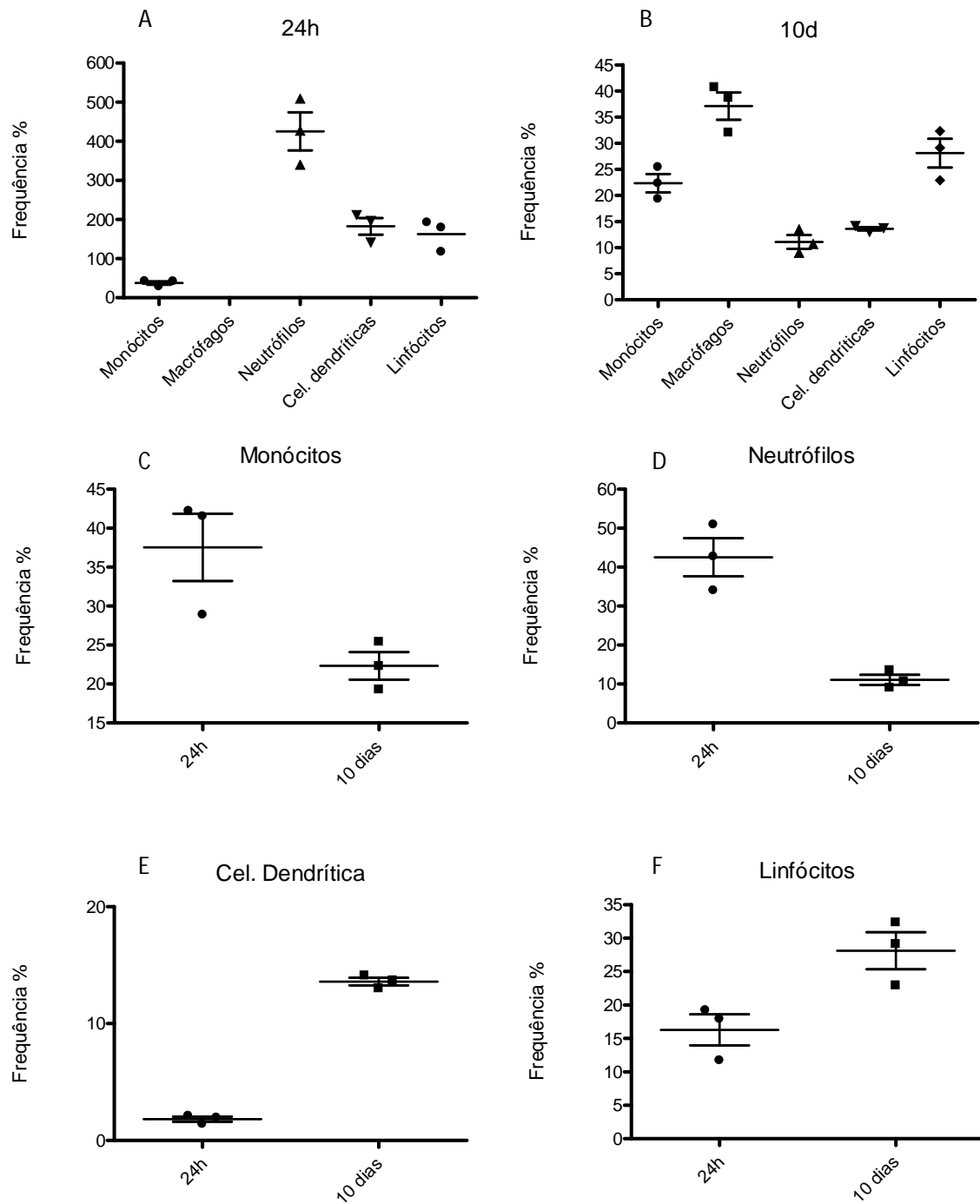
Os tipos de células presentes no implante em ambos os intervalos de tempo em que as células tumorais foram inoculadas (24 horas ou 10 dias após a implantação das esponjas) foram caracterizados por citometria de fluxo após. A análise de citometria de fluxo mostrou diferenças na população celular quando se compara 24 horas e 10 dias. Após 24 horas, a população de leucócitos foi caracterizado principalmente por neutrófilos (42,53% +/- 8,45) e monócitos (37,53% +/- 7,48), com alguns linfócitos (16,27% +/- 4.0) e algumas células dendríticas (1, 82% +/- 0,36) (Figura 11A). Foi possível ver poucas células natural killer com uma frequência muito baixa, inferior a 0,5% (dados não apresentados). Em 10 dias, a população de leucócitos foi caracterizada principalmente por macrófagos (37,10% +/- 4,54), linfócitos (28,1% +/- 4,77) e monócitos (22,33%) 3,05 +/- com algumas células dendríticas (13,60% + / -

0,55) e os neutrófilos (11,07% +/- 2,27) (Figura 11B). Comparando-se a população de leucócitos entre os dois tempos, foi possível observar um aumento do número de monócitos (Figura 11C) e neutrófilos (Figura 11D), em 24 horas, quando comparado com 10 dias e muito poucas macrófagos eram detectáveis em implantes de 24 h (Figura 11A). Após 10 dias, a frequência de macrófagos aumentou muito (Figura 11B), assim como a frequência de células dendríticas (Figura 11E) e linfócitos (Figura 11F). Analisando a sub-população de monócitos, foi possível observar um aumento do número de monócitos patrulhadores (55,7% +/- 1,17) em comparação com os monócitos inflamatórios (em 24 horas) (Figura 12), após 10 dias praticamente havia só monócitos patrulhadores, sem monócitos inflamatórios detectados neste ponto de tempo.



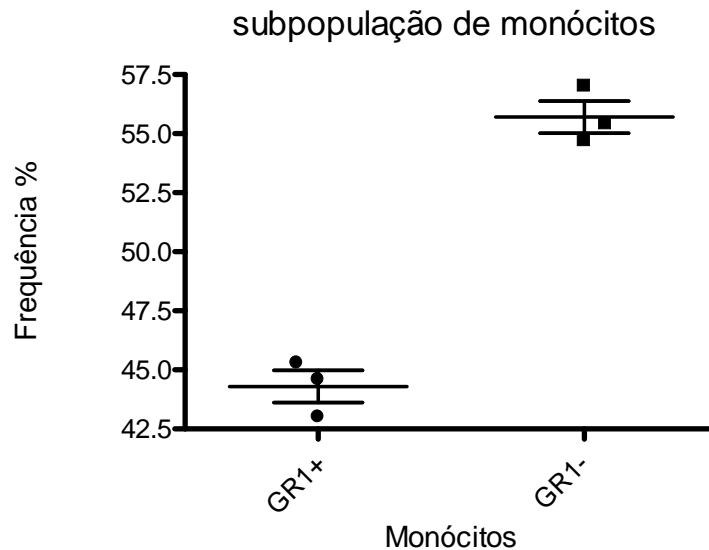


**Figura 10.** A estratégia o para definir as populações mielóides e linfóides por citometria de fluxo de células isoladas de implantes de esponja. (A) Um perfil FSC-A x SSC-A do total de eventos adquirido mostrando o *gate* utilizada para eliminar os debris. (B) Histograma definindo a população CD11b + mielóide. (C e D) Dot plots para definir monócitos (F4/80<sup>lo</sup>), macrófagos (F4/80<sup>Hi</sup>) e neutrófilos (F4/80<sup>Neg</sup>). (E) Dot plot que mostra o perfil de células dendríticas com base em CD11c<sup>+</sup> and MHC-II<sup>Hi</sup>. População de células T (F) com base em células CD3 +.



**Figura 11.** A análise de citometria de fluxo de leucócitos isolados a partir de implantes de esponja. Frequência de leucócitos isolados a partir de esponjas depois de 24 h (A) ou 10 dias (B) do implante. Análise da frequência de células

que compararam 24 horas x 10 dias para os monócitos (C), os neutrófilos (D), as células dendríticas (E) e linfócitos T (F).

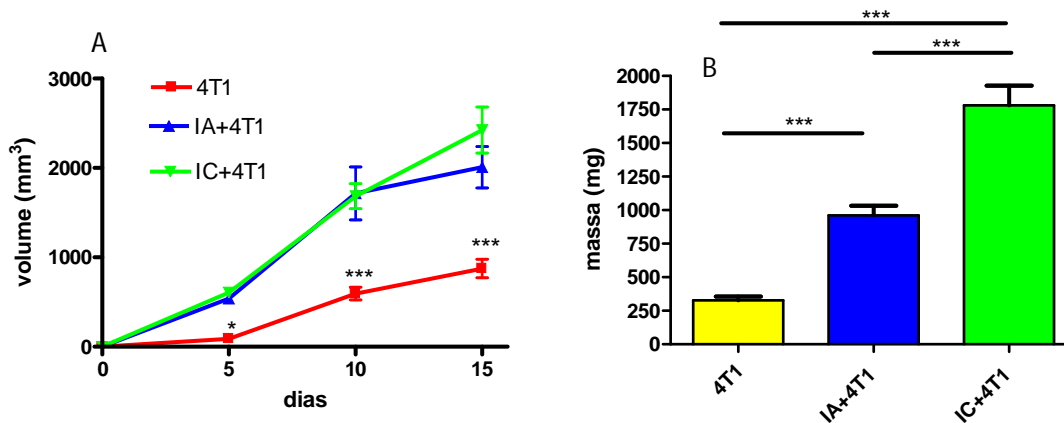


**Figura 12.** A análise de citometria de fluxo de sub-populações de monócitos, isolados a partir de esponjas, com base na expressão de GR1, após 24 horas de implantação.

### **5.6 Avaliação do papel da inflamação aguda ou crônica no desenvolvimento tumoral.**

Para a avaliação do papel da inflamação aguda ou crônica no desenvolvimento tumoral, camundongos Balb/c, foram implantados com esponjas de poliéter-poliuretano, sendo que em um grupo eles receberam o inoculo tumoral ( $1 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ ) dentro da esponja implantada 24 horas antes, caracterizando uma inflamação aguda (IA+4T1) ou dentro da esponja implantada 10 dias do

inóculo tumoral, caracterizando uma inflamação crônica (IC+4T1), o grupo controle recebeu apenas o inóculo celular na densidade de  $1 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ , em todos os grupos, a partir do dia do inóculo foi aguardado um período de 15 dias para o desenvolvimento tumoral. O Desenvolvimento tumoral foi mensurado pelas alterações no volume tumoral no decorrer do ensaio e pela massa ao final do experimento. a cada 5 dias os animais tiveram o volume aferido e ao término do período de 15 dias os animais foram sacrificados e tiveram sua massa final aferida, a figura 8 mostra que nestes dois ambientes inflamatórios distintos, a inoculação de células de tumor 4T1 produziu um tumor que cresceu diferencialmente ao longo de um período de 15 dias (Fig. 13A-B). O peso úmido (mg) de tumores só foi  $327,2 \pm 28,8$  vs  $960 \pm 71,6$  (4T1 + inflamação aguda; IA), contra  $1.781 \pm 147$  (4T1 + inflamação crônica; IC) (Fig. 13B). Os gráficos abaixo mostram o aumento que o processo inflamatório agudo ou crônico promoveu no desenvolvimento do tumor mamário.

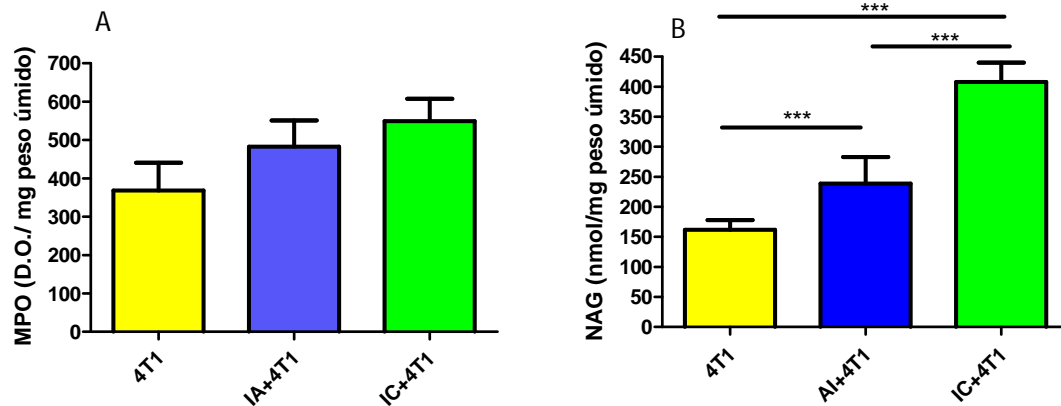


**Figura 13.** Volume (A) e massa (B) do tumor 4T1, sozinho ou inoculado dentro da esponja implantada 24 horas (inflamação aguda- IA+4T1) ou 10 dias (inflamação crônica- IC+4T1) antes. A inoculação de células tumorais( $1 \times 10^6$ ) sozinho ou dentro da esponja implantada 24 horas ou 10 dias antes do inoculo de células tumorais, resultou em tumores de massas diferentes. O tumor inoculado dentro da esponja implantada 10 dias antes do inoculo tumoral, resultou em um implante de massa maior, quando comparado aos outros dois grupos. Os valores são média  $\pm$  SEM de 10-14 animais em cada grupo. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

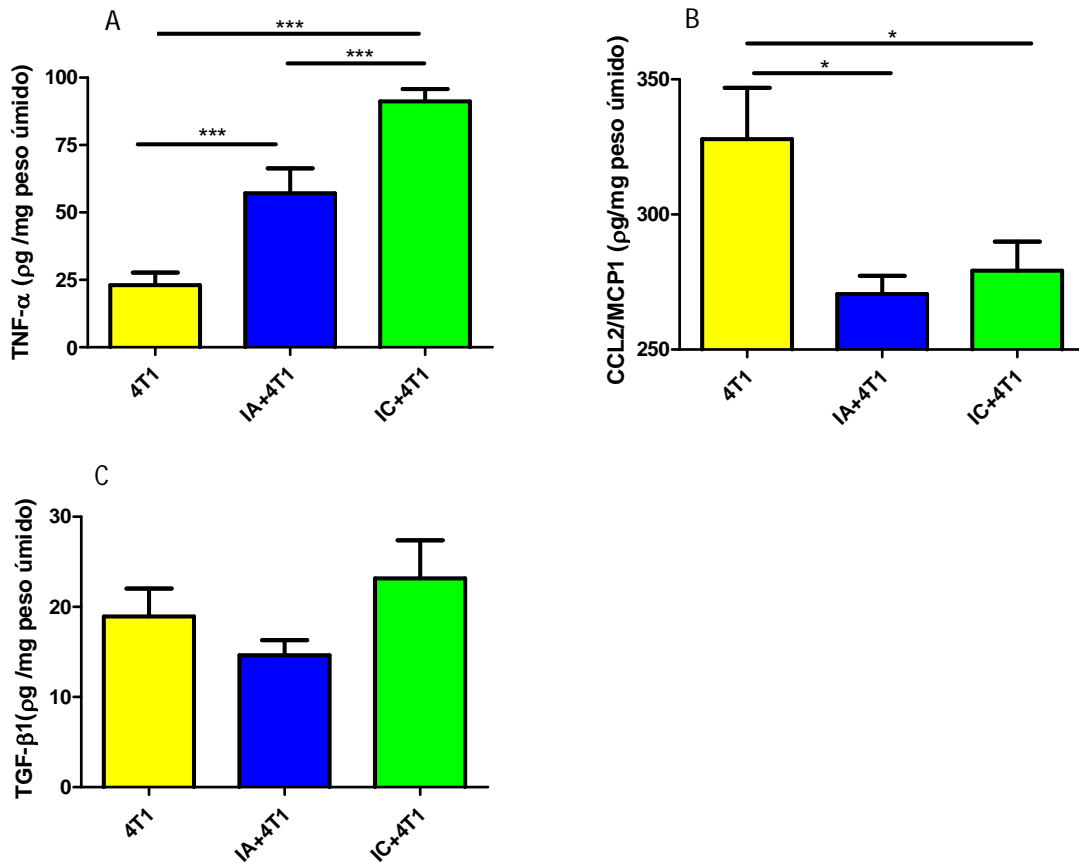
### **5.7 Avaliação do processo inflamatório do tumor formado quando as células tumorais foram inoculadas intra-implante.**

Os níveis dos marcadores inflamatórios avaliados (MPO, NAG, TNF- $\alpha$ , CCL2, TGF- $\beta$ 1) do implante tendo tumor foram também influenciada pela fase do processo de inflamação, em que as células de tumor foram inoculadas. Não

houve diferença na actividade MPO entre os grupos (Figura 14A), mas a atividade de NAG foi maior em tumores inoculados intra-implante em ambos os grupos, em comparação com o tumor sozinho (Fig. 14B). Os níveis de TNF- $\alpha$  foram superiores em ambos os grupos de tumores inoculados intra-implante em comparação com o tumor sozinho (15A). Por outro lado, os níveis da quimiocina CCL2 foram menores nos grupos tumor mais implante em comparação com a do tumor sozinho (Fig. 15B). A produção de TGF- $\beta$ 1 não foi diferente entre os três grupos avaliados (Fig. 15C).



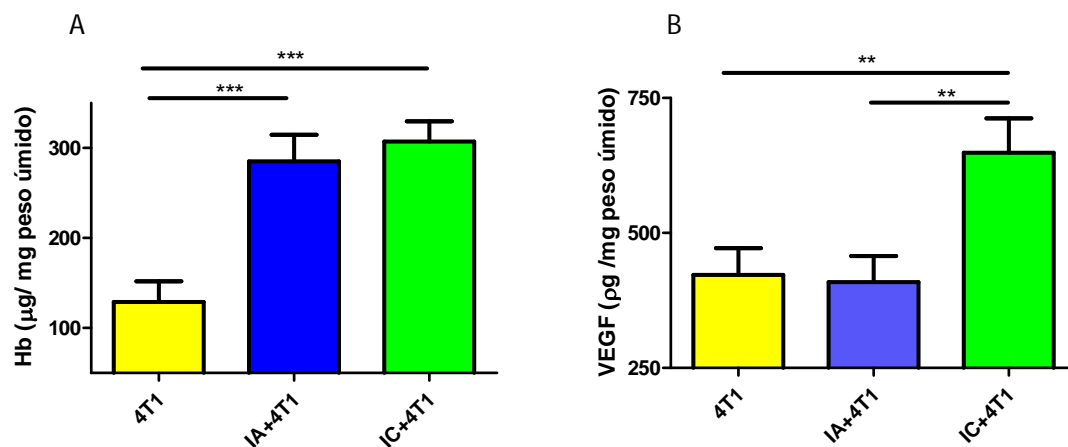
**Figura 14.** Marcadores inflamatórios no tumor 4T1, sozinho ou inoculado dentro da esponja implantada 24 horas (inflamação aguda- IA+4T1) ou 10 dias (inflamação crônica- IC+4T1) antes. O tumor mamário inoculado dentro da esponja implantada 10 dias antes apresentou os maiores níveis de, NAG (B). Os valores são médias  $\pm$  SEM de 15-20 animais em cada grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$



**Figura 15.** Conteúdo de citocinas no tumor 4T1, sozinho ou inoculado dentro da esponja implantada 24 horas (inflamação aguda- IA+4T1) ou 10 dias (inflamação crônica- IC+4T1) antes. O tumor mamário inoculado dentro da esponja implantada 10 dias antes produziu mais TNF- $\alpha$  e os níveis de MCP-1 /CCL2 foram maiores no tumor 4T1 sozinho, não houve diferença nos níveis de TGF- $\beta$ 1. Valores representam médias  $\pm$  SEM de 15-20 animais em cada grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 5.8 Avaliação do grau de angiogênese do tumor formado quando as células tumorais foram inoculadas intra-implante.

Foi caracterizado o índice de vascularização de tumores pelo ensaio do teor de hemoglobina. Em tumores inoculados intra implante, o conteúdo de hemoglobina foi maior em comparação com os tumores sozinhos. O conteúdo de hemoglobina não variou quando as células de tumores de 4T1 foram inoculadas em ambiente inflamatório agudo ou crônico (Fig. 16A). Os níveis da citocina pró-angiogênica VEGF foi superior quando as células 4T1 foram inoculadas em esponjas implantadas 10 dias antes inoculação tumoral em comparação com os outros dois grupos (Fig. 16B).



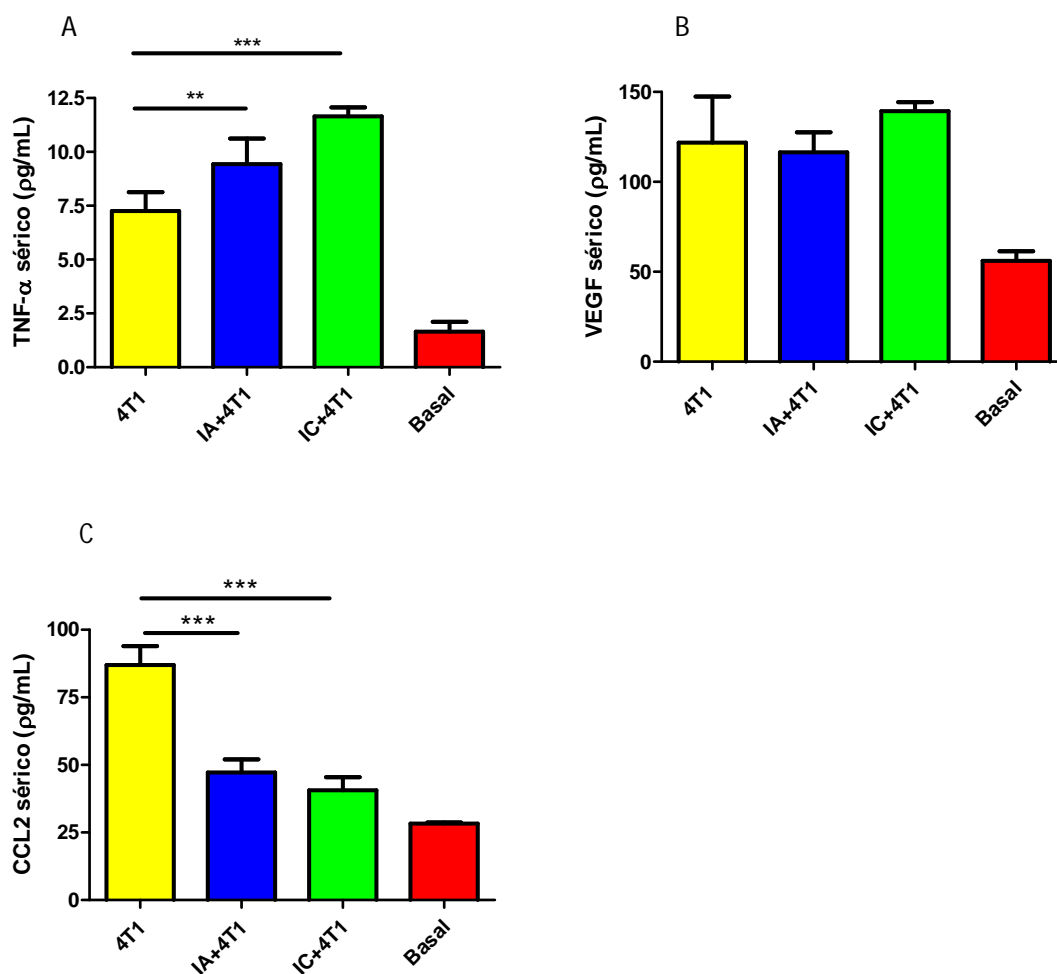
**Figura 16.** Marcadores angiogênicos no tumor 4T1, sozinho ou inoculado dentro da esponja implantada 24 horas (inflamação aguda- IA+4T1) ou 10 dias (inflamação crônica- IC+4T1) antes. Os tumores inoculados intra-implante em ambos os grupos tiveram maior conteúdo de hemoglobina, enquanto que o tumor de mama inoculado dentro da esponja implantada há 10 dias apresentou



maiores níveis de VEGF. Os valores são média  $\pm$  SEM de 8-10 animais em cada grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### ***5.9 Avaliação dos níveis sistêmicos de VEGF e TNF- $\alpha$ no soro de animais quando células tumorais foram inoculadas intra-implante***

Também foi avaliado os níveis sistêmicos de citocinas inflamatórias no soro de animais portadores de tumores inoculado intra implante de esponja ou não e não portadores de tumores. Os níveis sistêmicos de VEGF foi semelhante nos animais portadores de tumor (Fig. 17A). No entanto, os níveis de circulação do TNF- $\alpha$  foram mais elevados no tumor implantado dentro da esponja em comparação com o tumor por si só (Fig. 17B). Por outro lado, os níveis sistêmicos de CCL2 foram mais elevados em animais portadores de tumor por si só, comparado com aquelas em que as células de tumor cresceu intra-implante (Fig. 17C).



**Figura 17.** Níveis sistêmicos de VEGF e TNF- $\alpha$  no tumor 4T1, sozinho ou inoculado dentro da esponja implantada 24 horas (inflamação aguda- IA+4T1) ou 10 dias (inflamação crônica- IC+4T1) antes, e no animal não portador de tumor (Basal). Os tumores inoculados intra-implante apresentam maiores níveis de TNF- $\alpha$ , não houve diferenças quanto aos níveis de VEGF eo grupo portador do tumor sozinho foi observado maior nível de CCL2. Os valores são média  $\pm$  SEM de 8-10 animais em cada grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo foram utilizados modelos tumorais murinos para caracterizar os processos inflamatórios e angiogênicos associados ao desenvolvimento de três tipos de carcinomas distintos; melanoma metastático originado de células B16F10; tumor de cólon originado da linhagem celular CT26 e o tumor mamário induzido por células 4T1. Além disto, investigamos a contribuição do processo inflamatório agudo e crônico induzido por matriz sintética para o desenvolvimento do tumor mamário 4T1.

O crescimento tumoral resulta de processos complexos cujo microambiente neoplásico, composto de células cancerosas, de células inflamatórias, capilares, estroma e seus produtos permitem a progressão da doença maligna. Tem se também evidenciado que a maior parte dos tumores sólidos, pela interação ativa com células do microambiente do hospedeiro, pode induzir alterações patológicas persistentes em torno da massa tumoral e sistemicamente (Fukumura e Jain, 2007; Liotta e Kohn, 2001; van Kempen et al., 2003). Apesar dos avanços no conhecimento de mecanismos da carcinogênese, do processo de metástase, da imunologia de tumores e do microambiente tumoral, altas taxas de morbidade/mortalidade decorrentes da doença continuam, especialmente em indivíduos com tumores com alta capacidade de metastatização devido, principalmente, à falta de terapias que sejam efetivas nos estágios avançados da doença. Em parte, é possível que a ineficácia das abordagens terapêuticas se deva à falta de informações mais específicas de cada tumor quanto aos seus componentes inflamatório e angiogênico, pois embora os tumores sólidos apresentem ambos

componentes, diferenças nas intensidades destes processos em tumores de origens distintas ainda não foram completamente estabelecidas. Realizamos esse estudo para caracterizar comparativamente, o padrão de crescimento dos tumores metastáticos experimentais, B16F10 (melanoma), CT26.WT(tumor de cólon) e 4T1(carcinoma de mama). Foi também avaliado o grau de inflamação, angiogênese, e a produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas nos tumores e alterações vasculares na interface entre os tumores e o tecido cutâneo adjacente. Além disso, a influência dos tumores nos níveis sistêmicos de TNF- $\alpha$  e VEGF (duas citocinas relevantes no câncer) foi determinada.

Optamos por investigar esses três tipos distintos de tumores devido ao seu elevado potencial metastático, pronunciada vascularização e elevado conteúdo inflamatório e alta prevalência em humanos (Correa et al., 2005; Guiducci et al., 2004; Ostberg et al., 2005). Nossos resultados mostraram que a inoculação da mesma quantidade de células ( $1 \times 10^6$  células) de B16F10 ou CT26.WT ou 4T1 no flanco de camundongos singênicos induziu tumores que mantinham as suas características específicas, tal como descrito anteriormente (Aslakson and Miller, 1992; Fidler, 1975; Wang et al., 1995), mas apresentaram notáveis diferenças na intensidade dos processos analisados. O peso dos tumores, 15 dias após a inoculação de  $1 \times 10^6$  células foi marcadamente diferente. Melanomas foram 2 e 10 vezes mais pesados do que os tumores de cólon e mama, respectivamente. Este resultado mostra a complexidade da regulação do crescimento de neoplasias e sugere que os diferentes tipos de tumores possuem mecanismos distintos para induzir o seu desenvolvimento. Os três tipos de tumores induziram alterações visíveis no tecido da pele adjacente ao local de crescimento dos tumores. A análise microscópica da interface entre o

tumor e tecido cutâneo mostrou fibras de colágeno dispersas, aumento do número de vasos sanguíneos congestionados e infiltrado inflamatório. Estas alterações observadas nos diversos tipos de tumores estudados têm sido extensivamente documentadas (Guidi et al., 1997; Gilead e Neeman, 1999; Tarin, 2011). Foi inesperado, no entanto que diferentes tumores induzissem diferentes graus de vascularização na interface tumor/pele. O tumor de cólon induziu mais vasos no tecido cutâneo adjacente aos tumores. Este tumor também produziu mais CCL2 do que melanoma ou o tumor mamário e isto pode, pelo menos em parte, explicar a diferença no número de vasos na pele adjacente ao tecido do tumoral. A CCL2 está envolvida em ambos angiogênese e progressão de tumores (Janakiram et al., 2011; Kolattukudy e Niu, 2012). Não foi encontrado qualquer estudo que determinou comparativamente os níveis desta citocina em diferentes tipos de tumores.

O tumor mamário apresentou o mais proeminente conteúdo inflamatório, avaliado por uma série de marcadores (enzimas inflamatórias, níveis nitrito e citocinas). A detecção da atividade das enzimas MPO e NAG em fluidos biológicos juntamente com os níveis de cito/quimiocinas inflamatórias podem ser utilizados com marcadores do acúmulo e/ou atividade de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, em uma variedade de tecidos de ratos e camundongos, incluindo tumores e implantes de esponja (Baley, 1988; Carollo et al., 2001; Marques et al., 2011; Mendes et al., 2007; Teixeira et al., 1999). De forma similar, a quantificação do óxido nítrico indiretamente por meio seu metabólito estável o nitrito, revela a participação do gás em processos tumorais (Moncada e Higgs, 2006a; Moncada e Higgs, 2006b; Yasuda, 2008).

Nossos resultados estão, em parte, de acordo com aqueles relatados por Hwang et al., 1998, em que foi demonstrado que o padrão de expressão da forma induzida da ciclooxygenase (um marcador inflamatório), em tecidos de tumor de mama foi quantitativamente diferente do encontrado em tecidos de tumor do cólon. Não encontramos outros estudos que tenham avaliado comparativamente a presença destes marcadores em diferentes tipos de tumores.

O índice vascular, determinado pela quantidade intra-tumoral de hemoglobina e número de vasos (imunohistoquímica para CD31) nas áreas de *hot spot* dos tumores, o melanoma foi o tumor mais potente em induzir a angiogênese (aproximadamente 2 vezes). É possível que a vascularização mais intensa tenha colaborado para o desenvolvimento mais rápido deste, quando comparado com tumor de cólon ou mama. A medida da vascularização levando-se em consideração as regiões de maior densidade de vasos sanguíneos (*hot spots*) foi proposta por Weidner et al., 1992 e tem sido usada como indicador de angiogênese tumoral. A neoformação vascular tem sido considerada relevante no desenvolvimento de tumores, uma vez que a transformação de células malignas e a progressão tumoral resultante da acumulação de várias mutações no DNA celular, não são suficiente para dar origem a um tumor clinicamente relevante (Hanahan e Weinberg, 2000). Na falta de angiogênese, a massa do tumor se estabiliza em um volume de poucos milímetros cúbicos como resultado de um equilíbrio entre a proliferação celular e apoptose (Folkman, 1995; Holmgren et. al., 1995). Além disso, os vasos tumorais favorecem o “escape” das células tumorais para a circulação

sanguínea, o que constitui o passo principal da disseminação metastática (Zetter, 1998; Fidler, 2000).

Outra diferença marcante entre essas neoplasias foi o nível plasmático mais elevado de VEGF em camundongos portadores do tumor 4T1 em comparação com os dois outros tumores, mas os níveis sistêmicos de TNF- $\alpha$  não foram diferentes entre os grupos avaliados. Níveis sistêmicos elevados de citocinas, mediadores pró-inflamatórios e fatores pró-angiogênicos têm sido bem documentados e associados com muitas condições patológicas, incluindo tumores malignos (Abe et al., 1994, Kong et al., 2010). No entanto, não encontramos nenhum trabalho no qual, níveis circulantes diferenciais das citocinas (VEGF e TNF- $\alpha$ ) tenham sido determinados em animais portadores de vários tipos de tumores. Nossos resultados estão de acordo com o acúmulo de evidências mostrando que a angiogênese e a inflamação, em conjunto com citocinas chave de ambos os processos, são importantes não apenas para o desenvolvimento de tumores sólidos, incluindo os que estudamos, mas também para o estabelecimento de um microambiente local fértil para o crescimento do tumor (Ellis et al., 2000; Mahabeleshwar e Byzova, 2007; Baumgarten e Frasar, 2012; Dunn et al., 2012; Mackey et al., 2012; Oshima e Oshima, 2012). Os fatores de crescimento e citocinas produzidas pelos diferentes tipos de tumores avaliados neste estudo (VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e CCL2) estão envolvidos no crescimento da maioria das malignidades (Ellis et al., 2000; Baumgarten e Frasar 2012; Dunn et al., 2012; Wu e Zhou, 2010), evidenciando e confirmando a contribuição destas moléculas no desenvolvimento de tumores sólidos. Embora estes processos (inflamação, angiogênese, produção de citocinas e interação hospedeiro-tumor) sejam

características comuns de quase, se não todos os tumores, não encontramos uma análise sistemática comparando esses parâmetros simultaneamente em diferentes tipos de tumores experimentais. Nossos resultados podem fornecer uma abordagem diferencial para classificar tumores com base no grau inflamatório e/ou angiogênico que, por sua vez, poderia ter benefício clínico no tratamento do câncer. Pode ser necessário, no âmbito do nosso estudo salientar que diferentes linhagens de camundongos diferem na sua resposta a estímulos angiogênicos e inflamatórios e nas taxas que se desenvolvem certos tipos de tumores (Harvey et al., 1993; Marques et al., 2011). No entanto, nós utilizamos duas linhagens de células tumorais (CT26.WT e 4T1) na mesma linhagem de camundongos (Balb/c), e detectamos diferenças acentuadas no ritmo de desenvolvimento e nos níveis de marcadores inflamatórios entre estes tumores. Assim, é provável que os próprios tumores e não o *background* genético tenham determinado estas diferenças. Além disso, as células tumorais CT26.WT, mas não as do B16F10 (tumor mais angiogênico), induziram uma vascularização mais intensa na pele adjacente ao tumor, indicando que a linhagem de células do tumor, e não a heterogeneidade genética, pode ter influenciado o grau de vascularização tanto no interior da massa tumoral quanto no tecido adjacente. Na primeira série de experimentos relatados neste estudo foram avaliados comparativamente os efeitos da mesma quantidade de diferentes tipos de células tumorais na sua capacidade para induzir o crescimento do tumor e os principais componentes de seu desenvolvimento (inflamação, neovascularização e produção citocinas). Fica claro, a partir de nossos resultados que cada tumor apresentou uma característica dominante, assim, o melanoma foi visto como o mais angiogênico, enquanto o processo



inflamatório foi dominante no tumor mamário. É também claro que local e sistemicamente os tumores impactaram o organismo hospedeiro de modo diferente. Tais discrepâncias no grau inflamatório e angiogênico de cada tumor podem ser determinantes no seu crescimento e poderia fornecer novas perspectivas para uma abordagem terapêutica diferencial direcionada, com base no status de biomarcadores tumorais.

Após a caracterização de intensidades diferenciais quanto ao desenvolvimento e características do estroma (marcadores inflamatórios e angiogênicos e a produção de citocinas) entre tumores murinos distintos, investigamos o efeito do processo inflamatório agudo e crônico na progressão do tumor mamário 4T1.

Como já mencionado, há contundentes evidências de que a inflamação inicia/exacerba o desenvolvimento de 15 a 20% de todas as malignidades (Kuper et al., 2000a; Kuper et al., 2000b, Ono 2008). Evidências adicionais, como a presença de células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e mastócitos) e seus produtos em tumores, e uma série de estudos que mostram que muitas doenças malignas surgem a partir de áreas de infecção e de inflamação confirmam a relação direta e/ou dependência entre os dois processos (Mantovani et al., 2008; Coussens e Werb, 2002; Balkwill, 2001). Uma das estratégias experimentais utilizadas para testar a hipótese da associação entre inflamação e tumorigênese tem sido o co-cultivo in vitro ou in vivo das duas populações celulares (inflamatórias e tumorais). Nos estudos in vivo, a indução de um processo inflamatório, por meio de implantes sintéticos, tem sido uma estratégia experimental utilizada para o estudo desta associação

(Andrade et al., 1992; Buttery et al., 1993; Brand et al., 1977; Brand et al., 1975; Tazawa et al., 2003; Tazawa et al., 2007).

Faltam, no entanto, informações sobre a influência da inflamação aguda versus o ambiente inflamado cronicamente e o desenvolvimento de tumores sólidos e se ambos os processos inflamatórios poderiam alterar o padrão dos principais componentes do tecido tumoral (angiogênese, recrutamento/ativação de células inflamatórias na produção de citocinas). Neste estudo, demonstramos que a inoculação de células de tumor 4T1 ( $1 \times 10^6$ ) na matriz de esponja poliéster-poliuretano implantada subcutaneamente 24 horas ou 10 dias, induziu o desenvolvimento de tumores que diferiram daqueles no quais as células tumorais foram inoculadas no espaço subcutâneo dos animais na ausência da esponja. Observou-se que a implantação subcutânea da matriz de poliéster poliuretano induziu a infiltração de leucócitos nos dois momentos avaliados, confirmando achados anteriores de nosso grupo e outros (Campos et al., 2011; Marques et al., 2011). A avaliação por citometria de fluxo do perfil das células inflamatórias de implantes de 24 horas e 10 dias foram caracterizadas pela primeira vez neste estudo. Observamos que em implantes de 24 horas o tipo de célula predominante foram neutrófilos (42,53% +/- 8,45) e monócitos (37,53% +/- 7,48), ao passo que em implantes de 10 dias de idade a população de leucócitos foi caracterizada principalmente por macrófagos (37,10% +/- 4,54), linfócitos (28,1% +/- 4,77) e monócitos (22,33% +/- 3,05). Ambos os perfis são característicos de inflamação aguda e crônica, respectivamente, e claramente contribuíram para o crescimento diferencial do tumor mamário. Assim, a maioria dos parâmetros avaliados (crescimento do tumor, a actividade de NAG, de VEGF, a produção de TNF- $\alpha$ ) foram maiores nos grupos de tumor

onde a matriz sintética promoveu a inflamação previamente em comparação com tumores cultivados no espaço subcutâneo, sem o apoio inflamatório adicional a partir da esponja. Nossos resultados são consistentes com relatos anteriores mostrando que o implante de células tumorais em ambientes inflamados potencializa e/ou modifica algumas características das células malignas. Por exemplo, quando as células tumorais QR32 (um clone fracamente tumorigênico) foram co-implantadas com uma esponja de gelatina, essas células adquiriram uma capacidade metastática e tumorigenicidade aumentada (Okada et al., 1992; Tazawa et al., 2003). A iniciação e o desenvolvimento de sarcoma foram também decorrentes da presença de corpos estranhos implantados em camundongos (Kirkpatrick et al., 2000; Tazawa et al., 2007). O aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), um marcador inflamatório, foi maior em tumores que foram desenvolvidos em uma matriz de esponja implantada subcutaneamente em comparação com os implantes onde não houve inoculação de células tumorais, sugerindo uma associação entre a tumorigênese e inflamação (Buttery et al., 1993). O fato de que o tumor mamário foi 2 vezes maior quando as células 4T1 foram inoculadas em implantes de 10 dias de idade em comparação ao tamanho do tumor cultivado no ambiente inflamatório agudo, pode ser explicado pelo fato de que em implantes de 10 dias já existe um tecido fibrovascular altamente vascularizado o que facilitaria o crescimento do tumor. Estes resultados estão de acordo com a importância, bem estabelecida, da angiogênese para o desenvolvimento de tumores (Folkman 2003, Albini et al. 2012). Os níveis da citocina pró-angiogênica, VEGF e da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , foram nitidamente influenciados por ambos os processos

inflamatórios. Assim, o VEGF e TNF- $\alpha$  foram mais pronunciados quando as células 4T1 foram inoculadas em implantes de 10 dias de idade, em comparação com os tumores inoculados em implantes de 24h. Por sua vez, os tumores inoculados no espaço subcutâneo, sem o apoio inflamatório adicional da esponja foram menores e houve menores níveis de citocinas, exceto CCL2. Nossos resultados estão de acordo com o conceito de que neutrófilos contribuem para tumorigênese. Weitzman et al., 1985 demonstraram que a linhagem de células de fibroblastos C3H se tornou tumorigênica formando tumores em camundongos *nude* após co-cultura com neutrófilos. Outros pesquisadores também confirmaram o papel dos neutrófilos na conversão tumorigênica e na transformação fenotípica de benigno para maligno (Ishikawa et al., 1987; Tazawa et al., 2003; Rymaszewski et al., 2014). Curiosamente, o tumor sozinho produziu mais CCL2 local e sistemicamente. Tem sido relatado que a produção de CCL2 constitutivamente ou em resposta a estímulos inflamatórios por células 4T1 é responsável para a iniciação e progressão do tumor 4T1 (Yoshimura et al., 2013). No entanto, a produção sistêmica de VEGF e TNF- $\alpha$  foi mais pronunciada em animais portadores de tumores quando as células 4T1 foram inoculadas nos implantes de esponja. É possível que tanto as células tumorais quanto as células inflamatórias tenham atuado sinergicamente produzindo as citocinas que, por sua vez amplificaram a proliferação neoplásica. De fato, ambos VEGF e TNF- $\alpha$  são parte de um repertório de moléculas responsáveis por uma série de eventos envolvidos na progressão do tumor (angiogênese, recrutamento de macrófagos, proliferação de metástases) (Germano et al. 2008).

O perfil celular do carcinoma mamário murino 4T1 é composto por um infiltrado de células mielóides mista consistido de um aumento progressivo de células hematopoiéticas CD45 positivas e de células mielóides CD11 positivas (DuPré et al., 2007; DuPré et al., 2008), entretanto não foi determinado se o ambiente inflamatório dos implantes altera esse perfil. Experimentos futuros podem abordar esta questão através da análise do fenótipo de células 4T1 expostas às populações distintas de células inflamatórias.

Na série de experimentos que avaliaram o efeito da inflamação aguda e crônica no desenvolvimento do tumor mamário murino, fica claro que ambos os processos inflamatórios potenciaram o desenvolvimento tumor. No entanto, a inflamação crônica foi mais eficaz do que a inflamação aguda na indução de VEGF e TNF- $\alpha$  e a progressão do tumor.

O conjunto de dados apresentados neste estudo mostraram que tipos distintos de tumores apresentam crescimento e componentes inflamatórios e angiogênicos diferenciais quanto à intensidade dos processos avaliados e que a inflamação crônica foi mais eficaz para o desenvolvimento do tumor mamário do que a inflamação aguda. É possível especular que estes resultados possam ter contribuído para elucidar a participação da inflamação e angiogênese na progressão tumoral, levantando a possibilidade de uma abordagem terapêutica para o câncer com base na intensidade destes marcadores tumorais.

## 7. CONCLUSÕES

As abordagens experimentais utilizadas foram capazes de mostrar que tumores murinos de origens distintas possuem diferentes intensidades de processos inflamatórios e angiogênicos.

A avaliação comparativa dos efeitos da mesma quantidade de diferentes tipos de células tumorais na sua capacidade para induzir o crescimento do tumor e os principais componentes de seu desenvolvimento (inflamação, neovascularização e produção citocinas) mostrou que cada tumor apresentou uma característica dominante, assim, o melanoma foi visto como o mais angiogênico, enquanto o processo inflamatório foi dominante no tumor mamário.

A intensidade da angiogênese cutânea (adjacente ao tumor) e o nível de produção de citocinas sistêmicas foram também dependentes do tipo tumoral. Tais discrepâncias no grau inflamatório e angiogênico de cada tumor podem ser determinantes no seu crescimento e poderia fornecer novas perspectivas para uma abordagem terapêutica diferencial direcionada, com base no status de biomarcadores tumorais.

A co-implantação de matrizes sintéticas e células tumorais, utilizada para avaliar a associação entre inflamação e tumorigênese, permitiu mostrar que a inflamação crônica foi mais eficaz do que a inflamação aguda na indução de VEGF e TNF- $\alpha$  e a progressão do tumor mamário.

A caracterização de componente/s dominante/s em neoplasias de origens distintas e a contribuição da inflamação para o desenvolvimento tumoral

poderão oferecer novas abordagens terapêuticas baseadas nas características dominantes de cada tumor.

## 8. REFERÊNCIAS

Abe, Y., et al., 1994. The role of tumor necrosis factor receptors in cell signaling and the significance of soluble form levels in the serum. *Surg Today*. 24, 197-202.

Albini, A., Tosetti, F., Li, V.W., Noonan, D.M., Li, W.W. 2012. Cancer prevention by targeting angiogenesis. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 498-09.

Al-Lamki, R. S., et al., 2010. Tumor necrosis factor receptor expression and signaling in renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 177, 943-54.

Alonso, S. R., et al., 2004. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol*. 164, 193-203.

Andrade, S. P., et al., 1992. Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature. *Br J Pharmacol*. 107, 1092-5.

Andrade, S. P., et al., 1997. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvasc Res*. 54, 253-61.

Aslakson, C. J., Miller, F. R., 1992. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res*. 52, 1399-405.



Bailey, P. J., 1988. Sponge implants as models. *Methods Enzymol.* 162, 327-34.

Balkwill, F. R., Mantovani, A., 2012. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin Cancer Biol.* 22, 33-40.

Balkwill, F., 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 9, 361-71.

Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 357, 539-45.

Barcelos, L. S., et al., 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol.* 78, 352-8.

Baumgarten, S. C., Frasor, J., 2012. Minireview: Inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. *Mol Endocrinol.* 26, 360-71.

Belo, A. V., et al., 2005. Murine chemokine CXCL2/KC is a surrogate marker for angiogenic activity in the inflammatory granulation tissue. *Microcirculation.* 12, 597-606.

Bradshaw, A. D., et al., 2001. Increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges in SPARC-null mice. *Wound Repair Regen.* 9, 522-30.

Brand KG, Buoen LC, Brand I. 1975. Foreign-body tumorigenesis induced by glass and smooth and rough plastic. Comparative study of preneoplastic events. *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 319-322.

Drabkin, D.L., Austin, J.H., 1932. Spectrophotometric constants common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *J. Biol. Chem.* 98, 719–733.

Brand, I., et al., 1977. Foreign-body tumors of mice: strain and sex differences in latency and incidence. *J Natl Cancer Inst.* 58, 1443-7.

Brand, K. G., et al., 1975. Foreign-body tumorigenesis by vinyl chloride vinyl acetate copolymer: no evidence for chemical cocarcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 54, 1259-62.

Buttery, L. D., et al., 1993. Induction of nitric oxide synthase in the neovasculature of experimental tumours in mice. *J Pathol.* 171, 311-9.

Campos, P. P., et al., 2006. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histol Histopathol.* 21, 1263-70.

Campos, P. P., et al., 2011. Alterations in the dynamics of inflammation, proliferation and apoptosis in subcutaneous implants of lupus-prone mice. *Histol Histopathol.* 26, 433-42.

Carmeliet, P., Jain, R. K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 473, 298-307.

Carollo, M., et al., 2001. Analysis of the temporal expression of chemokines and chemokine receptors during experimental granulomatous inflammation: role and expression of MIP-1alpha and MCP-1. *Br J Pharmacol.* 134, 1166-79.

Castro, P. R., et al., 2012. Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. *Microvasc Res.* 84, 9-15.

Chanmee, T., et al., 2014. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel).* 6, 1670-90.

Correa, M., et al., 2005. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. *Int J Cancer.* 114, 356-63.

Coussens, L. M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature.* 420, 860-7.

Das Thakur M, Pryer NK, Singh M. 2014. Mouse tumour models to guide drug development and identify resistance mechanisms. *J Pathol* 232(2):103-11.

Dexter, D. L., et al., 1978. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 38, 3174-81.

Dunn, J. H., et al., 2012. Inflammasomes as molecular mediators of inflammation and cancer: potential role in melanoma. *Cancer Lett.* 314, 24-33.

DuPre, S. A., et al., 2008. Microenvironment of the murine mammary carcinoma 4T1: endogenous IFN-gamma affects tumor phenotype, growth, and metastasis. *Exp Mol Pathol.* 85, 174-88.

DuPre, S. A., Hunter, K. W., Jr., 2007. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol.* 82, 12-24.

Ellis, L. M., et al., 2000. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist*. 5 Suppl 1, 11-5.

Ferreira, M. A., et al., 2004. Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). *Br J Pharmacol*. 141, 1185-92.

Fidler, I. J., 1975. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res*. 35, 218-24.

Fidler, I. J., 2000. Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J*. 6 Suppl 2, S134-41.

Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.

Folkman, J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 285, 1182-6.

Folkman, J., 2003. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*. 3, 643-51.

Folkman, J. 2006. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res*. 312,594-07.

Frese, K.K., Tuveson, D.A. 2007. Maximizing mouse cancer models. *Nat. Rev. Cancer* 7, 645–658

Fukumura, D., Jain, R. K., 2007. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc Res*. 74, 72-84.

Galdiero, M. R., et al., 2013. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 218, 1402-10.

Germano, M. P., et al., 2008. Anti-ulcer, anti-inflammatory and antioxidant activities of the n-butanol fraction from *Pteleopsis suberosa* stem bark. *J Ethnopharmacol*. 115, 271-5.

Ghoneum, M., et al., 2008. *S. cerevisiae* induces apoptosis in human metastatic breast cancer cells by altering intracellular  $Ca^{2+}$  and the ratio of Bax and Bcl-2. *Int J Oncol*. 33, 533-9.

Gilead, A., Neeman, M., 1999. Dynamic remodeling of the vascular bed precedes tumor growth: MLS ovarian carcinoma spheroids implanted in nude mice. *Neoplasia*. 1, 226-30.

Goodson, A. G., Grossman, D., 2009. Strategies for early melanoma detection: Approaches to the patient with nevi. *J Am Acad Dermatol*. 60, 719-35; quiz 736-8.

Green, L. C., et al., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}N$ ]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 126, 131-8.

Grindlay, J. H., Waugh, J. M., 1951. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. *AMA Arch Surg*. 63, 288-97.

Guasch, G., et al., 2007. Loss of TGFbeta signaling destabilizes homeostasis and promotes squamous cell carcinomas in stratified epithelia. *Cancer Cell*. 12, 313-27.

Guidi, A. J., et al., 1997. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer*. 80, 1945-53.

Guiducci, C., et al., 2004. Intralesional injection of adenovirus encoding CC chemokine ligand 16 inhibits mammary tumor growth and prevents metastatic-induced death after surgical removal of the treated primary tumor. *J Immunol*. 172, 4026-36.

Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100, 57-70.

Harvey, M., et al., 1993. Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB J*. 7, 938-43.

Heppner, G. H., et al., 2000. Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2, 331-4.

Higgs, B. W., et al., 2006. Spectral embedding finds meaningful (relevant) structure in image and microarray data. *BMC Bioinformatics*. 7, 74.

Holmgren, L., et al., 1995. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*. 1, 149-53.

Hussain, S. P., Harris, C. C., 2007. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*. 121, 2373-80.

Hussain, S.P., Hofseth, L.J., Harris, C.C. 2003. Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 3, 276-285.

Hwang, D., et al., 1998. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 90, 455-60.

Ishikawa, M., et al., 1987. Changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cells treated with quercetin or 5-azacytidine. *Int J Cancer.* 39, 338-42.

Janakiram, N. B., et al., 2011. Role of lipoxins, resolvins, and other bioactive lipids in colon and pancreatic cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 30, 507-23.

Kirkpatrick, C. J., et al., 2000. Biomaterial-induced sarcoma: A novel model to study preneoplastic change. *Am J Pathol.* 156, 1455-67.

Kolattukudy, P. E., Niu, J., 2012. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. *Circ Res.* 110, 174-89.

Kong, B., et al., 2010. Surgical procedure as an inducer of tumor angiogenesis. *Exp Oncol.* 32, 186-9.

Kuper, H. E., et al., 2000. Hepatitis B and C viruses in the etiology of hepatocellular carcinoma; a study in Greece using third-generation assays. *Cancer Causes Control.* 11, 171-5.

Kuper, H., et al., 2000. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med.* 248, 171-83.

Lage, A. P., Andrade, S. P., 2000. Assessment of angiogenesis and tumor growth in conscious mice by a fluorimetric method. *Microvasc Res.* 59, 278-85.

Landskron, G., et al., 2014. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014, 149185.

Lee, H. W., et al., 2013. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. *Biochim Biophys Acta.* 1835, 170-9.

Li, B., Vincent, A., Cates J., Brantley-Sieders, D.M, Polk D.B., Young, P.P., 2009. Low levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  increase tumor growth by inducing an endothelial phenotype of monocytes recruited to the tumor site. *Cancer Res.* 67,585-592.

Liotta, L. A., Kohn, E. C., 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 411, 375-9.

Lozupone, F., et al., 2000. Murine granulocytes control human tumor growth in SCID mice. *Int J Cancer.* 87, 569-73.

Mackey, J. R., et al., 2012. Controlling angiogenesis in breast cancer: a systematic review of anti-angiogenic trials. *Cancer Treat Rev.* 38, 673-88.

Maeda, K., et al., 1995. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br. J. Cancer* 72, 319–323.

Mahabeleshwar, G. H., Byzova, T. V., 2007. Angiogenesis in melanoma. *Semin Oncol.* 34, 555-65.

Mantovani, A., et al., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature.* 454, 436-44.

Marques, S. M., et al., 2011. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvasc Res.* 82, 246-52.



Mbeunkui, F., Johann, D. J., Jr., 2009. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol.* 63, 571-82.

Mendes, J. B., et al., 2007. Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 83, 408-15.

Moncada, S., Higgs, E. A., 2006a. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1, S193-201.

Moncada, S., Higgs, E. A., 2006b. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 213-54.

Okada, F., et al., 1992. Malignant progression of a mouse fibrosarcoma by host cells reactive to a foreign body (gelatin sponge). *Br J Cancer.* 66, 635-9.

Ono, M., 2008. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci.* 99, 1501-6.

Oshima, H., Oshima, M., 2012. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. *J Gastroenterol.* 47, 97-106.

Ostberg, J. R., et al., 2005. An important role for granulocytes in the thermal regulation of colon tumor growth. *Immunol Invest.* 34, 259-72.

Plunkett, M. L., Hailey, J. A., 1990. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. *Lab Invest.* 62, 510-7.

Rymaszewski, A. L., et al., 2014. The role of neutrophil myeloperoxidase in models of lung tumor development. *Cancers (Basel)*. 6, 1111-27.

Tarin, D., 2011. Cell and tissue interactions in carcinogenesis and metastasis and their clinical significance. *Semin Cancer Biol*. 21, 72-82.

Tarin, D., 2012. Clinical and biological implications of the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*. 5, 95-112.

Tazawa, H., et al., 2003. Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol*. 163, 2221-32.

Tazawa, H., et al., 2007. Oxidative and nitrative stress caused by subcutaneous implantation of a foreign body accelerates sarcoma development in Trp53+/- mice. *Carcinogenesis*. 28, 191-8.

Teixeira, A. S., et al., 1999. Aminoguanidine prevents impaired healing and deficient angiogenesis in diabetic rats. *Inflammation*. 23, 569-81.

Tsuro, T., et al., 1983. Characterization of metastatic clones derived from a metastatic variant of mouse colon adenocarcinoma. *Cancer Res*. 43, 5437–5442.

van Kempen, L. C., et al., 2003. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *Eur J Cell Biol*. 82, 539-48.

Viana, C. T., et al., 2013. Distinct types of tumors exhibit differential grade of inflammation and angiogenesis in mice. *Microvasc Res*. 86, 44-51.

Wang, M., et al., 1995. Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen. *J Immunol.* 154, 4685-92.

Waters, W. F., 2001. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. *J Community Health.* 26, 79-92.

Weidner, N., et al., 1991. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 324, 1-8.

Weidner, N., et al., 1991. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 324, 1-8.

Weis, S. M., Cheresh, D. A., 2011. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med.* 17, 1359-70.

Weitzman, S. A., et al., 1985. Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science.* 227, 1231-3.

Woessner, J. F., Jr., Boucek, R. J., 1959. Enzyme activities of rat connective tissue obtained from subcutaneously implanted polyvinyl sponge. *J Biol Chem.* 234, 3296-300.

Wu, Y., Zhou, B. P., 2010. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer.* 102, 639-44.

Yasuda, H., et al., 2009. NO-mediated cytotoxicity contributes to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes but not to NOD diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 83, 200-7.

Yoshimura, T., et al., 2013. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 produced by stromal cells promotes lung metastasis of 4T1 murine breast cancer cells. PLoS One. 8, e58791.

Zamarron, B. F., Chen, W., 2011. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. Int J Biol Sci. 7, 651-8.

Zetter, B. R., 2008. The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research. Nat Rev Cancer. 8, 647-54.

# ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 45 / 2014, relativo ao projeto intitulado “ AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E PERFIL INFLAMATÓRIO E ANGIOGÊNICO DE DIFERENTES TIPOS DE TUMORES EXPERIMENTAIS MURINOS”, que tem como responsável Silvia Passos Andrade, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 10/06/2014. Este certificado espira-se em 10/06/2019.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 45 / 2014, related to the Project entitled “EVALUATION OF DEVELOPMENT AND OF INFLAMMATORY PROFILE AND ANGIOGENIC OF DIFFERENT TYPES OF TUMORS EXPERIMENTAL MURINE”, under the supervision of Silvia Passos Andrade, is in agreement with the Ethical principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 10/06/2014. This certificate expires in 10/06/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite

Coordenador CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 10/06/2014.

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)



## Distinct types of tumors exhibit differential grade of inflammation and angiogenesis in mice

C.T.R. Viana<sup>a</sup>, P.P. Campos<sup>b</sup>, L.A. Carvalho<sup>a</sup>, J.M. Cenedezi<sup>a</sup>, L. Lavall<sup>a</sup>, M.T.P. Lopes<sup>c</sup>,  
M.A.N.D. Ferreira<sup>b</sup>, S.P. Andrade<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences/Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627 – Pampulha, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences/Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627 – Pampulha, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences/Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627 – Pampulha, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 6 December 2012

Available online 16 December 2012

### ABSTRACT

Inflammation, angiogenesis and cytokine production are common features of almost, if not all tumors. However, the extent of these processes induced by different types of tumors has not been evaluated. We investigated the growth pattern of the experimental metastatic tumors, B16F10 melanoma, CT26.WT colon and 4T1 mammary cells inoculated in the flank of syngeneic mice and determined the degree of inflammation, angiogenesis, and production level of pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines within the tumors. In addition, we have analyzed vascular changes in the interface between the tumors and the adjacent cutaneous tissue and levels of relevant pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines systemically. The weight of tumors 15 days post-inoculation of  $10^6$  cells was markedly different. Melanomas were 2 and 10-fold heavier than colon and mammary tumors, respectively. Locally, CT26.WT tumor cells induced more vessels in cutaneous tissue adjacent to the tumors but systemically, the plasma levels of VEGF were higher (approximately 2-fold) in 4T1 tumor-bearing mice compared with the other two tumors. Mammary tumors presented the most prominent inflammatory content as assessed by a range of markers (inflammatory enzymes and cytokines). The vascular index, as determined by the intra-tumor amount of hemoglobin and number of vessels in hot spot areas, was also higher (approximately 2-fold) in melanomas compared with the other two tumors. These findings showing that distinct tumor types determine differential grade of inflammation, angiogenesis and host interaction in mice may provide new insights to tailor differential therapeutic approach based on the status of tumor biomarkers.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Inflammation, angiogenesis and a large array of cytokines are co-existent components of tumor microenvironment acting in concert for the progression of the malignancy (Albini et al., 2012; Folkman, 2003; Fukumura and Jain, 2007). Supporting cells and molecules from local host microenvironment interacts actively with the tumor mass favoring migration, proliferation and invasion of the malignant cells. The notion of inflammation-associated carcinogenesis in tumors is widely recognized since persistent inflammatory processes due to parasites, viruses, and bacterial infections are well known examples of the association between inflammation and carcinogenesis. Further support for this notion comes from the fact that the inflammatory microenvironment of tumors is characterized by the presence of

macrophages, neutrophils, eosinophils and mast cells, all of which produce an assorted array of cytokines, inflammatory mediators, reactive oxygen species and other molecules, within the tumors (Balkwill and Mantovani, 2001; Negus et al., 1997). Similarly, the formation of blood vessels is also a pre-requisite for tumor development by providing nourishment for the fast proliferating malignant tissue. The newly formed vasculature also produces growth factors and matrix proteins that in turn further stimulate the tumor cells (Folkman, 2003; Rak et al., 1994). Direct evidence of the contribution of angiogenesis to tumor growth has been identified. For example, it has been reported that tumors vary in their ability to become angiogenic after a period of dormancy (Naumov et al., 2006). Additionally, they differ in their ability to produce metastasis and pro- and anti-angiogenic factors (Burke et al., 1996; Naumov et al., 2006). The absence of tumor angiogenesis prevents tumor mass expansion resulting in an asymptomatic and non metastatic state (Albini et al., 2012; Naumov et al., 2006).

In addition, a range of cytokines, chemokines and growth factors released by tumors cells, and other cell types within the tumor

\* Corresponding author at: Av. Antônio Carlos, 6627, CAMPUS – Pampulha, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. Fax: +55 31 3409 2924.

E-mail address: [andrades@icb.ufmg.br](mailto:andrades@icb.ufmg.br) (S.P. Andrade).

microenvironment are thought to contribute to many features of tumor growth and spread, such as proliferation, neovascularization, extracellular matrix deposition, host cell infiltration (Balkwill, 1994; Kerbel and Folkman, 2002). Many cytokines and chemokines (VEGF, TNF- $\alpha$ , MCP-1) are inducible by hypoxia, a major difference between tumor and normal tissue (Koong et al., 2000). Although these components (inflammation, angiogenesis and cytokine production) are common features of almost, if not all tumors, much of the knowledge of these features in tumors has been built upon studies that identified these processes in a particular type of tumor at a time. Thus, it has not been possible to compare the extent/degree of these processes in different types of tumors. Our aims were to identify the pattern of these processes in tumors of differing origin simultaneously and to characterize the influence of the tumors locally (cutaneous tissue) and systemically (cytokine levels). This information is likely to be relevant to direct therapy to the most dominant feature of the tumors. To test our hypothesis we investigated the growth pattern of the experimental metastatic tumors, B16F10 melanoma, CT26.WT colon and 4T1 mammary cells together with the degree of inflammation, angiogenesis, and production level of pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines within the tumors. In addition, we have analyzed vascular changes in the interface between the tumors and the adjacent cutaneous tissue and levels of relevant pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines systemically.

## Material and methods

### Tumor cells, experimental tumor inoculation and measurement

The tumor cells chosen were B16F10 (melanoma), CT26.WT (colon carcinoma) and 4T1 (tumor mammary gland (American Type Culture Collection, Manassas, VA)). B16F10 were derived clones from spontaneous malignant melanoma (Fidler and Kripke, 1977). The colon CT26 cells were derived from a carcinogen-induced colon adenocarcinoma (Tsuru et al., 1983) and, then cloned to generate CT26.WT (Wang et al., 1995). Line 4T1 is a thioguanine-resistant variant that was selected from 410.4 without mutagen treatment (Aslakson and Miller, 1992). Cells were maintained in RPMI 1640 medium (Hyclone, Logan, UT) containing 10% FBS, at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Once confluent the monolayer was harvested by incubation for 2 min with trypsin/EDTA; ethylenediaminetetra-acetic acid (0.025% and 0.02 w/v, respectively). The dislodged cells were centrifuged for 10 min and adjusted to the appropriate concentration in saline; 100  $\mu$ l of the cell suspension ( $1 \times 10^6$  cells) were injected in the right posterior flank of syngeneic mice. A Vernier caliper was used to collect tumor size data that was plugged into the following formula: TV (mm<sup>3</sup>) = 0.52 AB<sup>2</sup>, where A is the minor axis and B is the major axis (Ghoneum et al., 2008).

Forty male Balb/c mice (6 weeks, 20 g weight) divided into two groups of twenty animals received either 4T1 cells or colon 26 cells. B16F10 cells were inoculated in male C57/Bl6 mice. All animals were provided by the Animal Facility Center – Institute of Biological Science – Federal University of Minas Gerais; Belo Horizonte – Brazil. Housing, anesthesia and care were provided according to guidelines established by local Institutional Animal Welfare Committee. At 15 days post inoculation, animals were anesthetized for blood sample collection. Necropsy was performed after death and removal of tumors from all animals for assessment of angiogenesis, inflammation, cytokine production and histopathological analysis.

### Hemoglobin extraction

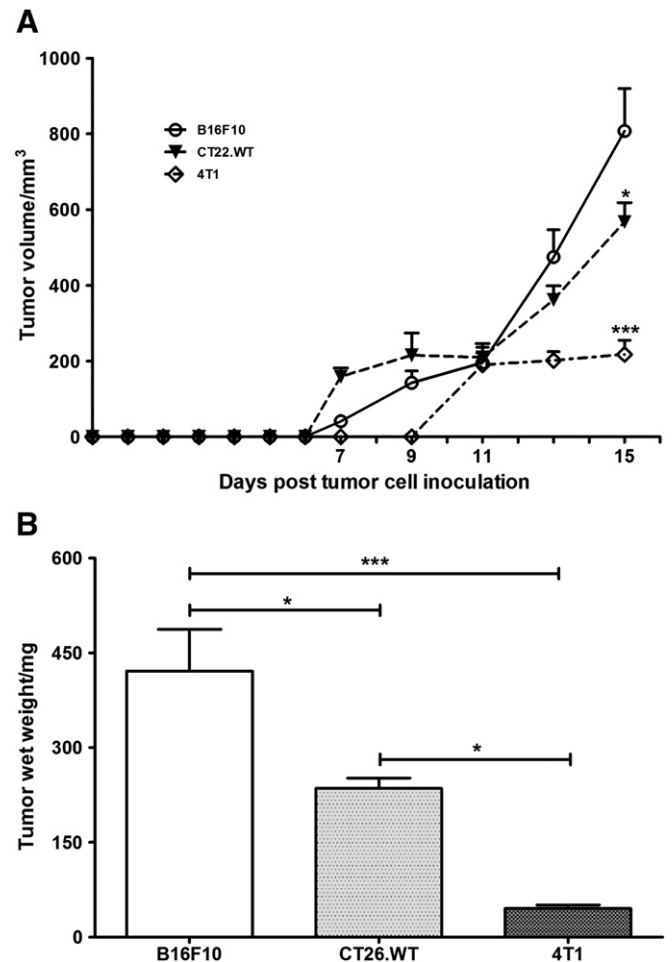
The extent of the vascularization of the tumors was assessed by the amount of hemoglobin (Hb) detected in the tissue using the Drabkin method (Drabkin and Austin, 1932). Each tumor was homogenized Ultra – Turrax, (Schlappmuhler, Usingen, Germany) in 5 ml of Drabkin reagent (Labtest, São Paulo, Brazil) and centrifuged

at 10,000 $\times$ g for 40 min. The supernatants were filtered through a 0.22- $\mu$ m Millipore filter (Danvers, MA, USA). The hemoglobin concentration in the samples was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 540 nm using an ELISA plate reader and compared against a standard curve of hemoglobin. The content of hemoglobin in the implant was expressed as  $\mu$ g Hb per mg wet tissue.

### Tissue extraction and determination of myeloperoxidase and N-acetylglucosaminidase activities

The number of neutrophils in the tumors was measured by assaying myeloperoxidase (MPO) activity as previously described (Castro et al., 2012; Marques et al., 2011). The tumors were weighed, homogenized in pH 4.7 buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M NaPO<sub>4</sub>, 0.015 M NaEDTA), centrifuged at 12,000 $\times$ g for 10 min. The pellets were then re-suspended in 0.05 M NaPO<sub>4</sub> buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) followed by three freeze–thaw cycles using liquid nitrogen. MPO activity in the supernatant samples was assayed by measuring the change in absorbance (optical density; OD) at 450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 mM). The reaction was terminated by the addition of 50  $\mu$ l of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 M). Results were expressed as change in OD per g of wet tissue. Results were expressed as change in OD/g wet tissue.

The infiltration of mononuclear cells into the tumors was quantified by measuring the levels of the lysosomal enzyme N-acetylglucosaminidase (NAG) present in high levels in activated



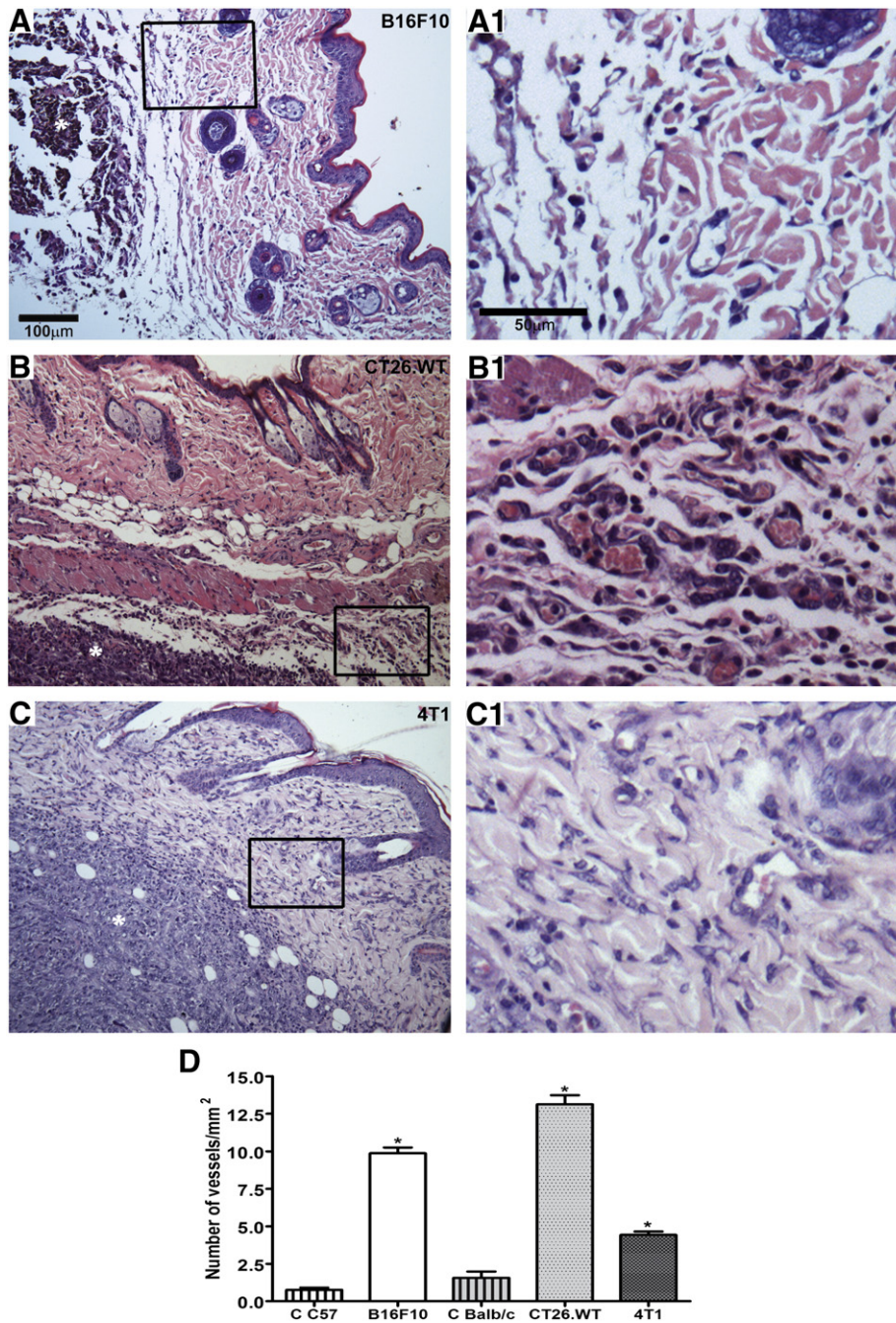
**Fig. 1.** Growth rate (A) and volume (B) of melanoma, colon and mammary tumors. Inoculation of  $10^6$  of different types of tumors induced differential growth. Melanomas grew more compared with colon or mammary tumors. Values are mean  $\pm$  sem of 15–20 animals in each group. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001.



macrophages (Castro et al., 2012; Marques et al., 2011). The tumors were homogenized in NaCl solution (0.9% w/v) containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega, Madison, WI, USA) and centrifuged (3000×g; 10 min at 4 °C). Samples (100 µl) of the resulting supernatant were incubated for 10 min with 100 µl of p-nitrophenyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) prepared in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 4.5) to yield a final concentration of 2.24 mM. The reaction was stopped by the addition of 100 µl of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Hydrolysis of the substrate was determined by measuring the absorption at 400 nm. Results were expressed as nmol/mg wet tissue.

#### Measurement of VEGF, TNF- $\alpha$ , MCP-1 and TGF- $\beta$ 1 production in the tumors

Tumors were homogenized in PBS (1 ml for 100 mg of the tissue) pH 7.4 containing 0.05% Tween and centrifuged at 10,000×g for 30 min. The cytokines VEGF, TNF- $\alpha$ , MCP-1 and TGF- $\beta$ 1, in the supernatant from each tumor were measured in 50 µl of the supernatant using Immunoassay Kits (R and D Systems, USA) and following the manufacturer's protocol. Briefly, dilutions of cell-free supernatants were added in duplicate to ELISA plates coated with a specific murine monoclonal antibody against the cytokine, followed by the addition



**Fig. 2.** Representative histological sections (HE) of the interface melanoma/cutaneous tissue (A), colon tumor/cutaneous tissue (B) and mammary tumor/cutaneous tissue (C). The tumors presented their own phenotype and induced changes in the interface between the tumor and cutaneous tissue. Dispersed collagen fibers, increased number of congested blood vessel and inflammatory infiltrate are seen. The number of vessels was higher in the interface colon tumor/host tissue. Values are means  $\pm$  sem of 15 microscopic fields. \* $p < 0.05$ . Right panel (A1, B1, C1) high magnification of representative areas of each tumor/skin interface showing blood vessels clearer; C = control (number of vessels in skin fragment away from tumor tissue).

of a second horseradish peroxidase-conjugated polyclonal antibody against the cytokine. After washing to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution (50  $\mu$ L of a 1:1 solution of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine 10 mg/ml in DMSO) was added to the wells. The color development was stopped, after 20 min incubation, with 2N sulphuric acid (50  $\mu$ L) and the intensity of the color was measured at 540 nm on a spectrophotometer (E max – Molecular Devices). Standards were 0.5- $\log_{10}$  dilutions of recombinant murine cytokines from 7.5  $\mu$ g  $\text{ml}^{-1}$  to 1000  $\mu$ g  $\text{ml}^{-1}$  (100  $\mu$ L). The results were expressed as pg cytokine per mg wet tissue.

#### Measurement of nitric oxide (NO) production

NO release was evaluated by measuring nitrite levels according to the method described by Green et al. (1982). Tumors removed 15 days post-cell inoculation were weighed and incubated for 15 min at 37 °C with PBS (500  $\mu$ L). The incubation medium (100  $\mu$ L) was mixed with 10  $\mu$ L of Griess reagent (0.1% N-1-naphthylethylenediamine, 1% sulfanilamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and optical density was measured at 540 nm). The amount of nitrite in the incubation media was calculated using sodium nitrite (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, US) as standard.

#### Histological analysis and staining

Tumors (n = 3 for each) and fragments of the skin adjacent to them were excised carefully, and fixed in formalin (10% w/v in isotonic saline). Sections (5  $\mu$ m) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and processed for light-microscopic studies. Microvascular density (MVD) in hot spot areas in tumors was determined in Factor VIII antibody staining (clone A0082, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) according to the method described by Maeda et al. (1995). Tissue sections (5 m) were dewaxed and antigen retrieval was performed in citrate buffer (pH 6), the slides were boiled in citrate buffer for 25 min at 95 °C and then cooled for 1 h in the same buffer. Sections were incubated for 5 min in 3% hydrogen peroxide to quench endogenous tissue peroxidase. Nonspecific binding was blocked by using normal goat serum for 10 min (1:10 in phosphate-buffered saline) with 1% bovine serum albumin (in phosphate-buffered saline). The sections were then immunostained with the antibody (1:40 dilution,) for 60 min at room temperature. After washing in Tris-HCl buffer, sections were incubated for 30 min at room temperature with biotinylated Link Universal Streptavidin-HRP (Dako; Carpinteria, CA, USA). The reactions were revealed by applying 3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution (DAB) (Dako; Carpinteria, CA, USA). The sections were counterstained with hematoxylin and mounted in Permount (Fisher Scientific; NJ, USA).

To perform morphometric analysis, images of cross sections of tumors or tumor/skin interface obtained from 15 fields (8533  $\mu\text{m}^2$ ) were captured with a planapochromatic objective (40 $\times$ ) in light microscopy (final magnification = 400 $\times$ ). The images were digitized through a JVC TK-1270/JCB microcamera and transferred to an analyzer (Kontron Electronics, Carl Zeiss – KS300 version 2). A countable vessel was defined as a structure with a lumen containing or not red blood cells.

## Results

#### Tumor growth and gross histological appearance of melanoma, colon, and mammary tumors

Inoculation of  $1 \times 10^6$  of tumor cells (B16F10, Colon 26WT or 4T1) in syngeneic animals resulted in the development of a tumor mass that was different for each type of tumor. The kinetics of tumor growth shown in Fig. 1A reveals that the rate of growth of melanoma was faster than that of colon or mammary tumor. The later presented the slowest and smallest growth (Fig. 1B). Histological analysis of the

tumor sections staining with HE showed the distinct profile of the three types of tumors and marked changes in the number of vessels in the adjacent cutaneous tissue. In melanoma, a dense mass of melanin producing melanoma cells interspersed in a rich vascular bed filled with red blood cells was observed. Some restricted areas of necrotic tissue were also present. In the connective tissue of the skin, immunological cells spread through collagen fibers and edema areas lymphocytic infiltrate. Neoplastic cells presented round or oval nuclei with dense chromatin and poor cytoplasm with variably distinct cell borders with one inconspicuous nucleoli. Variable nuclear pleomorphism and mitotic figures few were also detected. The vascular channels are lined by cells with spindle, round or oval nuclei with thin attenuated cytoplasm. Histological sections colon tumors (CT26.WT) displayed dense mass of tumor cells with poor fibrovascular tissue. Necrotic areas were more common and extensive compared to the other tumors. The connective tissue of the skin was highly vascularized and immunological cells spread in the border of tumor mass. Neoplastic cells presented moderate anisokaryosis whose nuclei presented dense hyperchromatic granular chromatin. Mitotic figures were frequent. The mammary tumor showed high cellularity, compact

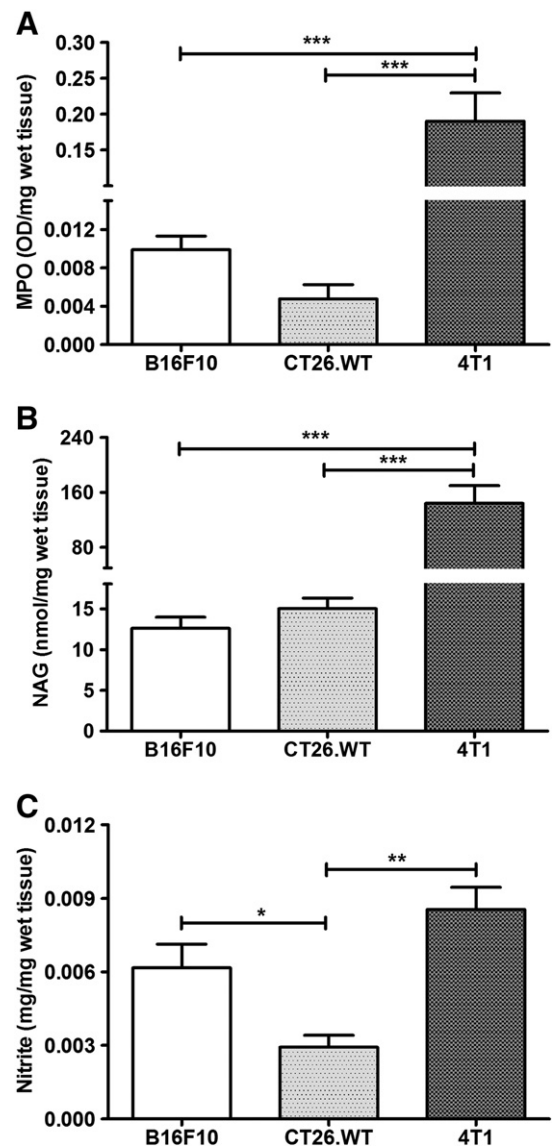


Fig. 3. Inflammatory markers in melanoma, colon and mammary tumors. Mammary tumors presented the highest levels of MPO (A), NAG (B) and nitrite (C). Values are means  $\pm$  sem of 15–20 animals in each group. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



growing and, poor fibrovascular tissue. Neoplastic cells presented nuclei of increased dimension and pale eosinophilic cytoplasm with indistinct cell borders, high cellular pleomorphism. Multifocal necrotic areas were seen. In the connective tissue of the skin, immunological cells spread through collagen fibers in the border of tumor mass (Figs. 2A–C). The skin of tumor bearing animals presented about 10-fold increase in the number of vessels compared with the skin of non-tumor bearing, but the colon tumor induced more vessels in the adjacent skin that the other two tumors (Fig. 2D).

#### Differential grade of inflammatory process in melanoma, colon and mammary tumors

The inflammatory parameters, as assessed by MPO and NAG activities and by the nitrite levels in the tumor mass varied among the tumors. The highest levels of inflammatory enzyme activities and nitrite levels were detected in 4T1 tumors (Figs. 3A–C). The levels of the cytokines TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 were also highest in the mammary

tumor. However, the colon tumor produced more MCP-1 compared with the other two tumors (Figs. 4A–C).

#### Differential grade of angiogenesis in melanoma, colon and mammary tumors

The angiogenic parameters, as assessed by the hemoglobin content, levels of VEGF and number of vessels in the tumors showed variability among them. Melanomas presented more hemoglobin (approximately 2-fold) than the other two tumors. In contrast, VEGF levels were highest (approximately 3-fold) in the mammary tumor, the least vascularized tumor (Figs. 5A–B). The number of blood vessels as determined by morphometric analysis of tumor sections corroborated the biochemical parameter (Figs. 6A–D). Table 1 summarizes the differences obtained among the tumors in the intensity of the various parameters analyzed.

#### Systemic levels of VEGF and TNF- $\alpha$

The levels of the circulating cytokines (VEGF and TNF- $\alpha$ ) in the serum of tumor bearing animals showed a differential grade. The serum levels of VEGF were highest in 4T1 tumor bearing mice but the serum levels of TNF- $\alpha$  were similar for the three types of tumors (Figs. 7A–B).

#### Discussion

Tumor growth results from complex processes in which the neoplastic microenvironment composed not only of cancer cells but also of inflammatory-, capillary- and stroma-associated cells and their products enable the progression of the malignancy. It has also become evident that most of the solid tumors, by interacting actively with supporting cells from the local host microenvironment, induce persistent pathological alterations in and around the tumor mass and systemically (Fukumura and Jain, 2007; Liotta and Kohn, 2001;

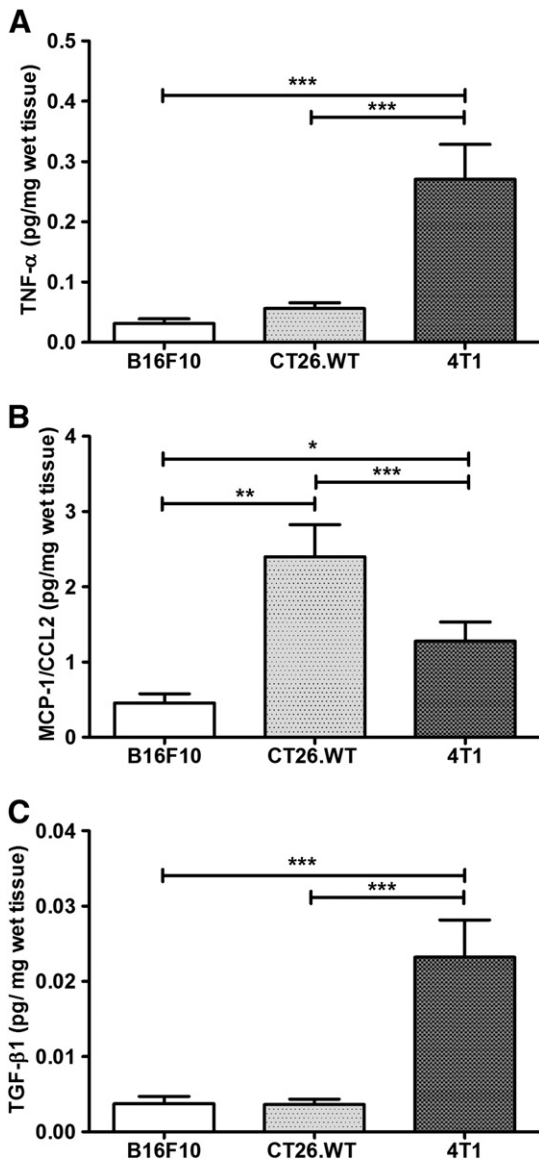


Fig. 4. Cytokine content of melanoma, colon and mammary tumors. Mammary tumor produced more TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 than the other tumors, but the levels of MCP-1/CCL2 were higher in colon tumor compared with melanoma or mammary tumor. Values are mean  $\pm$  sem of 15–20 animals in each group. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001.

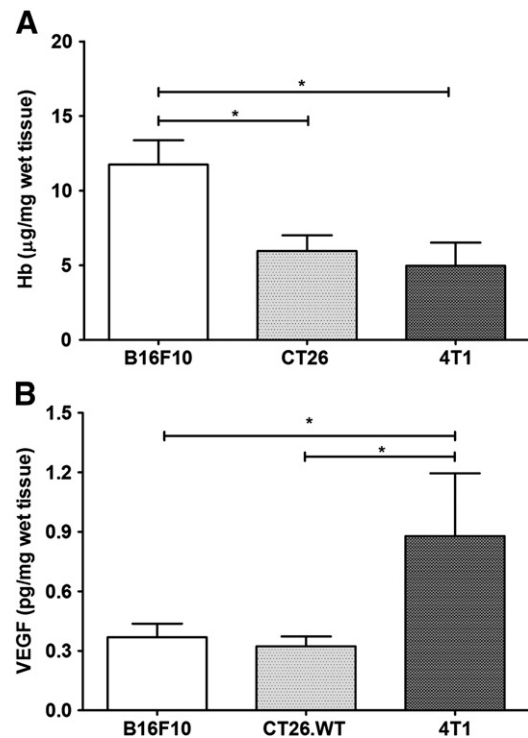
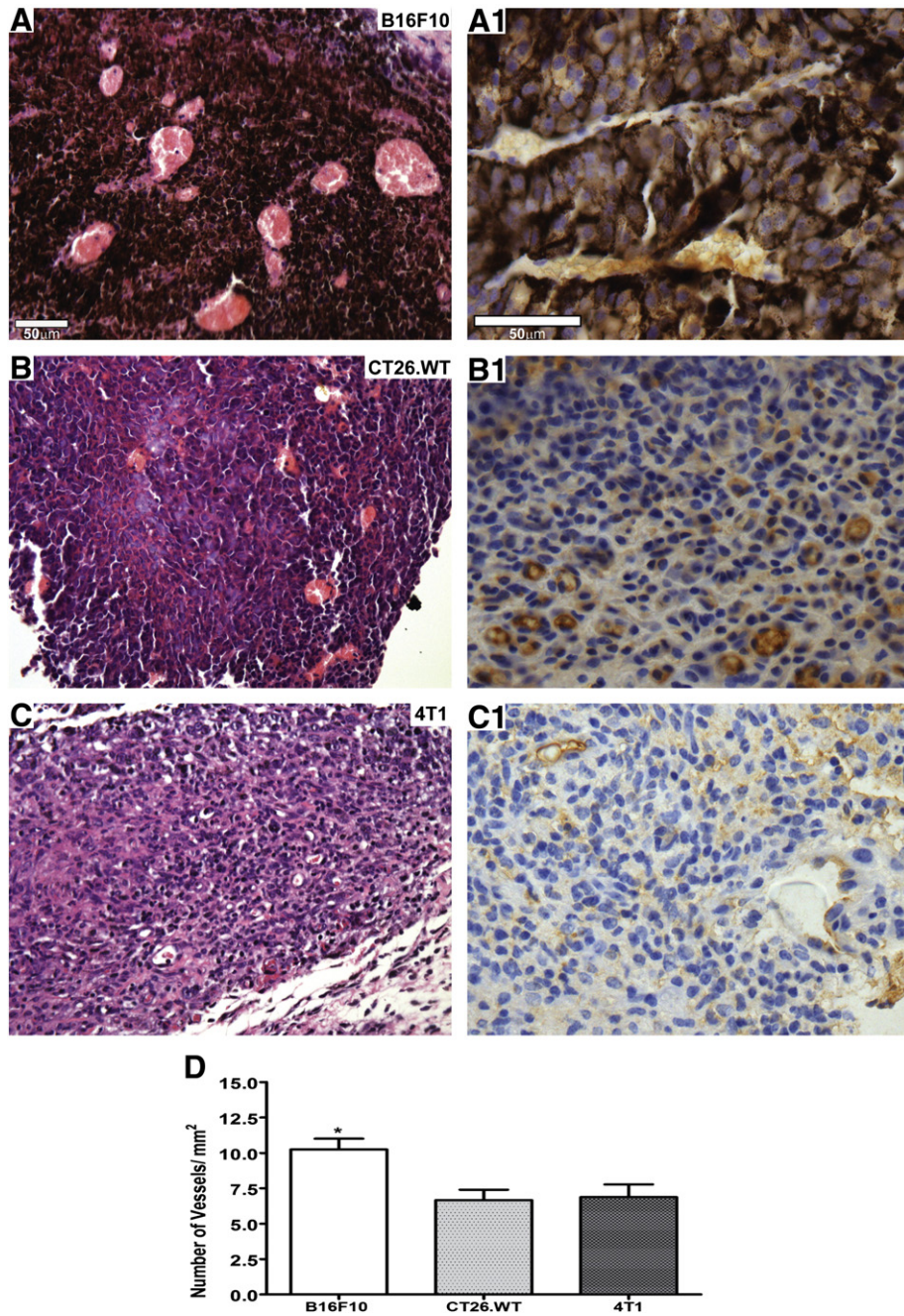


Fig. 5. Angiogenic markers in melanoma, colon and mammary tumors. Melanoma had more Hb content but mammary tumors presented more VEGF. Values are mean  $\pm$  sem of 15–20 animals in each group. \* $p$ <0.05.



**Fig. 6.** Representative histological sections of melanoma (B16F10) colon (CT26WT) and mammary tumors (4T1) stained with HE or Factor VIII (immunohistochemistry) showing higher number of vessels in melanoma compared with the other two tumors. In addition, in this tumor the blood vessels were more congested. Necrosis was more intense in mammary tumors. In D, number of vessels in the three types of tumors. \* $p < 0.001$ .

Van Kempen et al., 2003). To what extent tumors of distinct types differ in their inflammatory and angiogenic components and induce local and systemic alterations differentially has not been completely

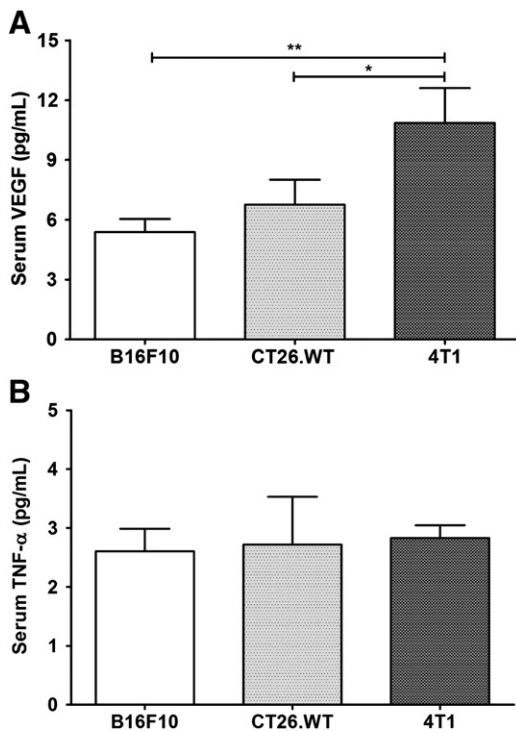
evaluated. We undertook these studies to characterize comparatively, the growth pattern of the experimental metastatic tumors, B16F10 melanoma, CT26.WT colon and 4T1 mammary cells. We have also

**Table 1**  
Differences in the grade of angiogenesis, inflammation and cytokine production among B16F10, CT.26 and 4T1 tumor cells.

Tumor type	Growth rate	Hb	VEGF	Vessel number	MPO	NAG	Nitrite	CCL2	TNF- $\alpha$	TGF- $\beta$ 1
B16F10	+++	+++	++	+++	++	+	++	+	+	+
CT.26	++	+	+	+	+	+	+	+++	+	+
4T1	+	+	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++

+ low intensity; ++ intermediate intensity; +++ high intensity.  
Hb = hemoglobin; MPO = myeloperoxidase; NAG = N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase.





**Fig. 7.** Systemic levels of VEGF and TNF- $\alpha$  in tumor-bearing mice. The levels of VEGF (A) were higher in mice bearing mammary tumor compared with the other two groups. TNF- $\alpha$  levels were not different between the groups (B). Values are mean  $\pm$  sem of 15–20 animals in each group. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

evaluated the degree of inflammation, angiogenesis, and production of pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines within the tumors and analyzed vascular changes in the interface between the tumors and the adjacent cutaneous tissue and the influence of the tumors on systemic levels of TNF- $\alpha$  and VEGF (two relevant cytokines in cancer).

We chose to investigate these three distinct types of tumors because of their high metastatic potential and marked vascularization and inflammatory components. We found that inoculation of the same amount of cells ( $1 \times 10^6$  cells) of either B16F10 or CT26.WT or 4T1 in the flank of syngeneic mice induced tumors that kept their specific characteristics as previously described (Aslakson and Miller, 1992; Fidler and Kripke, 1977; Wang et al., 1995), but presented striking differences in the intensity of the processes analyzed. The weight of tumors 15 days post-inoculation of  $10^6$  cells was markedly different. Melanomas were 2 and 10-fold heavier than colon and mammary tumors, respectively. This finding shows the complexity of tumor growth regulation and suggests that different types of tumors possess distinct mechanisms to induce their development.

The three types of tumors induced visual changes in the skin tissue adjacent to the growing tumors. Microscopic analysis of the interface between the tumor and cutaneous tissue showed dispersed collagen fibers, increased number of congested blood vessel and inflammatory infiltrate. These alterations seen in many types of tumors studied have been documented extensively (Gilead and Neeman, 1999; Guidi et al., 1997; Tarin, 2011). It was unexpected, however that different tumors would induce varying degrees of vascularization in the interface tumor/skin. Colon tumor induced more vessels in cutaneous tissue adjacent to the tumors. This tumor also produced more CCL2 than melanoma or mammary tumors and this can, at least partially, explain the difference in the number of skin vessels around the adjacent tumor tissue. CCL2 has been involved in both angiogenesis and progression of tumors (Janakiram et al., 2011; Kolattukudy and Niu, 2012). We found no study that has determined comparatively the levels of this chemokine in different types of tumors.

The mammary tumor presented the most prominent inflammatory content as assessed by a range of markers (inflammatory enzymes, nitrite and cytokines). Our results are, in part, in agreement with those reported by Hwang et al., 1998 in which it was shown that the pattern of the inducible form of cyclooxygenase expression (an inflammatory marker) in breast tumor tissues was quantitatively different from that in colon tumor tissues.

As for the vascular index, determined by the intra-tumor amount of hemoglobin and number of vessels in hot spot areas, melanomas were the most potent tumor (approximately 2-fold). Whether this more intense vascularization has concurred for the faster development of this tumor compared with that of colon or mammary tumor requires further investigation. Other striking difference between these malignancies was the plasma levels of VEGF, higher in 4T1 tumor-bearing mice compared with the two other tumors, but systemic levels of TNF- $\alpha$  were not different between the mice bearing either type of tumor. Increased systemic levels of cytokines, pro-inflammatory mediators and pro-angiogenic factors have been well documented and associated with many pathological conditions, including malignancies (Abe et al., 1994; Kong et al., 2010). However, we found no report in which differential levels of the cytokines (VEGF and TNF- $\alpha$ ) have been determined in various types of tumors simultaneously. The clinical significance of our findings remains to be determined.

Our results are in line with accumulating evidence indicating that angiogenesis and inflammatory responses together with key cytokines of both processes are important not only for the development of solid tumors including the ones we have studied, but also for establishing a fertile local microenvironment for tumor growth (Baumgarten and Frasar, 2012; Dunn et al., 2012; Ellis et al., 2000; Mackey et al., 2012; Mahabeleshwar and Byzova, 2007; Oshima and Oshima, 2012). The growth factors and cytokines produced by the different tumor types in this study (VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and CCL2) have been found to be involved in the growth of most malignancies (Baumgarten and Frasar, 2012; Dunn et al., 2012; Ellis et al., 2000; Wu and Zhou, 2010). Although these processes (inflammation, angiogenesis, cytokine production and host-tumor interaction) are common features of almost, if not all tumors, we found no systematic analysis comparing these parameters simultaneously in different types of experimental tumors. Our findings may provide a rational approach to classify tumors based on their inflammatory and/or angiogenic grade that in turn, would have clinical benefit in the management of cancer. It may be relevant, in the context of our study to point out that different strains of mice differ in their response to angiogenic and inflammatory stimuli and in the rates they develop certain types of tumors (Harvey et al., 1993; Marques et al., 2011). However, because we have used two tumor cell lines (CT.26 and 4T1) in the same mouse strain (Balb/c) and detected marked differences in the development rates and in the levels of inflammatory markers between these tumors, it is likely that the tumors themselves rather than the genetic background determined these differences. Furthermore, the CT26 tumor cells but not B16F10 (the most angiogenic tumor), induced more intense vascularization in the skin adjacent to the tumor, indicating that the tumor cell line, but not the genetic heterogeneity, have influenced the degree of vascularization within and around the tumor.

In conclusion, our experiments were intended to assess comparatively the effects of the same amount of distinct tumor cell types on their ability to induce tumor growth and key components of their development (inflammation, neovascularization and cytokine production). It is clear from our results that each tumor presented a dominant feature, thus the melanoma was seen as the most angiogenic, whereas the inflammatory process was dominant in the mammary tumor. It is also clear that locally and systemically the tumors impacted the host organism differently. Such discrepancies in the inflammatory and angiogenic grade of key components of each tumor found in our study may be determinant in the progression of

the growing tumors and may provide new insights to tailor differential therapeutic approach based on the status of tumor biomarkers.

## Acknowledgments

Our study was supported by CNPq and FAPEMIG-Brazil.

## References

- Abe, Y., et al., 1994. The role of tumor necrosis factor receptors in cell signaling and the significance of soluble form levels in the serum. *Surg. Today* 24, 197–202.
- Albini, A., et al., 2012. Cancer prevention by targeting angiogenesis. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 498–509.
- Aslakson, C.J., Miller, F.R., 1992. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 52, 1399–1405.
- Balkwill, F.R., 1994. Cytokine therapy of cancer. The importance of knowing the context. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 379–385.
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545.
- Baumgarten, S.C., Frasor, J., 2012. Minireview: inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. *Mol. Endocrinol.* 26, 360–371.
- Burke, F., et al., 1996. A cytokine profile of normal and malignant ovary. *Cytokine* 8, 578–585.
- Castro, P.R., et al., 2012. Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. *Microvasc. Res.* 84, 9–15.
- Drabkin, D.L., Austin, J.H., 1932. Spectrophotometric constants common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *J. Biol. Chem.* 98, 719–733.
- Dunn, J.H., et al., 2012. Inflammasomes as molecular mediators of inflammation and cancer: potential role in melanoma. *Cancer Lett.* 314, 24–33.
- Ellis, E.M., et al., 2000. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist* 5, 11–15.
- Fidler, I.J., Kripke, M.L., 1977. Metastasis results from pre-existing variant cells within a malignant tumor. *Science* 197, 893–895.
- Folkman, J., 2003. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* 3, 643–651.
- Fukumura, D., Jain, R.K., 2007. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc. Res.* 74, 72–84.
- Ghoneum, M., et al., 2008. *Saccharomyces cerevisiae*, the Baker's Yeast, suppresses the growth of Ehrlich carcinoma-bearing mice. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 581–592.
- Gilead, A., Neeman, M., 1999. Dynamic remodeling of the vascular bed precedes tumor growth: MLS ovarian carcinoma spheroids implanted in nude mice. *Neoplasia* 1, 226–230.
- Green, L.C., et al., 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131–135.
- Guidi, A.J., et al., 1997. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 80, 1945–1953.
- Harvey, M., et al., 1993. Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB J.* 7, 938–943.
- Hwang, D., et al., 1998. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 455–460.
- Janakiram, N.B., et al., 2011. Role of lipoxins, resolvins, and other bioactive lipids in colon and pancreatic cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 30, 507–523.
- Kerbel, R., Folkman, J., 2002. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 2, 727–739.
- Kolattukudy, P.E., Niu, J., 2012. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. *Circ. Res.* 110, 174–189.
- Kong, et al., 2010. Surgical procedure as an inducer of tumor angiogenesis. *Exp. Oncol.* 32, 186–189.
- Koong, A.C., et al., 2000. Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res.* 60, 883–887.
- Liotta, L.A., Kohn, E.C., 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411, 375–379.
- Mackey, J.R., et al., 2012. Controlling angiogenesis in breast cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev.* 38, 673–688.
- Maeda, K., et al., 1995. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br. J. Cancer* 72, 319–323.
- Mahabeshwar, G.H., Byzova, T.V., 2007. Angiogenesis in melanoma. *Semin. Oncol.* 34, 555–565.
- Marques, S.M., et al., 2011. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvasc. Res.* 82, 246–252.
- Naumov, G.N., et al., 2006. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* 5, 1779–1787.
- Negus, R.P., et al., 1997. Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C–C chemokines. *Am. J. Pathol.* 150, 1723–1734.
- Oshima, H., Oshima, M., 2012. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. *J. Gastroenterol.* 47, 97–106.
- Rak, J.W., et al., 1994. Progressive loss of sensitivity to endothelium-derived growth inhibitors expressed by human melanoma cells during disease progression. *J. Cell. Physiol.* 159, 245–255.
- Tarin, D., 2011. Cell and tissue interactions in carcinogenesis and metastasis and their clinical significance. *Semin. Cancer Biol.* 21, 72–82.
- Tsuro, T., et al., 1983. Characterization of metastatic clones derived from a metastatic variant of mouse colon adenocarcinoma. *Cancer Res.* 43, 5437–5442.
- Van Kempen, L.C., et al., 2003. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *Eur. J. Cell. Biol.* 82, 539–548.
- Wang, M., et al., 1995. Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen. *J. Immunol.* 154 (9) (May), 4685–4692.
- Wu, Y., Zhou, B.P., 2010. TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer* 102, 639–644.

**Differential contribution of acute and chronic inflammation to the  
development of murine mammary 4T1 tumors**

<sup>1</sup>Celso TR Viana, <sup>1</sup>Pollyana R Castro, <sup>1</sup>Suzane M Marques, <sup>2</sup>Miriam TP Lopes,  
<sup>3</sup>Ricardo Gonçalves, <sup>3</sup>Paula P Campos, \*<sup>1</sup>Silvia P Andrade

<sup>1</sup>Departments of Physiology and Biophysics, <sup>2</sup>Department of Pharmacology, <sup>3</sup>Department  
of General Pathology Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas  
Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte - MG, Brazil.

---

\*Corresponding author: Silvia P Andrade

Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais,

Brazil. Universidade Federal de Minas Gerais. CEP: 31270-901,

Phone: +55-31-3409-2958, Fax: +55-31-3409-2924

*E-mail address:* andrades@icb.ufmg.br

## **Abstract**

Based on the notion that inflammation favors tumorigenesis, our experiments comparatively assessed the influence of acute and chronic inflammation on the development of a murine mammary tumor (4T1). In addition, we characterized angiogenic and inflammatory markers in the tumor tissue and systemically. Subcutaneous implantation of polyether-polyurethane sponge discs in Balb/c mice was used to host 4T1 tumor cells ( $1 \times 10^6$ ), which were inoculated intraplant 24h or 10 days post implantation. Flow cytometric analysis of enzyme digested implants revealed that after 24 hours, the population of leukocytes was primarily characterized by neutrophils (42.53% +/- 8.45) and monocytes (37.53% +/- 7.48), with some lymphocytes (16.27% +/- 4.0) and few dendritic cells (1.82% +/- 0.36). At 10 days, macrophages were predominant (37.10% +/- 4.54), followed by lymphocytes (28.1% +/- 4.77) and monocytes (22.33% +/- 3.05), with some dendritic cells (13.60% +/- 0.55) and neutrophils (11.07% +/- 2.27). A mammary tumor grown in a chronic inflammatory environment was 2-fold when compared with that grown in acute inflammation and 5-fold when compared with tumor alone. The levels of pro-angiogenic cytokine (VEGF) were higher in implant-bearing tumor when 4T1 cells were grown in 10-day old implants when compared with the VEGF levels of the two other groups. Overall, the levels of the inflammatory markers evaluated (NAG, TNF- $\alpha$ ) were higher in both groups of implant-bearing tumors and on serum from those animals when compared with the tumor alone levels. This inflammation-related difference in tumor growth may provide new insights into the contribution of different inflammatory cell populations to cancer progression.



## **Introduction**

Compelling evidence has indicated that inflammation in neoplastic progression plays a decisive role. This concept has been built upon a prominent association between persistent inflammatory processes due to parasites, viruses, bacterial infections, and carcinogenesis that occurs in a number of organs and tissues (Balkwill and Mantovani, 2001; Balkwill and Mantovani, 2012; Candido and Hagemann, 2013; Coussens and Werb, 2002; Hussain and Harris, 2007).

Further support for this notion comes from the fact that the inflammatory tumor microenvironment is characterized by the presence of inflammatory cells (macrophages, neutrophils, lymphocytes, eosinophils, and mast cells). These cell populations, together with tumor and stromal cells, secrete a wide range of cytokines, chemokines, and growth factors that directly or indirectly contribute to tumor development (Balkwill and Mantovani, 2001; Balkwill and Mantovani, 2012; Coussens and Werb, 2002).

The association between inflammation and tumorigenesis has also been demonstrated using experimental strategies in which distinct tumor cell lines and different populations of inflammatory cells are co-cultivated in vitro and/or in vivo systems. For instance, implantation of foreign body material has been shown to induce a local inflammatory response in which sarcoma development occurred (Brand et al., 1977; Brand et al., 1975; Tazawa et al., 2003; Tazawa et al., 2007). Back in 1992, we established an in vivo model in which the sequential development of tumors derived from murine colon 26 adenocarcinoma and B16 melanoma tumor cells could be monitored when the tumor cells were hosted in a

synthetic sponge matrix (polyether polyurethane) in mice (Andrade et al., 1992). Interestingly, the expression of iNOS (inducible nitric oxide synthase), an inflammatory marker, was shown to be more pronounced in tumor-bearing implants when compared with that in sponge implants or tumor alone, implying that the inflammatory process induced by the foreign body reaction intensified inflammation in tumors (Buttery et al., 1993). This experimental system was further exploited to study the contribution of sponge-induced inflammation to Ehrlich tumor growth. In that study, the growth of tumor cells hosted in subcutaneous implants was delayed when the animals were treated with dexamethasone (Lage and Andrade, 2000). In another series of publications, the contribution of inflammation to tumor development has been shown using a similar approach. In one of those studies, a clone (QR32) derived from fibrosarcoma cells became tumorigenic and metastatic when subcutaneously co-implanted with a gelatin sponge in mice. Furthermore, the inflammation-promoted tumor progression was inhibited by administering an anti-granulocyte antibody (Okada et al., 1992; Tazawa et al., 2003). While these studies have contributed to confirming a positive association between inflammation and tumorigenesis, there is lack of information regarding the influence of acute versus chronic inflamed environments on key components of tumor tissue (angiogenesis, inflammatory cell recruitment/activation, and on cytokine production) and on systemic levels of pro-inflammatory markers. Accordingly, we applied a model of sponge-induced inflammation to host the murine mammary tumor cell (4T1) specifically to examine the influence of distinct inflammation

phases on the various components of the murine tumor and the impact of the malignancy systemically.

## **Material and Methods**

### *Tumor cell, sponge implantation, and experimental tumor inoculation*

The tumor cell line 4T1 (tumor mammary gland) is a thioguanine-resistant variant that was selected from 410.4 without mutagen treatment (Aslakson and Miller, 1992) and obtained from the American Type Culture Collection, Manassas, VA. Cells were maintained in RPMI 1640 medium (Hyclone, Logan, UT) containing 10% FBS, at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Once confluent, the monolayer was harvested by incubation for 2 min with trypsin/EDTA; ethylenediaminetetra-acetic acid (0.025% and 0.02 w/v, respectively). The dislodged cells were centrifuged for 10 min and adjusted to the appropriate concentration in saline; 100 µl of the cell suspension (1x10<sup>6</sup> cells) were injected in the right posterior flank of syngeneic mice (Balb/c). A Vernier caliper was used to collect tumor size data, which was plugged into the following formula: TV (mm<sup>3</sup>) = 0.52 AB<sup>2</sup>, where A is the minor axis and B is the major axis (Ghoneum et al., 2008).

Thirty male Balb/c mice (6-8 weeks, 20g weight), divided into three groups of 10 animals, received 4T1 cells. One group of mice received the tumors cells only in the subcutaneous space. In the other two groups, the tumor cells were co-implanted with either 1-day old sponge implant or 10-day old sponge implant. All

animals were killed at day 14 post-tumor cell inoculation. All animals were provided by the Animal Facility Center – Institute of Biological Science – Federal University of Minas Gerais; Belo Horizonte – Brazil. Housing, anesthesia, and care were provided according to guidelines established by local Institutional Animal Welfare Committee. At 14 days post inoculation, the animals were anesthetized for blood sampling and tumor collection. Necropsy was performed after death. In another series of experiments, 24 mice were implanted with the sponge discs, which were removed at days 1 and 10 post-implantation for analysis of the inflammatory markers (MPO, NAG, cytokines) and cell content by flow cytometry.

#### *Enzymatic digestion of sponge implants and flow cytometry*

Three sponge implants from each group (24h and 10 days postimplantation) were carefully excised, weighed, and minced with scissors in 1 ml HBSS, then 2.5 ml of filter-sterilized collagenase type 1 (Sigma Chemicals, St Louis, MO), were added to the fragments. After incubation for 30 min at 37°C, the cells were centrifuged (500 g for 10 min at 4°C) and tested for viability. Cells isolated from sponges were suspended in Staining buffer (2% BSA in PBS) and incubated for 15 minutes at 4°C with Fc blocking (Anti-CD16/32) (ebioscience). Subsequently, cells were washed with FACS buffer, stained for surface molecules for 20 minutes at 4°C, suspended and, maintained in 200 µl of PBS 2% paraformaldehyde (Sigma Aldrich). At least 50,000-gated events were acquired for analysis using FACSCanto-II (BD Biosciences). The antibody panels included the following antibodies: anti-F4/80 (clone BM8)-Pacific Blue, anti-CD11b (clone M1/70)-

PE/Cy7, anti-CD11c (clone N418)-APC/Cy7, purchased from Biolegend; anti-IA/IE (MHC-II) (clone 2G9)-FITC, anti-GR1 (clone RB6-8C5)-Percp-Cy5.5, anti-CD3 (clone 17A2)-PE, anti-CD8 (clone 53-6.7) purchased from BD Biosciences, and anti-CD4 (clone GK1.5)-PE/Cy7 and anti-F4/80 (clone BM8)-PE, purchased from eBiosciences. Data were analyzed using FlowJo Version 9.7.5 (TreeStar). A forward scatter (FSC-A) and side scatter (SSC-A) gate were used to initially remove debris and capture leucocytes (Fig. 1A). Cells were gated based on CD11b expression (Fig. 1B) and then F4/80 Low versus GR1 to select monocytes (GR1+ and GR1Low) and Neutrophils (GR1+ F4/80Neg) (Fig. 1C and 1D). A more detailed analysis of monocyte subpopulations was done based on GR1 expression and herein designated as: inflammatory monocytes (F4/80+CD11b+GR1-High) and patrolling monocytes (F4/80+CD11b+GR1-Low) (Fig. 1C). F4/80 High GR1Low/Neg gate was used to characterize macrophages (Fig. 1D). CD11c+ versus IA/IE-High (CD11C+IA/IEHi) gate was performed to characterize dendritic cells (Fig. 1E). T lymphocytes were gated on CD3+ cells (Fig. 1F). Data are shown in frequencies (%).

#### *Hemoglobin extraction*

The extent of the vascularization of the tumors was assessed by the amount of hemoglobin (Hb) detected in the tissue using the Drabkin method (Drabkin and Austin, 1932). Each tumor was homogenized Ultra – Turrax, (Schlappmuhler, Usingen, Germany) in 5 ml of Drabkin reagent (Labtest, São Paulo, Brazil) and centrifuged at 10,000 x g for 40 min. The supernatants were filtered through a

0.22- $\mu\text{m}$  Millipore filter (Danvers, MA, USA). The hemoglobin concentration in the samples was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 540 nm using an ELISA plate reader and compared against a standard curve of hemoglobin. The hemoglobin content in the implant was expressed as  $\mu\text{g}$  Hb per mg wet tissue.

*Tissue extraction and determination of myeloperoxidase and N-acetylglucosaminidase activities*

The number of neutrophils in the tumors was measured by assaying myeloperoxidase (MPO) activity as previously described (Castro et al., 2012; Marques et al., 2011; Viana et al., 2013). The tumors were weighed, homogenized in pH 4.7 buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M NaPO<sub>4</sub>, 0.015 M NaEDTA), and centrifuged at 12,000 x g for 10 min. The pellets were then re-suspended in 0.05 M NaPO<sub>4</sub> buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) followed by three freeze-thaw cycles using liquid nitrogen. MPO activity in the supernatant samples was assayed by measuring the change in absorbance (optical density; OD) at 450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 mM). The reaction was terminated by adding 50  $\mu\text{l}$  of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4M). Results were expressed as a change in OD per g of wet tissue.

The infiltration of mononuclear cells into the tumors was quantified by measuring the levels of the lysosomal enzyme N-acetylglucosaminidase (NAG) present in high levels in activated macrophages (Castro et al., 2012; Marques et al., 2011). The tumors were homogenized in NaCl solution (0.9% w/v) containing 0.1% v/v

Triton X-100 (Promega, Madison, WI, USA) and centrifuged (3,000 x g; 10 min at 4°C). Samples (100 µl) of the resulting supernatant were incubated for 10 min with 100 µl of p-nitrophenyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) prepared in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH4.5) to yield a final concentration of 2.24mM. The reaction was stopped by adding 100µl of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6). Hydrolysis of the substrate was determined by measuring the absorption at 400 nm. Results were expressed as nmol/mg wet tissue.

#### *Measurement of VEGF, TNF- $\alpha$ , and MCP-1 levels*

Tumors were homogenized in PBS (1ml for 100 mg of the tissue) pH 7.4 containing 0.05% Tween and centrifuged at 10,000 x g for 30 min. The cytokines VEGF, TNF- $\alpha$ , and MCP-1 in the supernatant of each tumor were measured in 50 µl of the supernatant or in the serum (20 µl) of tumor-bearing and non-tumor bearing animals, using Immunoassay Kits (R and D Systems, USA) and following the manufacturer's protocol. Briefly, dilutions of cell-free supernatants were added in duplicate to ELISA plates coated with a specific murine monoclonal antibody against cytokine, followed by adding a second horseradish peroxidase-conjugated polyclonal antibody, also against cytokine. After washing to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution (50µL of a 1:1 solution of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine 10mg/ml in DMSO) was added to the wells. Color development was stopped, after 20 min incubation, with 2N sulphuric acid (50 µL) and color intensity was measured at 540 nm on a spectrophotometer (E

max – Molecular Devices). Standards were 0.5- $\log_{10}$  dilutions of recombinant murine cytokines from 7.5  $\text{pg ml}^{-1}$  to 1000  $\text{pg ml}^{-1}$  (100  $\mu\text{l}$ ). The results were expressed as  $\text{pg cytokine per mg wet tissue}$ .

### *Statistical analysis*

All data were expressed as mean  $\pm$  SD. Comparisons among the groups were made using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls correction factor for multiple comparisons as a post-test. Differences between means were considered significant when P values were  $<0.05$ .

### **Results**

Subcutaneous implantation of polyether-polyurethane sponge discs in mice has consistently been shown to induce an inflammatory reaction that progresses from acute to chronic processes over time (Castro et al., 2012; Marques et al., 2011). We have used this experimental system to analyze the influence of acute or chronic inflammation on the development of mammary tumors (4T1 cells). The inflammatory exudate from the implants removed twenty-four hours after implantation was composed of higher levels of myeloperoxidase (MPO), when compared with those from 10-day old implants Conversely, the levels of NAG were higher in older implants when compared with those implanted for 24h. VEGF and TNF- $\alpha$  levels were similar at both time points (Table 1). More direct evidence of the cell types present in the implant compartment at both time intervals in which the tumor cells were inoculated was characterized by flow cytometry after 24 hour or



10 days of the implantation of the sponges. Flow cytometry analysis has shown differences in cell type population when comparing 24 hour and 10 days. After 24 hour, the population of leukocytes was characterized mainly by neutrophils (42.53% +/- 8.45) and monocytes (37.53% +/- 7.48), with some lymphocytes (16.27% +/- 4.0) and few dendritic cells (1.82% +/- 0.36) (Fig. 2A). It was possible to see few Natural Killer cells in a very low frequency, less than 0.5% (data not shown). At 10 days, the population of leukocytes was characterized mainly by macrophages (37.10% +/- 4.54), lymphocytes (28.1% +/- 4.77) and monocytes (22.33% +/- 3.05) with some dendritic cells (13.60% +/- 0.55) and neutrophils (11.07% +/- 2.27) (Fig. 2B). Comparing the leukocyte population between the two time points, it was possible to see a higher number of monocytes (Fig. 2C) and neutrophils (Fig. 2D) in 24 hours, when compared to 10 days, and very few macrophages were detectable after 24 hours of sponge implant (Data not shown). After 10 days, the frequency of macrophages had increased considerably (Fig. 2B), as had the frequency of dendritic cells (Fig. 2E) and lymphocytes (Fig. 2F). Analyzing the monocyte subpopulation, it was possible to observe a higher number of patrolling monocytes (55.7% +/- 1.17) when compared to inflammatory monocytes (in 24h), mostly patrolling monocytes after 10 days with no inflammatory monocytes detected at this time point.

In these two distinct inflammatory environments, inoculation of 4T1 tumor cells yielded tumors that grew differentially over a 15-day period. The wet weight (mg) of tumors alone was  $327.2 \pm 28.8$  versus  $960 \pm 71.6$  (4T1+Acute Inflammation; AI), versus  $1781 \pm 147$  (4T1+Chronic Inflammation; CI) (Fig. 3A). Next, we characterized

the tumors' vascularization index by assaying the hemoglobin content. In implant-bearing tumors, the amount of Hb was higher when compared with the tumors alone. The amount of Hb did not vary when 4T1 tumor cells were grown in an acute or chronic inflammatory environment (Fig. 3B). The levels of pro-angiogenic cytokine (VEGF) were higher in implant-bearing tumors when 4T1 cells were grown in 10-day old implants when compared with the other two groups (Fig. 3C).

Overall the levels of the inflammatory markers evaluated (NAG, TNF- $\alpha$ , CCL2) in the implant bearing-tumors were also influenced by the inflammation phase in which the tumor cells were grown. There was no difference in MPO activity among the groups (Fig. 4A), but NAG activity was higher in tumor-bearing implants in both groups when compared with tumor alone (Fig.4B). The levels of TNF- $\alpha$  were higher in both groups of implant-bearing tumors when compared with the tumor alone (Fig. 5A). Conversely, the levels of CCL2 chemokine were lower in implant-bearing tumors from both groups when compared with those from tumor alone (Fig. 5B). We have also analyzed cytokine levels in serum from mice-bearing tumors and non-bearing tumors. The systemic levels of VEGF were similar in the animals bearing tumors (Fig. 6A). However, the circulating levels of TNF- $\alpha$  were higher in implant-bearing tumor animals when compared with those of tumor alone animals (Fig. 6B). Conversely, systemic levels of CCL2 were higher in animals bearing tumor alone, when compared with those in which the tumor cells grew intra-implant (Fig. 6C).

## **Discussion**

It has become evident that inflammation initiates and/or exacerbates the development of 15 to 20% of all malignancies (Balkwill and Mantovani, 2012; Kuper et al., 2000; Ono, 2008). This notion is supported by the fact that the inflammatory tumor microenvironment is characterized by the presence of inflammatory cells (macrophages, neutrophils, lymphocytes, eosinophils, and mast cells) and by a number of independent studies showing that many malignancies arise from areas of infection and inflammation (Balkwill and Mantovani, 2001; Balkwill and Mantovani, 2012; Coussens and Werb, 2002; Mantovani et al., 2008). The association between inflammation and tumorigenesis has been also demonstrated using experimental strategies in which distinct tumor cell lines and different populations of inflammatory cells are co-cultivated in vitro and/or in vivo systems. There is, however, a lack of information regarding the influence of acute versus chronic inflamed environment on the development of solid tumors and whether both distinct inflammatory processes alter the pattern of key components of tumor tissue (angiogenesis, inflammatory cell recruitment/activation, and cytokine production). The chosen experimental tumor model, the mouse mammary carcinoma 4T1, originally isolated as subpopulation 410.4 derived from a spontaneous mammary tumor in Balb/c mice, presents mixed myeloid cell infiltrates and produces various pro-inflammatory cytokines and is considered a good breast cancer model (Dexter et al., 1978; Heppner et al., 2000). Using this combination of tumor cell and inflammatory environment, we have shown that inoculation of 4T1 tumor cells ( $1 \times 10^6$ ) in subcutaneous polyether-polyurethane

sponge matrix, implanted for 24h or 10 days, induced the development of mammary tumors that differed from that in which the tumor cells were inoculated in the animals' subcutaneous space. We observed that subcutaneous implantation of polyether polyurethane matrix induced the infiltration of leukocytes at both time points evaluated and the products of their activities (inflammatory enzymes and cytokines) confirmed our previous findings (Campos et al., 2011; Castro et al., 2012; Marques et al., 2011). Evaluation by flow cytometry of the inflammatory cell profile from 24h-implants, characterized herein for the first time, showed that the predominant cell type was neutrophils (42.53% +/- 8.45) and monocytes (37.53% +/- 7.48), whereas in 10-day old implants the population of leukocytes was characterized mainly by macrophages (37.10% +/- 4.54), lymphocytes (28.1% +/- 4.77), and monocytes (22.33% +/- 3.05). Both distinct profiles are characteristic of acute and chronic inflammation, respectively, and clearly contributed to the differential growth of the mammary tumor. Thus, most of the parameters evaluated (tumor growth, NAG activity, VEGF, TNF- $\alpha$  production) were higher in inflammation-promoted tumor groups when compared with tumors grown in the subcutaneous space without additional inflammatory support from the sponge. Our findings are consistent with previous reports showing that implantation of tumor cells in inflamed environments potentiates and/or modifies some features of malignant cells. For instance, when QR32 tumor cells (a poorly tumorigenic clone) were co-implanted with a gelatin sponge, they acquired enhanced tumorigenicity and metastatic ability (Okada et al., 1992; Tazawa et al., 2003). Initiation and promotion of sarcoma development have also shown to be associated with foreign

bodies (Kirkpatrick et al., 2000; Tazawa et al., 2007). Increased expression of inducible NOS (inflammatory marker) in melanoma-bearing implants or in colon26-bearing-implants compared with non-tumor-bearing implants has been shown, implying further association between tumorigenesis and inflammation (Buttery et al., 1993). The fact that tumor burden was 2-fold when 4T1 cells were inoculated in 10-day old implants compared with the size of tumors grown in the acute inflammatory environment was, to some extent, expected considering that the tumor cells were hosted in a highly vascularized bed (fibrovascular proliferative tissue induced by the synthetic matrix). These findings are in agreement with the well-established importance of angiogenesis to tumor development (Albini et al., 2012; Folkman, 2003). It was interesting to find out that the levels of pro-angiogenic cytokine, VEGF, and those of TNF- $\alpha$  were distinctly influenced by both inflammatory processes. Thus, VEGF and TNF- $\alpha$  in the tumor mass were more pronounced when 4T1 cells were inoculated in 10-day old implants when compared with the same features of tumors grown in 24h implants. In turn, tumors grown in the subcutaneous space without the additional inflammatory support from the sponge were the smallest and produced less cytokines, except for CCL2. Our findings are in agreement with the notion of the contribution of neutrophils to tumorigenesis as shown earlier by Weitzman et al. 1985. In their study, C3H mouse fibroblast cell line was converted to form tumors in nude mice after co-culture with neutrophils. Others have confirmed the role of neutrophils in tumorigenic conversion and transformation of benign tumor cells into malignant

metastatic phenotype (Ishikawa et al., 1987; Rymaszewski et al., 2014; Tazawa et al., 2003).

Interestingly, tumor alone produced more CCL2 locally and systemically. It has been reported that production of CCL2, constitutively or in response to inflammatory stimuli by 4T1 cells, is responsible for the initiation and progression of 4T1 tumors (Yoshimura et al., 2013). However, the production of VEGF and TNF- $\alpha$  systemically was more pronounced when the 4T1 cells were hosted in the implants. It is possible that both tumor cells and inflammatory infiltrate acted synergically producing the cytokines that, in turn, amplified neoplastic proliferation. In fact, both VEGF and TNF- $\alpha$  are part of a repertoire of molecules responsible for a number of events involved in tumor progression (angiogenesis, macrophage recruitment, proliferation, and metastasis) (Germano et al., 2008).

The cellular profile of the murine mammary carcinoma is composed of mixed myeloid cell infiltrates consisting of a progressive increase of CD45+ hematopoietic cell and CD11+ myeloid cells (DuPre and Hunter, 2007; DuPre et al., 2008). Whether the distinct inflammatory environments of the implants (acute or chronic inflammation) have altered this profile has not been determined. Future experiments may address this issue by examining the phenotype of 4T1 cells exposed to distinct population of inflammatory cells.

In conclusion, our experiments were intended to comparatively assess the influence of acute and chronic inflammation on the development of the murine mammary tumor and whether these two processes would alter angiogenesis, inflammation, and cytokine production locally and systemically. It is clear from our

results that both inflammatory processes potentiated the development of 4T1 tumor. However, chronic inflammation was more effective than acute inflammation in inducing VEGF and TNF- $\alpha$  and tumor progression. These inflammation-related differences in tumor growth may provide new insights into the contribution of different inflammatory cell populations to cancer development.

### **Acknowledgments**

The study was supported by Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (Capes); National Council for Scientific and Technological development (CNPq).

### **References**

Albini, A., et al., 2012. Cancer prevention by targeting angiogenesis. *Nat Rev Clin Oncol.* 9, 498-509.

Andrade, S. P., et al., 1992. Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature. *Br J Pharmacol.* 107, 1092-5.

Aslakson, C. J., Miller, F. R., 1992. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 52, 1399-405.

Balkwill, F. R., Mantovani, A., 2012. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin Cancer Biol.* 22, 33-40.

Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 357, 539-45.

Brand KG, Buoen LC, Brand I. 1975. Foreign-body tumorigenesis induced by glass and smooth and rough plastic. Comparative study of preneoplastic events. *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 319-322.

Brand, I., et al., 1977. Foreign-body tumors of mice: strain and sex differences in latency and incidence. *J Natl Cancer Inst.* 58, 1443-7.

Brand, K. G., et al., 1975. Foreign-body tumorigenesis by vinyl chloride vinyl acetate copolymer: no evidence for chemical cocarcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 54, 1259-62.

Buttery, L. D., et al., 1993. Induction of nitric oxide synthase in the neo-vasculature of experimental tumours in mice. *J Pathol.* 171, 311-9.



Campos, P. P., et al., 2011. Alterations in the dynamics of inflammation, proliferation and apoptosis in subcutaneous implants of lupus-prone mice. *Histol Histopathol.* 26, 433-42.

Candido, J., Hagemann, T., 2013. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol.* 33 Suppl 1, S79-84.

Castro, P. R., et al., 2012. Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. *Microvasc Res.* 84, 9-15.

Coussens, L. M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature.* 420, 860-7.

Dexter, D. L., et al., 1978. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 38, 3174-81.

Drabkin, D.L., Austin, J.H., 1932. Spectrophotometric constants common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *J. Biol. Chem.* 98, 719–733.

DuPre, S. A., et al., 2008. Microenvironment of the murine mammary carcinoma 4T1: endogenous IFN-gamma affects tumor phenotype, growth, and metastasis. *Exp Mol Pathol.* 85, 174-88.

DuPre, S. A., Hunter, K. W., Jr., 2007. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol.* 82, 12-24.

Folkman, J., 2003. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med.* 3, 643-51.

Germano, M. P., et al., 2008. Anti-ulcer, anti-inflammatory and antioxidant activities of the n-butanol fraction from *Pteleopsis suberosa* stem bark. *J Ethnopharmacol.* 115, 271-5.

Ghoneum, M., et al., 2008. *S. cerevisiae* induces apoptosis in human metastatic breast cancer cells by altering intracellular Ca<sup>2+</sup> and the ratio of Bax and Bcl-2. *Int J Oncol.* 33, 533-9.

Heppner, G. H., et al., 2000. Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2, 331-4.

Hussain, S. P., Harris, C. C., 2007. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer.* 121, 2373-80.

Ishikawa, M., et al., 1987. Changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cells treated with quercetin or 5-azacytidine. *Int J Cancer.* 39, 338-42

Kirkpatrick, C. J., et al., 2000. Biomaterial-induced sarcoma: A novel model to study preneoplastic change. *Am J Pathol.* 156, 1455-67.

Kuper, H., et al., 2000. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med.* 248, 171-83.

Lage, A. P., Andrade, S. P., 2000. Assessment of angiogenesis and tumor growth in conscious mice by a fluorimetric method. *Microvasc Res.* 59, 278-85.

Mantovani, A., et al., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature.* 454, 436-44.

Marques, S. M., et al., 2011. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvasc Res.* 82, 246-52.

Okada, F., et al., 1992. Malignant progression of a mouse fibrosarcoma by host cells reactive to a foreign body (gelatin sponge). *Br J Cancer.* 66, 635-9.

Ono, M., 2008. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci.* 99, 1501-6.

Rymaszewski, A. L., et al., 2014. The role of neutrophil myeloperoxidase in models of lung tumor development. *Cancers (Basel).* 6, 1111-27.

Tazawa, H., et al., 2003. Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol.* 163, 2221-32.

Tazawa, H., et al., 2007. Oxidative and nitrative stress caused by subcutaneous implantation of a foreign body accelerates sarcoma development in Trp53<sup>+/-</sup> mice. *Carcinogenesis.* 28, 191-8.

Viana, C. T., et al., 2013. Distinct types of tumors exhibit differential grade of inflammation and angiogenesis in mice. *Microvasc Res.* 86, 44-51.

Weitzman, S. A., et al., 1985. Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science.* 227, 1231-3.

Yoshimura, T., et al., 2013. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 produced by stromal cells promotes lung metastasis of 4T1 murine breast cancer cells. *PLoS One.* 8, e58791.

## Figure Legends

Figure 1- Flow cytometry strategy to define the myeloid and lymphoid populations isolated from sponge implants. (A) FSC-A x SSC-A profile from total events acquired showing the gate used to eliminate debris. (B) Histogram defining the CD11b<sup>+</sup> myeloid population. (C and D) Dot plots to define monocytes (F4/80<sup>lo</sup>), macrophages (F4/80<sup>Hi</sup>) and neutrophils (F4/80<sup>Neg</sup>). (E) Dot plot showing the profile of dendritic cells based on CD11c<sup>+</sup> and MHC-II<sup>Hi</sup>. (F) T cell population based on CD3<sup>+</sup> cells.

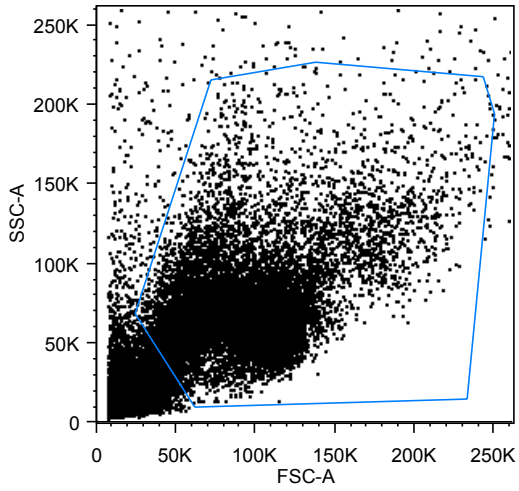
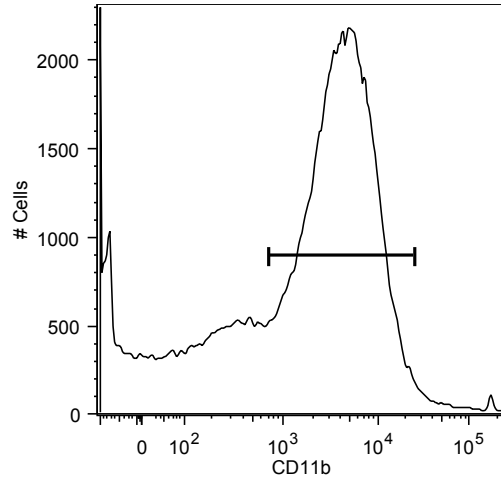
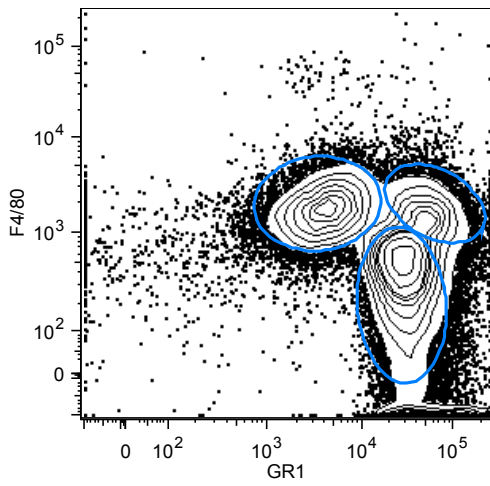
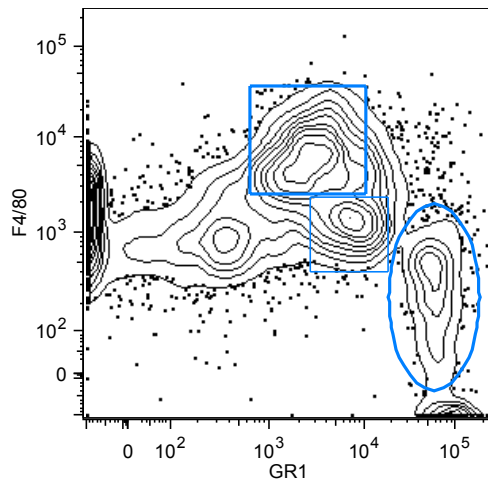
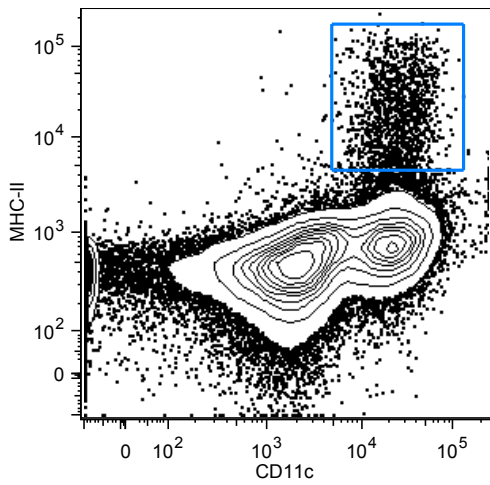
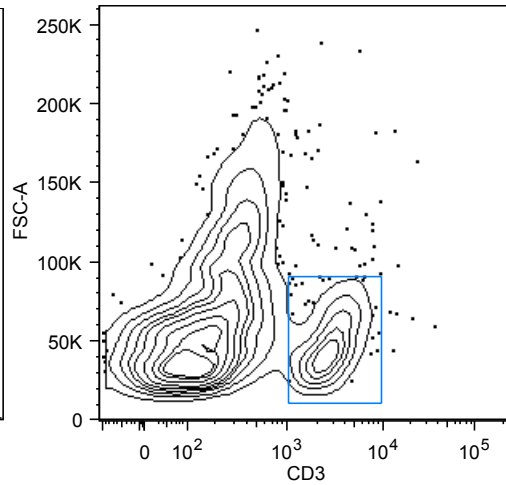
Figure 2 – Flow cytometry analysis of leukocytes isolated from sponge implants. Frequency of leukocytes isolated from sponges after 24h (A) or 10 days (B) of implantation. Analysis of the frequency of cells comparing 24 hour x 10 days for monocytes (C), neutrophils (D), dendritic cells (E) and T lymphocytes (F).

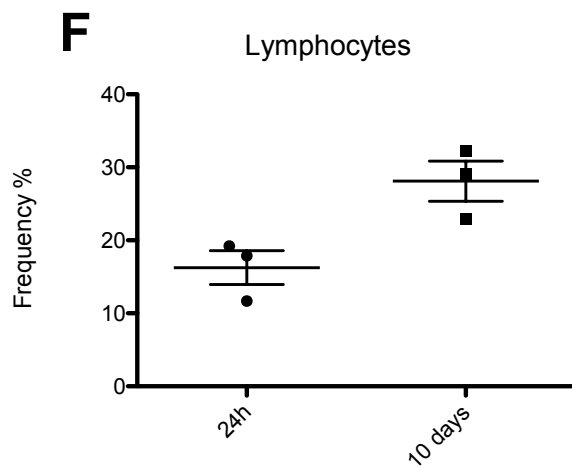
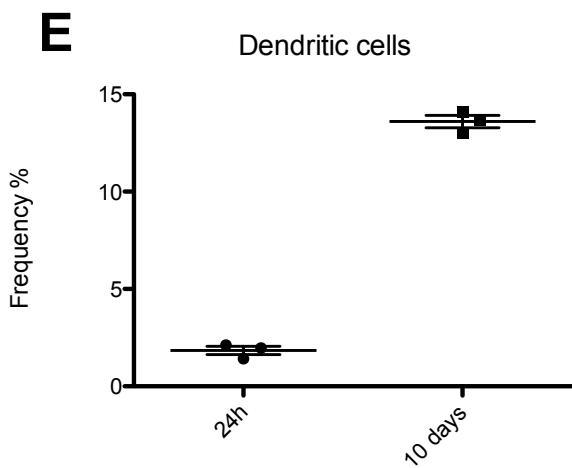
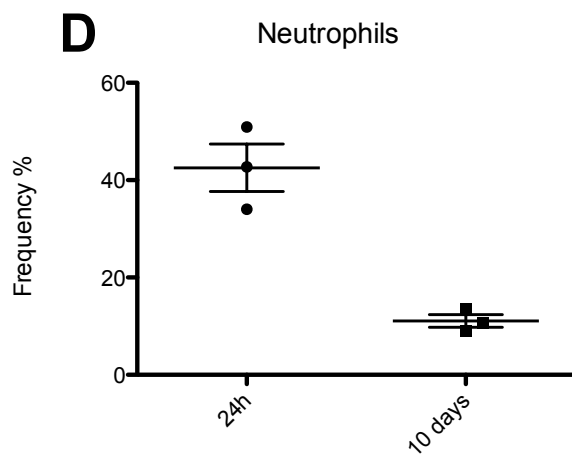
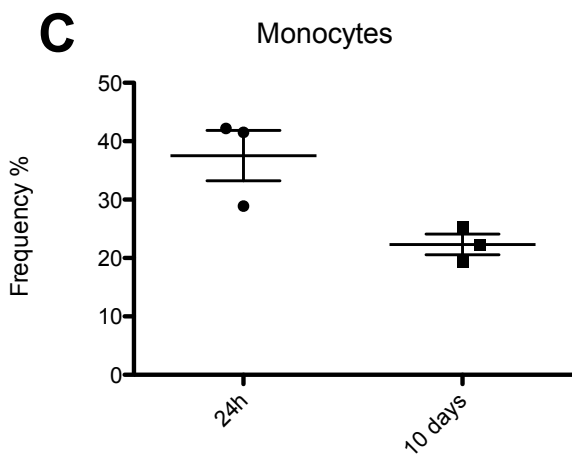
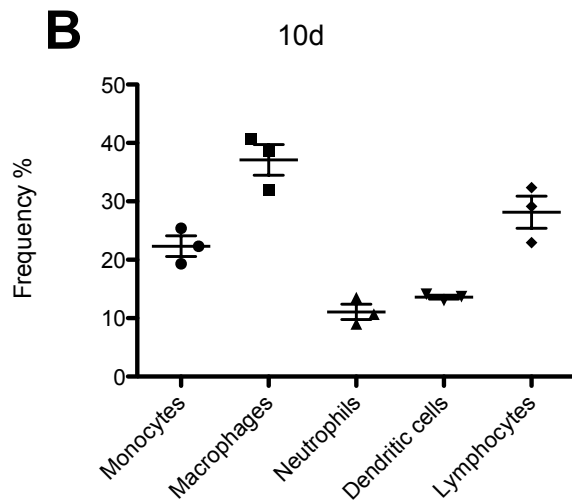
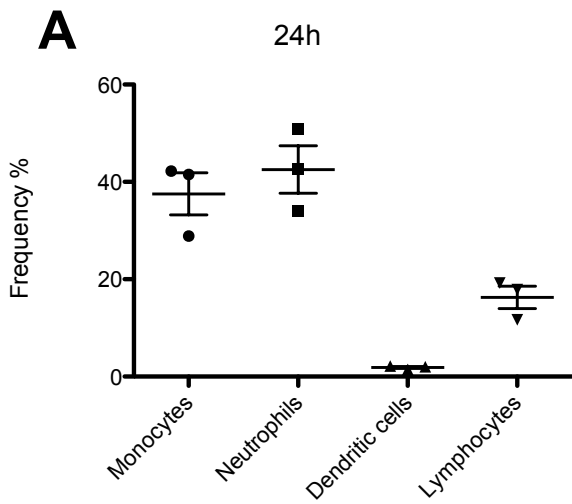
Figure 3- Effects of acute (AI) or chronic inflammation (CI) on the development and angiogenesis of 4T1 mammary tumor. (A) Growth; (B) hemoglobin content-Hb and (C) VEGF levels. Inoculation of  $1 \times 10^6$  tumor cells in subcutaneous space, intrainplant (24h or 10 days postimplantation) induced bigger tumors and more angiogenesis in implant-bearing tumors. Values are mean $\pm$ sem of 10 animals in each group. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  – ANOVA. AI (acute inflammation + 4T1); CI (chronic inflammation + 4T1).

Figure 4- Effects of acute (AI) or chronic inflammation (CI) on inflammatory enzyme activities (A) myeloperoxidase-MPO, (B) n-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase of 4T1 mammary tumor. NAG activity was higher in implant-bearing tumors. Values are mean $\pm$ sem of 10 animals in each group. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001- ANOVA. AI (acute inflammation + 4T1); CI (chronic inflammation + 4T1).

Figure 5- Effects of acute (AI) or chronic inflammation (CI) on cytokine production of 4T1 mammary tumor. (A) TNF- $\alpha$ ; (B) CCL2. TNF- $\alpha$  levels were higher in implant-bearing tumors. Values are mean $\pm$ sem of 10 animals in each group. \*p<.05\*\*;  
p<0.01; \*\*\*p<0.001 – ANOVA. AI (acute inflammation + 4T1); CI (chronic inflammation + 4T1).

Figure 6- Systemic levels of VEGF (A) and TNF- $\alpha$  (B) in tumor-bearing mice, CCL2 (C). VEGF levels were similar in tumor-bearing animals, TNF- $\alpha$  levels were higher in serum from tumor-bearing animals. CCL2 levels were higher in serum from implant-free tumor-bearing animals. Values are means $\pm$ sem of 10 animals in each group. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 – ANOVA. AI (acute inflammation + 4T1); CI (chronic inflammation + 4T1).

**A****B****C****D****E****F**





# Monocyte subpopulation

