

VICTÓRIA DE SOUSA CHAVES

Propriedades imunomodulatórias e pró-carcinogênicas de macrófagos
humanos resistentes à Cisplatina



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2018**

Trabalho realizado no Laboratório de Glicobiologia, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação do Professor Leonardo Freire de Lima.

de Sousa Chaves, Victória

Propriedades Imunomodulatórias e Pró carcinogênicas de Macrófagos Humanos Resistentes à Cisplatina / Victória de Sousa Chaves -- Rio de Janeiro: UFRJ, 2018.

50 f.

Orientador: Leonardo Freire de Lima.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2018.

Bibliografia: f.33-37

1. Macrófago. 2. Quimioresistência. 3. Cisplatina. 4. Câncer. 5. Imunologia.
I. Freire de Lima, Leonardo, orient. II. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Victória de Sousa Chaves**
 DRE: 115061915

BANCA EXAMINADORA: Profa. Alessandra D'Almeida Filardy (Presidente)
 MSc. Kamila Guimarães
 MSc. Camila Ribeiro Rodrigues de Pão
 Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Suplente)

Titulo da Monografia: **"Propriedades imunomodulatórias e pró-carcinogênicas de macrófagos humanos resistentes à cisplatina"**

Local: Sala D-27 / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ
 Data e hora de início: 7 de dezembro de 2018 às 13:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 7 de ~~dezembro~~ de 2018.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	<u>Alessandra D'Almeida Filardy</u> Profa. Alessandra D'Almeida Filardy
<u>10,0</u>	<u>Kamila Guimarães</u> MSc. Kamila Guimarães
<u>10,0</u>	<u>Camila Ribeiro Rodrigues de Pão</u> MSc. Camila Ribeiro Rodrigues de Pão
	<u>Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza</u>
Aluno:	<u>Victória de Sousa Chaves</u> Victória de Sousa Chaves
Orientador:	<u>Leonardo Freire de Lima</u> Prof. Leonardo Freire de Lima
Coordenador de TCC	<u>Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho</u> Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre lutaram para me ver chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me conduzir não só durante esses 4 anos de graduação, mas também durante toda minha vida, iluminando meu caminho até o fundão, me dando sabedoria para enfrentar todos os momentos e muita luz para continuar seguindo mesmo nas horas mais difíceis.

Essas palavras são uma pequena parcela de toda gratidão e amor que tenho pelas pessoas que mencionarei abaixo. Nada do que eu disser conseguirá explicar o imenso carinho que tenho por todos vocês.

Aos meus pais, Aguinaldo e Vânia, eu devo toda a gratidão do mundo. Por toda minha vida vocês fizeram de tudo para me dar o maior apoio possível. Sempre fizeram tudo pensando em mim, no meu futuro, me colocando como prioridade, mesmo não sendo obrigação de vocês, e eu serei eternamente agradecida por tudo isso. Obrigada por mesmo não entendendo muito bem como que funciona essa minha rotina maluca de faculdade/laboratório, sempre estarem ao meu lado, me proporcionando todo carinho, suporte e compreensão. Desde as comidas deliciosas da minha mãe, ou as caronas na hora do aperto do meu pai, até os conselhos e conversas sobre toda essa minha trajetória, tudo isso me deu muito gás para continuar seguindo meu caminho e me dando força nos momentos que mais precisava.

Aos meus padrinhos, Maria Alice, Patrícia, Zé Luiz e, também ao tio Maurício, meu muito obrigado a vocês por sempre estarem ao meu lado, cumprindo esse papel tão lindo que foi dado a vocês. Fico muito feliz por sempre estarem acompanhando de perto todas as minhas jornadas, por se importarem de verdade comigo. Vocês são mais que especiais!

À Julia, você se tornou a melhor parceira que alguém poderia ter. Quem diria né? Só tenho que te agradecer por ser meu porto seguro, meu apoio, por me dar equilíbrio durante meus surtos, por me mostrar o quão forte eu posso ser e sempre dizer a coisa certa na hora certa. Eu não sei o que teria sido de mim sem você, principalmente neste último ano de faculdade. Obrigada por todos os conselhos, por todas as conversas, por ser a pessoa que me coloca nos eixos quando eu mais preciso, mas também me tira dele quando eu não aguento mais. Obrigada por me permitir ser quem eu realmente sou, por não me julgar, por me aceitar e sempre entender meu lado. Você é e sempre será a surpresa mais linda que a UFRJ me deu.

Às minhas eternas melhores amigas da escola, Ana, Carol, Lu, Nina e Quel vocês são incríveis. Eu tenho um orgulho tão grande das mulheres lindas que vocês se tornaram e, principalmente, da nossa amizade. Forte, verdadeira, fiel e que eu tenho certeza que posso

contar para sempre. A melhor coisa que o Martins me deixou com certeza foi ter nos unido e permitido que essa amizade fosse construída. Obrigada por todas as nossas conversas, momentos, apoio, festinhas, conselhos, abraços, encontros e risadas que vocês me proporcionam durante todos esses anos de amizade. Vocês são as melhores amigas do mundo.

Aos amigos que fiz durante a faculdade, Amanda, Carol, Natalia e Matheus, muito obrigada por todos os nossos momentos juntos, principalmente aqueles que íamos para o CA só para gritar e xingar toda essa graduação. Obrigada por durante esses 4 anos juntos terem aturado todos os meus dramas, por nossas brigas sobre trabalhos, mas também por todas as nossas conversas, risadas, saídas, festinhas e também por todos os desafios que embarcamos juntos, mesmo sabendo que ia ser uma dor de cabeça, mas que se tornou muito mais leve por estar com vocês. A nossa amizade é muito importante para mim e espero que a gente consiga levá-la para além da graduação. Vocês serão inesquecíveis.

Não poderia me esquecer de incluir nesse agradecimento meu orientador Leonardo Lima, obrigada por nesses 2 anos de ensinamento, me proporcionar toda ajuda e paciência necessárias para meu aprendizado, sem isso, esse projeto não seria totalmente realizado. Obrigada por acreditar em mim e permitir que eu fizesse parte desse projeto e o desenvolvesse. Além disso, agradeço à Lúcia Previato e Zé Osvaldo Previato por me receberem em seu laboratório e permitirem que eu colocasse em prática todo esse trabalho.

Agradeço, também, aos membros da banca por reservarem seu tempo para avaliar e discutir meus resultados, contribuindo efetivamente para o progresso deste projeto.

Agradeço, por último, as agências de fomento, CNPq, CAPES, FAPERJ e Fundação do Câncer.

RESUMO**VICTÓRIA DE SOUSA CHAVES****PROPRIEDADES IMUNOMODULATÓRIAS E PRÓ-CARCINOGENÉTICAS DE
MACRÓFAGOS HUMANOS RESISTENTES À CISPLATINA**

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia e Imunologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

ORIENTADOR: LEONARDO FREIRE DE LIMA

Apesar do desenvolvimento dos esquemas terapêuticos, o tratamento do câncer ainda é deficiente. Isso é decorrente de um grande obstáculo que é o fenótipo de resistência a drogas. Neste contexto, fica mais evidente que diferentes células que constituem o microambiente tumoral modulam a aquisição de resistência e influenciam na progressão do câncer. Tumores sólidos mais agressivos, por exemplo, possuem altos níveis de macrófagos (M ϕ) que, assim como as células transformadas, ficam sujeitos aos efeitos de quimioterápicos e podem adquirir resistência, interferindo na progressão tumoral. Deste modo, nosso objetivo é induzir resistência em M ϕ humanos e verificar seu potencial imunomodulatório e pró-carcinogênico. Para isso, monócitos (Mon ϕ) foram tratados com doses crescentes de cisplatina (Cis) e a toxicidade foi monitorada pelo ensaio de MTT. Posteriormente, as células foram tratadas durante 120 dias com uma concentração sub-letal do fármaco. O fenótipo de resistência foi determinado por PCR em tempo real (qPCR), visando investigar os níveis de transcritos que codificam proteínas anti- (Survivina e Bcl-xL) e pró- apoptóticas (Bad e Bax). A técnica de western blot (WB) foi utilizada para averiguar a expressão dos marcadores CD68 e transglutaminase-2 (TGase-2). Para a diferenciação em M ϕ , Mon ϕ foram tratados por 48 h com 320 nM de PMA, e os níveis de transcritos para citocinas pró- (TNF- α e IL-12) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF- β) foram analisados por qPCR. Para saber se a expressão de TGF- β é dependente de tempo, M ϕ tratados foram mantidos durante 10 dias sem a presença da droga e M ϕ parentais foram submetidos a um período de 48 h com a droga. Os dados obtidos demonstraram que o IC20 em Mon ϕ foi, inicialmente, de 25 nM e, após 6 meses de tratamento, aumentou para 50 nM. Ainda, após a diferenciação em M ϕ , foi observada uma sobrevida maior nos M ϕ tratados com relação aos parentais. O qPCR evidenciou que os níveis de transcritos para as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Survivina aumentaram nos M ϕ quimioresistentes. O WB revelou que M ϕ quimioresistentes expressam níveis significativamente maiores do marcador TGase-2, assim como a expressão do marcador CD68 em M ϕ aumentou com relação aos Mon ϕ . Os níveis protéicos de TGF- β no grupo mantido 10 dias sem tratamento permaneceu aumentado, enquanto o grupo que ficou durante um período de 48 h na presença da droga não houve diferença significativa quando comparado ao grupo controle. Com isso, nossos resultados revelaram que M ϕ quimioresistentes à CIS apresentam um perfil anti-inflamatório, caracterizado pela elevada expressão do marcador TGase-2 e das citocinas IL-10, IL-4 e TGF- β . Além disso, é possível concluir que a expressão aumentada de TGF- β é, de fato, um processo que ocorre após um longo período de quimioterapia e que se mantém mesmo se o tratamento for interrompido. Assim, sabendo-se que trabalhos recentes comprovaram que o TGF- β contribui para que células neoplásicas adquiram um fenótipo mais invasivo a partir da ativação do processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM), novos estudos serão necessários para confirmar se o

meio condicionado de M ϕ quimioresistentes ativa vias de sinalização associadas a TEM, o que pode caracterizar um novo mecanismo de imunomodulação em câncer.

Palavras chave: Macrófagos, Câncer, Quimioresistência, Cisplatina.

ABSTRACT**VICTÓRIA DE SOUSA CHAVES****PROPRIEDADES IMUNOMODULATÓRIAS E PRÓ-CARCINOGENÉICAS DE
MACRÓFAGOS HUMANOS RESISTENTES À CISPLATINA**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia e Imunologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

ORIENTADOR: LEONARDO FREIRE DE LIMA

Despite the development of therapeutic regimens, cancer treatment is still poor. This is due to a major obstacle that is the phenotype of drug resistance. In this context, it becomes more evident that different cells that constitute the tumor microenvironment modulate the acquisition of resistance and influence the progression of the cancer. More aggressive solid tumors, for example, have high levels of macrophages (M ϕ) which, like transformed cells, are subjected to the effects of chemotherapeutics and may acquire resistance, interfering with tumor progression. Thus, our goal is to induce resistance in human M ϕ and to verify its immunomodulatory and pro-carcinogenic potential. For this, monocytes (Mon ϕ) were treated with increasing doses of cisplatin (CIS) and toxicity was monitored by the MTT assay. Subsequently, the cells were treated for 120 days with a sub-lethal concentration of the drug. The resistance phenotype was determined by real-time PCR (qPCR), aiming to investigate the levels of transcripts encoding anti- (Survivin and Bcl-xL) and pro-apoptotic proteins (Bad and Bax). The western blot (WB) technique was used to ascertain the expression of the CD68 and transglutaminase-2 (TGase-2) markers. For differentiation in M ϕ , Mon ϕ were treated for 48 h with 320 nM PMA, and levels of transcripts for pro- (TNF- α and IL-12) and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10 and TGF- β) were analyzed by qPCR. To know whether the expression of TGF- β is time dependent, M ϕ treated were maintained for 10 days without the presence of drug and M ϕ parental were subjected to a 48 h period with the drug. The data obtained demonstrated that IC 20 in Mon ϕ was initially 25 nM and, after 6 months of treatment, increased to 50 nM. Moreover, after differentiation in M ϕ , a higher survival in the M ϕ treated with respect to the parents was observed. qPCR showed that the levels of transcripts for the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Survivin increased in the chemoresistant M ϕ . WB revealed that M ϕ chemoresistants express significantly higher levels of the TGase-2 marker, as well as expression of the CD68 marker in M ϕ increased with respect to Mon ϕ . Protein levels of TGF- β in the group maintained 10 days without treatment remained increased, while the group that stayed during a period of 48 h in the presence of the drug did not have significant difference when compared to the control group. Thus, our results revealed that M ϕ chemoresistants to CIS present an anti-inflammatory profile, characterized by high expression of the TGase-2 marker and the cytokines IL-10, IL-4 and TGF- β . In addition, it is possible to conclude that the increased expression of TGF- β is, in fact, a process that occurs after a long period of chemotherapy and that remains even if the treatment is interrupted. Thus, with recent work confirming that TGF- β contributes to neoplastic cells acquiring a more invasive phenotype from the activation of the epithelial-mesenchymal transition (TEM) process, further studies will be required to confirm whether the conditioned medium of M ϕ activates signaling pathways associated with TEM, which may characterize a new mechanism of immunomodulation in cancer.

Key words: Macrophages, Cancer, Chemoresistant, Cisplatin.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAFs	<i>Cancer-associated fibroblasts</i>
CIS	Cisplatina
CSCs	<i>Cancer stem cells</i>
ECs	<i>Endothelial cells</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Mϕ	Macrófago
Monϕ	Monócito
M1	Macrófagos pró-inflamatórios
M2	Macrófagos anti-inflamatórios
MEC	Matriz extracelular
MDR	<i>Multidrug resistant</i>
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i>
qPCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TGase-2	Transglutaminase-2
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WB	<i>Western blot</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer	1
1.2	Quimioterapia.....	3
1.2.1	Cisplatina.....	3
1.3	Resistência aos Quimioterápicos.....	4
1.3.1	Fenótipo de Resistência.....	4
1.3.2	Fenótipo MDR e Transição Epitélio-Mesenquimal	5
1.4	Efeito de quimioterápicos sobre a modulação de células do TME	8
1.5	Macrófagos e seu papel imunomodulatório	10
2	JUSTIFICATIVA	13
3	OBJETIVO GERAL	14
3.1	Objetivos Específicos	14
4	MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1	Linhagem Celular.....	15
4.2	Teste de Citotoxicidade.....	15
4.3	Protocolo de tratamento e análise do perfil do fenótipo de resistência	16
4.3.1	PCR em tempo real	16
4.4	Western blot	17
4.5	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	18
4.6	Análise Estatística	18
5	RESULTADOS	19
5.1	Avaliação do efeito citotóxico de CIS na linhagem THP-1	19
5.2	Análise da aquisição de resistência após tratamento prolongado com CIS em Mon ϕ	19
5.3	Avaliação da aquisição de resistência após o tratamento prolongado com doses sub-letais de CIS em M ϕ	20
5.4	Avaliação da expressão de CD68 em Mon ϕ e M ϕ	21
5.5	Análise da morfologia de M ϕ parentais e resistentes	22
5.6	Avaliação da expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas em M ϕ	22
5.7	Avaliação do perfil de citocinas em M ϕ tratados ou não com CIS	23

5.8	Avaliação da expressão de TGase-2 em Mon ϕ e M ϕ	24
5.9	Análise da expressão de TGF- β em M ϕ em períodos com e sem tratamento de CIS	25
6	DISCUSSÃO	27
7	CONCLUSÃO.....	32
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Hoje já se sabe que o desenvolvimento de um tumor depende da participação de diferentes populações celulares, que são metabolicamente programadas para garantir o seu crescimento (Klement, 2016). Muitos oncologistas defendem o conceito de ser uma doença heterogênea capaz de interferir em processos fisiológicos normais. Essa nova visão explica observações clínicas mal compreendidas, tais como a dormência tumoral, ou padrões de disseminação, que são afetados pela habilidade de diferentes populações de células neoplásicas induzirem inflamação, angiogênese e evasão do sistema imune (Enriquez-navaz *et al.*, 2016).

Quando o tumor sai do seu sítio primário e atinge outras áreas, caracteriza-se o processo de metástase, que é dependente da capacidade das células tumorais alcançarem o sistema linfático ou vascular e colonizar órgãos e/ou tecidos adjacentes ou distantes (Gatenby, 2009). Contudo, células circulantes de tumor podem não conseguir se estabelecer após invadirem novos sítios. Alguns estudos já demonstraram que as células que apresentam maior sucesso são as que dentro da população de um tumor exibem maior diversidade fenotípica e genética, sendo capazes de se adaptar ao novo ambiente (Suarez e Tsutsui, 2008). Populações fenotipicamente invasivas passam por uma espécie de gargalo genético, o qual a população é, a princípio, geneticamente homogênea e, após essa seleção, os invasores bem sucedidos podem passar por uma rápida evolução, o que resulta no aumento da diversidade de fenótipos e subpopulações com adaptações, o que favorece as possibilidades de manutenção nesse novo sítio e escape de mecanismos de defesa (Nei, Maruyama e Chakraborty, 1975). Esses fatores indicam que o desenvolvimento de metástase é dependente das propriedades fenotípicas das células circulantes de tumor, bem como das condições do microambiente tumoral (TME) no sítio metastático (Gatenby, Brown e Vincent, 2009) (**Figura 1**).

Câncer como Tecido Complexo

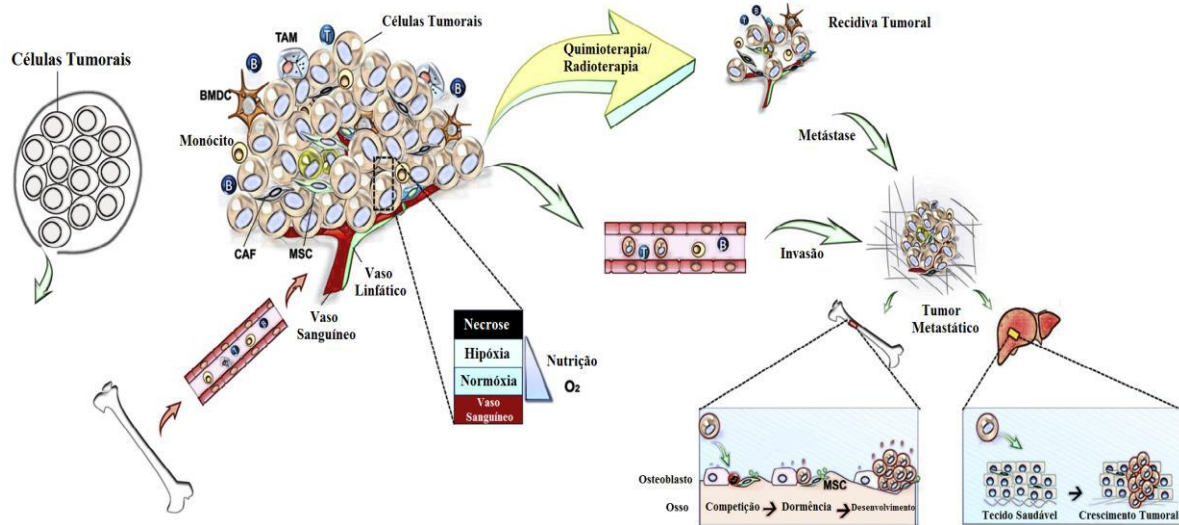


Figura 1. Esquema de evolução do câncer. O tumor é visto como um componente estranho que cresce como uma massa homogênea. O processo de metástase pode ser induzido diretamente pela invasão de células cancerígenas na corrente sanguínea. Abreviaturas: CAF, fibroblasto associado ao câncer; TAM, macrófago associado a tumor; BMDC, célula dendrítica derivada da medula óssea; MSC, células estromais mesenquimais; MEC, matriz extracelular. Adaptado de Hui e Chen, 2015.

A disseminação de células tumorais carrega um prognóstico sombrio e estima-se que seja a causa de morte de 90% dos pacientes com câncer. Apesar de a quimioterapia atual conseguir sucesso no tratamento em alguns pacientes com metástase, a maioria desses casos acaba sendo fatal (Gatenby, Brown e Vincent, 2009). As abordagens convencionais para terapia do câncer foram, até muito recentemente, baseadas na erradicação das células cancerosas através de três modalidades: cirurgia, radiação e quimioterapia (Røslund e Engelsen, 2015). No entanto, embora essas abordagens tenham apresentado uma melhora em crianças com leucemia linfoblástica aguda, onde a sobrevida aumentou de 20% em 1950 para 95% atualmente, elas foram pouco efetivas em tumores sólidos e em leucemias em adultos (Klement *et al.*, 2016).

Além disso, diferentes razões contribuíram para a resistência ao tratamento de diferentes tipos de câncer, mas entre elas está, principalmente, a complexidade genômica e a heterogeneidade dessas entidades, além do efeito protetivo do TME (Røslund e Engelsen, 2015). O tratamento de base molecular tem sido usado como uma nova perspectiva, o qual foca não somente na célula tumoral, mas também nas mudanças que a mesma induz neste microambiente. Nesse contexto, além de células dirigidas contra o tumor, existem diversas outras dirigidas contra receptores e fatores de crescimento endoteliais, além de células

inflamatórias e do sistema imune, por exemplo (Hanahan e Weinberg, 2011; Klement *et al.*, 2016).

Dessa forma, mecanismos usados pelas células tumorais para sobreviver se tornaram foco de estratégias do combate ao câncer, tais como angiogênese, células do sistema imune e vias regenerativas, que não eram considerados alvos de tratamento no passado (Quail e Joyce, 2013). Existe um amplo espectro de agentes para sua modulação, tais como inibidores de vias de fatores de crescimento, inibidores de angiogênese, indutores de sinais pró-apoptóticos, modificadores de resposta imune, inibidores de adesão, inibidores de proteassoma, inibidores de sinais de transdução, dentre outros (Klement *et al.*, 2016). Entretanto, os agentes quimioterápicos ainda são as principais classes de moléculas utilizadas no combate ao câncer (Egas-Bejar *et al.*, 2014).

1.2 Quimioterapia

Quimioterapia é a forma de tratamento sistêmica do câncer que faz uso de quimioterápicos, ou antineoplásicos, administrados em intervalos regulares que variam de acordo com os esquemas terapêuticos (INCA, 2017a). Os agentes antineoplásicos utilizados no tratamento do câncer podem afetar tanto as células normais como as neoplásicas, contudo, estas últimas acabam sofrendo o dano maior, principalmente, devido às diferenças metabólicas entre ambas (INCA, 2017b). Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, anti-metabólitos, antibióticos antitumorais, inibidores mitóticos, entre outros. Os agentes alquilantes são os antineoplásicos mais estudados e considerados os agentes antitumorais mais usados na atualidade (Almeida *et al.*, 2005).

1.2.1 Cisplatina

A cisplatina (CIS) faz parte do grupo de agentes alquilantes, que são capazes de substituir em uma molécula um átomo de hidrogênio por um radical alquil (INCA, 2017b). A CIS exerce sua atividade citotóxica pela formação de ligações cruzadas dentro e entre as cadeias do DNA. Essa interação platina-DNA forma uma ligação alquil, gerando adutos, ou novos compostos, que ativam várias respostas celulares, incluindo a sinalização do dano ao DNA, pontos de checagem do ciclo celular, reparo do DNA e morte celular (Dasari e Tchounwou, 2014). Estas ligações cruzadas entre DNA e CIS comprometem a replicação e transcrição, resultando na parada do ciclo celular e, eventualmente, apoptose. A apoptose, neste caso, é mediada pelo gene supressor de tumor p53, que ativa genes pró-apoptóticos e

reprimem genes anti-apoptóticos (Jamieson e Lippard, 1999; Wang e Lippard, 2005; Jiang e Dong, 2008). Entretanto, diversos mecanismos moleculares, como por exemplo, elevado efluxo celular, aumento da inativação e da tolerância celular já foram descritos em diferentes tipos de câncer, e estão sendo relacionados à resistência à CIS (Sorenson e Eastman, 1988; Skoweon, 2018).

1.3 Resistência aos Quimioterápicos

Apesar da grande eficácia dos antineoplásicos e os diversos avanços nos estudos que possibilitam uma melhora nos tratamentos contra o câncer, um dos maiores problemas relacionados à quimioterapia é a resistência às drogas. Esta resistência é proveniente do desenvolvimento de novas codificações genéticas, mutações, ou porque o tratamento contínuo acaba estimulando o desenvolvimento de tipos celulares resistentes, o que lhes permite seguir por vias metabólicas alternativas (Foo e Michor, 2014). A resistência também é observada nos casos em que o tratamento não é contínuo e a população tumoral ainda é sensível às drogas, porém, a quimioterapia acaba sendo aplicada em intervalos irregulares e, muitas vezes, em doses inadequadas (INCA, 2017b).

Usualmente, agentes quimioterápicos induzem a regressão do tumor através da apoptose, que é modulada por uma série de proto-oncogenes e genes supressores de tumor. No entanto, embora a sua utilização seja capaz de inibir o crescimento do tumor, muitos pacientes após o tratamento apresentam casos de recidiva (Sledge *et al.*, 2014), ou seja, o tumor reaparece e, geralmente, passa a ser constituído por células mais invasivas e resistentes a ação de quimioterápicos. Além disso, essas células passam a apresentar resistência a fármacos com diferentes estruturas e mecanismos de ação, o que determina o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) (Theodoulou e Kerr, 2015).

1.3.1 Fenótipo de Resistência

A resistência a drogas é um obstáculo que impede o sucesso das terapias contra o câncer. Em alguns casos, a recaída ocorre em pacientes inicialmente responsivos após repetitivos ciclos da quimioterapia (Huang *et al.*, 2013). Vários mecanismos conferem resistência a drogas, como por exemplo, diminuição da captação do quimioterápico, compartimentalização do fármaco, alteração dos alvos celulares, alterações dos pontos de *checkpoint* do ciclo celular, aumento do sistema de reparo, expressão de bombas de efluxo e inibição dos mecanismos de apoptose (Gottesman, 2002; Kartal-Yandim; Adan-Gokbulut; Baran, 2016).

Esse último mecanismo está relacionado à expressão diferencial de proteínas com propriedades pró (Bax e Bad) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl e survivina), sendo uma característica marcante e muito estudada em células quimioresistentes (Edlich, 2017). Sabe-se que células de vida longa em nosso organismo, como os linfócitos B de memória, neurônios e células que margeiam membranas basais, expressam proteínas anti-apoptóticas de forma exacerbada (Hockenbery *et al.*, 1991). Esse mesmo fenômeno é observado em células transformadas, em especial em células que apresentam resistência ao tratamento quimioterápico, como por exemplo, a CIS, a qual alguns estudos mostraram que as proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 auxiliam na indução da resistência a esta droga (Dai *et al.*, 2017). Estas proteínas são capazes de bloquear a apoptose mediada por p53, sendo isso um aspecto importante do seu papel na oncogênese (Chiou, Rao e White, 1994). A relação significativa dessas proteínas com a resistência primária à quimioterapia baseada em platina reforça o fato de que a superexpressão das mesmas pode influenciar a eficácia da CIS como indutor de apoptose. Assim, por conta dos níveis elevados dessas proteínas anti-apoptóticas, elas estão diretamente correlacionadas com a diminuição da sobrevida de pacientes com cânceres mais agressivos, principalmente por sua ação está relacionada à evasão da ação dos quimioterápicos (Kassim *et al.*, 1999).

Nesse contexto, alguns estudos vêm mostrando que quando ocorrem alterações na regulação desses processos apoptóticos, isso pode levar, ainda, ao aumento da expressão de fatores que induzem a transição epitélio-mesenquimal (TEM), resultando não apenas no fracasso da terapia, mas também na ativação da cascata metastática (Kajiyama, 2007).

1.3.2 Fenótipo MDR e Transição Epitélio-Mesenquimal

O progresso de células tumorais de um fenótipo não invasivo para um invasivo e maligno ocorre através de uma série de etapas que definem o processo de TEM (Zhou *et al.*, 2017) (**Figura 2**). Esse evento é caracterizado por mudanças na morfologia, alterações na produção de proteases, tal como as metaloproteinases (MMPs), pela diminuição da expressão de marcadores epiteliais (E-caderina e desmaplaquina) e aumento dos mesenquimais (N-caderina, vimentina e fibronectina) (Kajiyama, 2007).

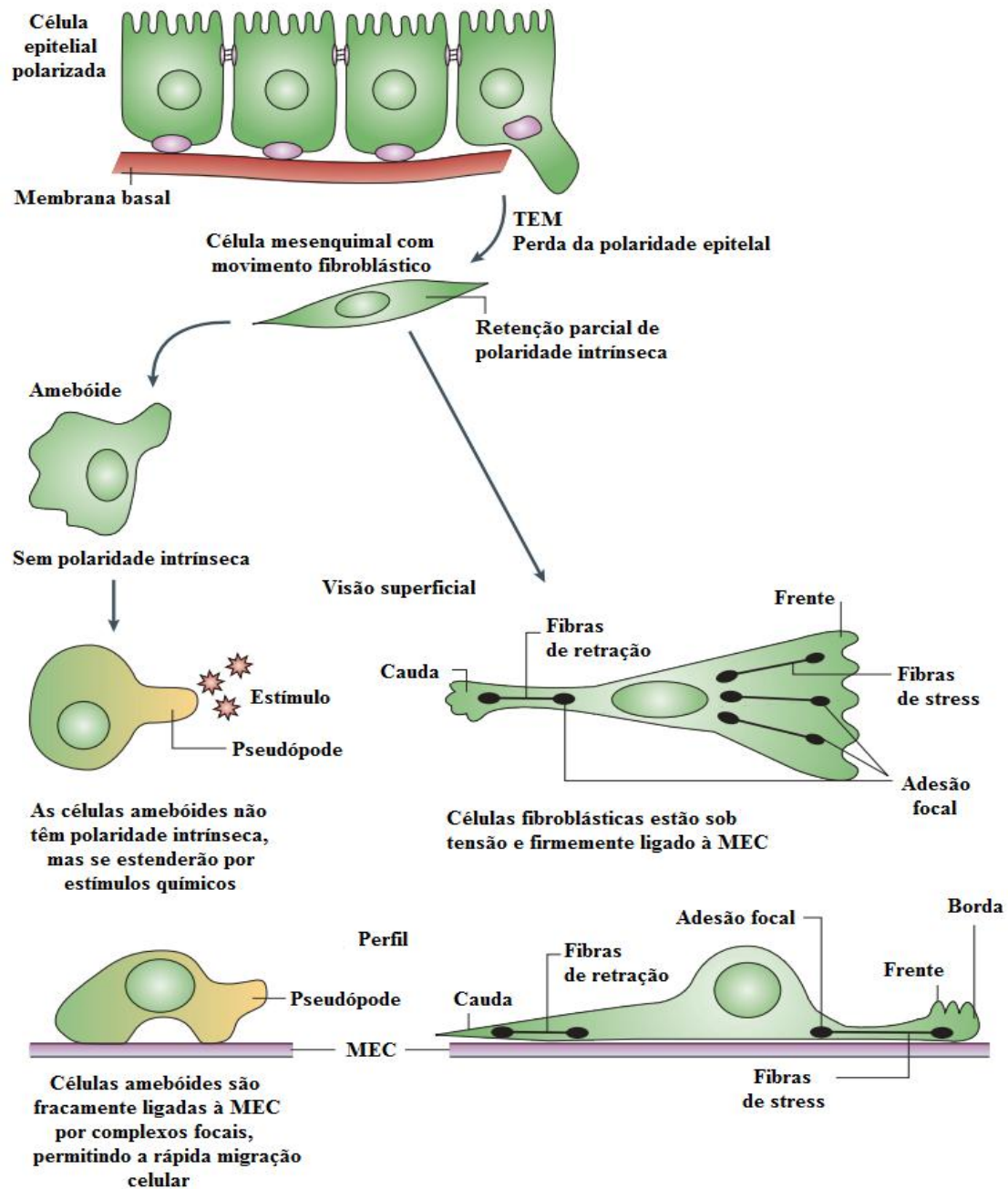


Figura 2. Processo de transição epitélio mesenquimal. Durante a TEM, as células tumorais sofrem uma perda de polaridade intrínseca e perdem as junções célula-célula que são necessárias para a integridade do epitélio. Esses eventos requerem extensa reorganização do citoesqueleto e iniciação da motilidade celular baseada em actina. As células que retêm parcialmente sua polaridade ainda têm uma cauda que contém fibras de retração e uma frente que contém fibras de tensão e pode formar aderências focais e, assim, podem se ligar à MEC. Por outro lado, as células que perdem toda a polaridade são caracterizadas como "amebóides". Estas células podem quimiotaxar em direção a estímulos e, além disso, se ligam fracamente à MEC, permitindo uma rápida migração. Desta forma, estudos propõem que à medida que a TEM progride, a perda completa da polaridade das células epiteliais intrínsecas e a aquisição de locomoção aleatória de amebóides são alcançadas, o que pode resultar em um fenótipo amebóide extremamente desdiferenciado da célula de carcinoma invasivo. Adaptado de Condeelis e Segall, 2003.

De acordo com a literatura, a TEM é induzida por uma série de fatores de crescimento envolvidos em processos de progressão tumoral como VEGF, TGF- β ou EGF (Yang *et al.*, 2006a). Entre estes, o TGF- β recebeu grande atenção por ser um dos principais indutores de TEM durante a embriogênese, a progressão tumoral e fibrose. Consequentemente, a TEM induzida por TGF- β é mais entendida do que TEM em resposta aos demais fatores (Zhou *et al.*, 2017). O TGF- β exerce inúmeras funções biológicas, como proliferação celular, morte celular programada, desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, migração celular e controle de respostas imunes. No entanto, enquanto células cancerosas acumulam alterações genéticas e epigenéticas em diferentes estágios da progressão tumoral, elas começam a não responder a inibição de crescimento mediada por TGF- β . Dessa forma, o aumento progressivo local e sistêmico da citocina TGF- β promove a mudança para um fenótipo invasivo e metastático (Mercado-Pimentel e Runyan, 2007; Konge *et al.*, 2018).

Vários estudos, ainda, indicam que células de câncer em TEM exibem características similares a células-tronco, nas quais essas células tronco cancerosas (CSCs) possuem a habilidade de se auto-renovarem e, assim, a capacidade de continuarem se expandindo em uma sub-população maligna com propensão de metástase e resistência à drogas (Du *et al.*, 2017). Assim, com relação à quimioresistência, estes dados demonstram que existe um link muito próximo entre TEM e a sensibilidade a fatores de crescimento e agentes quimioterápicos (Wang *et al.*, 2009b).

Muitos estudos, com isso, vêm tentando mostrar essa ligação entre o fenótipo TEM e a quimioresistência (Wang *et al.*, 2009b). Já foi relatado que tanto células de câncer colorretal resistentes à oxaliplatina (Yang *et al.*, 2006b), quanto células de tumor ovariano resistentes a paclitaxel apresentam alterações fenotípicas consistentes com a TEM, apresentando reduzida expressão da molécula de adesão epitelial, E-caderina, e aumento dos marcadores mesenquimais, como vimentina e fibronectina (Kajiyama *et al.*, 2007). Além dessas, células de câncer de mama resistentes ao tamoxifeno também mostraram características morfológicas alteradas, semelhantes às que ocorrem durante a TEM, como a fosforilação alterada de β -catenina (Hiscox *et al.*, 2006). Estudos anteriores, ainda, mostraram que células de câncer pancreático resistentes à gencitabina adquiriram, do mesmo modo, características de TEM (Shah *et al.*, 2007). Recentemente, foram relatadas alterações fenotípicas, como a formação de células fusiformes e aumento da formação de pseudópodes, sugerindo que o processo de TEM ocorreu em células de câncer de pulmão resistentes ao gefitinibe. Nesse estudo, os autores também observaram diminuição na expressão de E-caderina e aumento da expressão de

vimentina (Rho *et al.*, 2009). Esses estudos claramente fornecem fortes evidências ligando a quimiorresistência à TEM, contudo, o mecanismo exato para a aquisição do fenótipo TEM continua a ser elucidado (Wang *et al.*, 2009b).

1.4 Efeito de quimioterápicos sobre a modulação de células do TME

Como já foi dito anteriormente, o atual tratamento de tumores sólidos possui um grande obstáculo que é a resistência a drogas. Apesar do constante desenvolvimento de esquemas terapêuticos meticulosamente projetados, as células cancerígenas permanecem não sendo eliminadas completamente (Hazlehurst, Landowski e Dalton, 2003). Como a resistência é um problema com o fármaco utilizado na terapia do câncer, a maioria dos estudos sobre esse fenômeno tem se concentrado no papel das próprias células cancerígenas. No entanto, está se tornando cada vez mais evidente, que no TME, outros tipos celulares podem conferir resistência as células neoplásicas e/ou adquirir resistência a distintas classes de agentes quimioterápicos, e assim modularem importantes etapas da progressão do câncer (Farmer *et al.*, 2009; Cukierman e Khan, 2010; Cassetta e Pollard, 2018).

O TME é complexo e constituído por diferentes componentes. Além das células tumorais, o TME é composto por células endoteliais (ECs), matriz extracelular (MEC), moléculas sinalizadoras e outras células não malignas, tais como as células do sistema imune (Hui e Chen, 2015) (**Figura 3**).

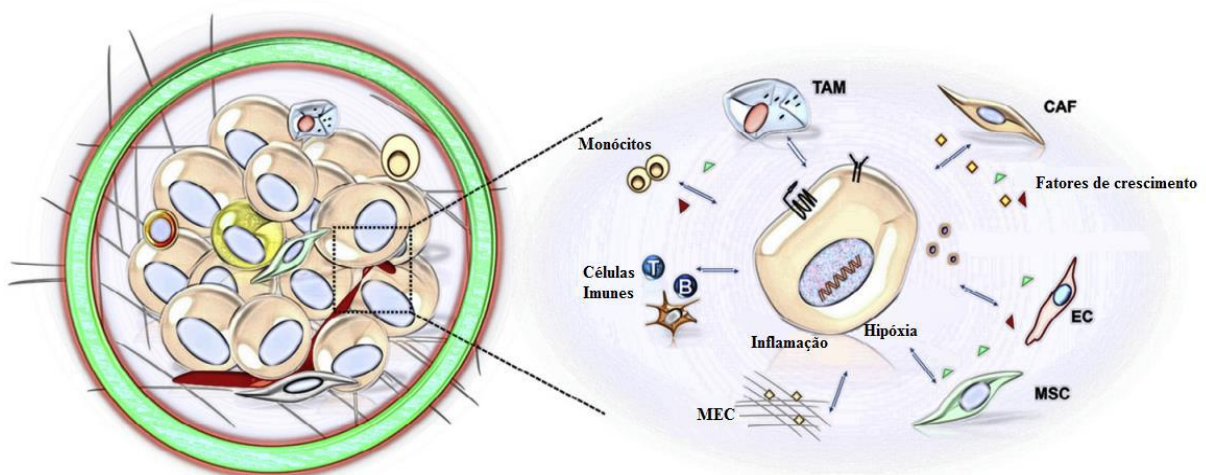


Figura 3. Microambiente tumoral. Dentro do TME, células tumorais malignas e células não malignas interagem ativamente entre si e, assim, tornam o microambiente favorável ao crescimento do tumor. Adaptado de Hui e Chen, 2015.

Assim, pelo fato de existirem poucas informações sobre o papel funcional dos diferentes tipos celulares que constituem o TME, estudos nessa área são de fundamental importância para a identificação de novas estratégias terapêuticas. No entanto, com os avanços nesta área, surgem novos desafios, sendo um dos principais, identificar e direcionar “nós” no TME cada vez mais complexos e interconectados. De fato, dado que o TME e as principais vias de sinalização são amplamente diversificadas entre diferentes tipos de tumor e tecidos, pontos que discutem sobre como administrar essa diversidade e como diferentes TMEs podem alterar a resposta às terapias, serão importantes áreas de estudo daqui para frente. Outra questão pouco explorada neste campo é como o TME pode ser educado e esculpido por um condutor oncogênico específico nas células tumorais e como isso pode resultar na diversidade celular estromal, ainda que dentro do mesmo tecido (Quail e Joyce, 2013).

Neste contexto, temos como exemplo estudos que mostram que fibroblastos estromais funcionam como uma importante fonte de quimioatraentes, os quais facilitam a resistência aos quimioterápicos, o que, por consequência, favorece a motilidade de células tumorais e o desenvolvimento de metástases (Wang *et al.*, 2009a). Além deles, evidências têm demonstrado que ECs isoladas de tumores humanos são menos sensíveis ao tratamento (Xiong *et al.*, 2009; Dudley e Klagsbrun, 2009), sugerindo que a resistência adquirida pelas ECs pode desempenhar um papel na resposta terapêutica global à quimioterapia (Huang *et al.*, 2013).

Com isso, ao longo dos últimos anos, muitos trabalhos descrevem o TME como um dos grandes responsáveis pela progressão do câncer, inclusive pela sua influência na resposta terapêutica. Tumores sólidos mais agressivos, por exemplo, possuem altos níveis de células mielóides infiltradas, principalmente macrófagos associados a tumor (TAM), representando grande parte da massa tumoral (Solinas *et al.*, 2009). Estas células mielóides infiltrantes são mediadores chaves da imunossupressão, neovascularização, invasão, metástase e fraca resposta à terapia. Monócitos ($\text{Mon}\phi$) circulantes são recrutados para o tecido tumoral, podendo ser polarizados em macrófagos ($\text{M}\phi$) com os fenótipos M1 ou M2. Contudo, estudos mostram que $\text{Mon}\phi$ derivados do sangue periférico infiltram o tecido tumoral e se polarizam, majoritariamente, em $\text{M}\phi$ com fenótipo M2, expressando CD206 e transglutaminase-2 (TGase-2) (Röszer, 2015; Rebelo *et al.*, 2018). Esses TAMs que foram relacionados ao fenótipo M2, exercem, assim, a indução de efeitos pró-tumorais tais como indução da proliferação, angiogênese, remodelação da MEC, evasão da imunidade adaptativa e ativação

da TEM (Mantovani *et al.*, 2002). Em contrapartida, M ϕ M1 possuem um efeito supressor de tumor, exercendo atividade citotóxica em células tumorais, e promovendo reações destrutivas das mesmas (Mantovani *et al.*, 2004; Rebelo *et al.*, 2018).

Dessa forma, os M ϕ podem exercer dupla função no câncer, uma vez que o seu fenótipo pode ser modulado em resposta a diferentes sinais presentes no TME, tal como citocinas e componentes de MEC. Como citado anteriormente, trabalhos recentes especularam e/ou demonstraram que a resistência adquirida aos fármacos utilizados no tratamento das neoplasias pode influenciar não somente o comportamento das células transformadas, mas também de outros tipos celulares que fazem parte do tumor (Mantovani *et al.*, 1992). É por este motivo que a plasticidade é uma importante característica dos M ϕ , sobretudo no que se refere aos seus estados de ativação, na qual seu fenótipo e função serão direcionados por meio da pressão exercida pelo microambiente. Com isso, a dissecação da diversidade fenotípica e funcional dos M ϕ que constituem o TME será um projeto essencial para estratégias contra doenças humanas específicas (Mantovani e Locati, 2013).

1.5 Macrófagos e seu papel imunomodulatório

Macrófagos são importantes componentes da imunidade inata, e estão envolvidos com a resposta imune contra patógenos e processos inflamatórios. São células dinâmicas caracterizadas por sua grande diversidade e plasticidade, que sofrem polarização reversível e dependente do seu microambiente na presença de infecções agudas ou crônicas (Liu *et al.*, 2014). Assim, como já foi abordado, Mon ϕ são recrutados da circulação e adentram o tecido, onde se diferenciam em M ϕ com fenótipos distintos, de acordo com fatores presentes no local, sendo, então, categorizados em pró-inflamatórios ou classicamente ativados (M1) e em anti-inflamatórios ou alternativamente ativados (M2), que se diferem em termos de receptores, estímulo de citocinas e expressão de quimiocinas (Sica e Mantovani, 2012).

Os M ϕ M1 foram descritos como responsivos a dois sinais: citocinas inflamatórias do tipo 1 e produtos microbianos (Mackaness, 1964). Desta forma, são ativados por produtos microbianos ou IFN- γ , e produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-23, IFN- γ , IL-18, TNF- α . Os M ϕ M2, por sua vez, são ativados por citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, e produzem VEGF, IL-6, IL-10 e TGF- β agindo no reparo e remodelação tecidual, além da angiogênese, contribuindo potencialmente à progressão tumoral (Stein *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2007). Ainda dentro desta classificação, os M ϕ M2 foram caracterizados pela expressão funcional de marcadores alternativos de ativação. Por este motivo, incluem três subconjuntos:

M2a, induzido por IL-4 ou IL-13; M2b, induzida por complexos imunes e agonistas de receptores TLR ou IL-1; e M2c, induzida por IL-10 e hormônios glicocorticóides (Mantovani *et al.*, 2004) (**Figura 4**).

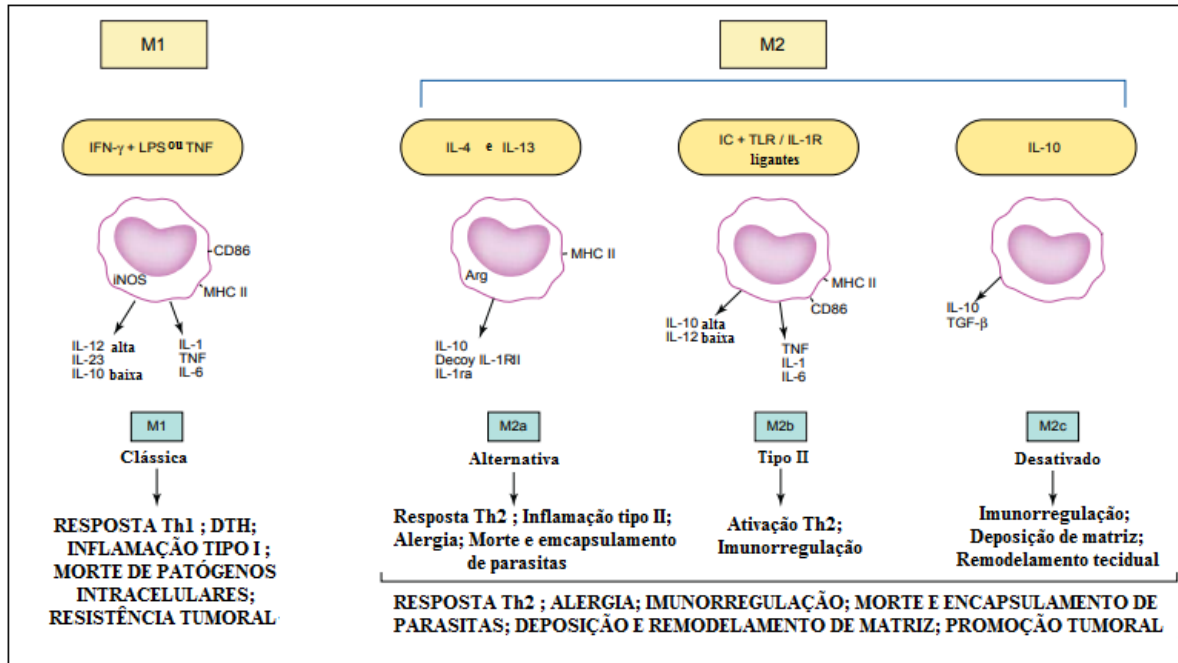


Figura 4. Indutores e propriedades funcionais de diferentes populações de M ϕ polarizados. Os M ϕ polarizam e adquirem diferentes propriedades funcionais em resposta a sinais derivados do ambiente. A exposição de M ϕ a IFN- γ e LPS conduz a polarização M1, com propriedades citotóxicas e antitumorais potencializadas, enquanto M ϕ M2 são em geral mais propensos a atividades imunorreguladoras e pró-tumorais. Em particular, M2a (induzida pela exposição a IL-4 e IL-13) e M2b (induzidas por exposição combinada a imuno complexos e agonistas de TLR ou IL-1R) exercem funções imunorreguladoras e promovem resposta tipo II, ao passo que M ϕ M2c (induzidos por IL-10) estão mais relacionados à supressão das respostas imunes e remodelação tecidual. Abreviaturas: DTH, hipersensibilidade tardia; IC, imuno complexos; iNOS, óxido nítrico sintase indusível; LPS, lipopolissacarídeo; TLR, receptor do tipo Toll. Adaptado de Mantovani *et al.*, 2004.

Como comentado anteriormente, as células tumorais possuem um alto grau de heterogeneidade genética e forma uma complexa sociedade. Por este motivo, a variedade fenotípica e funcional dos M ϕ pode se expandir no contexto de diversidade do microambiente tumoral (Mosser e Edwards, 2008). Assim, embora os M ϕ sirvam como uma das principais linhas de defesa contra patógenos e induzem mudanças no ambiente por meio da liberação de mediadores antimicrobianos, tais como citocinas, eles também desempenham uma função essencial no ajuste fino das respostas inflamatórias que estão associadas com processos de reparação e remodelação tecidual. Desta forma, a complexidade do ambiente tecidual pode tornar os M ϕ , que já possuem uma grande plasticidade e diversidade funcional, capazes de adquirirem propriedades pró e/ou anti-inflamatórias (Jinushi e Komohara, 2015).

Ao longo dos últimos dez anos, diversos estudos comprovaram que M ϕ alternativamente ativados ou M2 representam a maior parte da população leucocitária em tumores (Hagemann *et al.*, 2006; Campesato, 2015; Chen *et al.*, 2018). Neste contexto, sabendo que a inflamação é um componente crítico do microambiente maligno, M ϕ M2 e suas citocinas liberadas (por exemplo, IL-10 e TGF- β) podem participar em todos os aspectos da invasão de células tumorais e metástase (Liu *et al.*, 2013). Dessa forma, a infiltração de M ϕ em tumores desempenha um papel muito importante na regulação do crescimento do mesmo, bem como na resposta a fármacos (Pollard, 2004). Contudo, ainda não existem relatos na literatura sobre as possíveis propriedades imunomodulatórias de agentes quimioterápicos sobre essas células.

2 JUSTIFICATIVA

O fenótipo de resistência a drogas é um obstáculo ao tratamento do câncer. As células resistentes, além de se tornarem refratárias às moléculas induzidas por agentes quimioterápicos, apresentam fenótipos mais invasivos e secretam sinais capazes de influenciar o TME. Este microambiente é composto por células neoplásicas, componentes de MEC, células estromais e inflamatórias como os M ϕ , que representam a população leucocitária mais abundante deste nicho. Entretanto, embora se saiba que no TME, os M ϕ são reeducados pelas células neoplásicas e passam a secretar sinais e expressar moléculas com propriedades pró-carcinogênicas, ainda não existem relatos na literatura sobre as possíveis propriedades imunomodulatórias de agentes quimioterápicos sobre essas células. Assim, pelo fato dos M ϕ serem importantes reguladores da tumorigenese, possuírem meia vida longa (meses ou anos) e estarem sujeitos à ação de agentes quimioterápicos, seria plausível imaginar, que tais células podem se tornar quimiorresistentes e produzir sinais capazes de modular o comportamento de vários tipos celulares que constituem o tumor.

3 OBJETIVO GERAL

Induzir resistência à CIS em macrófagos humanos derivados de Mon ϕ da linhagem THP-1, e verificar seu potencial imunomodulatório e pró-carcinogênico.

3.1 Objetivos Específicos

1. Manter Mon ϕ da linhagem THP-1 em concentrações sub-letais de CIS e, através do teste de citotoxicidade, encontrar a concentração que inibe cerca de 20% do crescimento das células (IC20);
2. Induzir resistência a CIS em Mon ϕ da linhagem THP-1 com o IC20 do quimioterápico, durante 6 meses de tratamento, seguindo o protocolo de tratamento explicado na metodologia;
3. Diferenciar Mon ϕ da linhagem THP-1 resistentes ou não à CIS em M ϕ e averiguar se a resistência adquirida se mantém após este processo, através do teste de citotoxicidade;
4. Analisar se há alteração na expressão do marcador CD68 em Mon ϕ e em M ϕ após os processos de diferenciação e aquisição de resistência, através da técnica de western blot (WB);
5. Analisar a morfologia de M ϕ parentais e M ϕ resistentes;
6. Avaliar a expressão de proteínas anti- (Bcl-x1 e Survivina) e pró-apoptóticas (Bad e Bax), através da técnica de PCR em tempo real (qPCR);
7. Avaliar a expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias em M ϕ quimioresistentes ou não, através da técnica de qPCR;
8. Monitorar a polarização para um perfil M2 em M ϕ resistentes, através da análise da expressão do marcador TGase-2 pela técnica de WB;
9. Determinar a expressão elevada de TGF- β em M ϕ quimioresistentes e avaliar se este fenômeno é dependente do tempo, através de ensaio imunoenzimático (ELISA).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagem Celular

O projeto foi desenvolvido com a linhagem de Monó THP-1(ATCC), derivada de paciente acometido com leucemia. As células foram cultivadas a 37°C/ 5% CO₂ em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), bicarbonato de sódio (2.0 mg/L), penicilina (100 IU/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), sendo realizada três passagens semanais. As linhagens foram tratadas ou não com concentrações sub-letais de CIS (Cayman Chemical), até que as mesmas tenham adquirido certo grau de resistência, que foi monitorado a partir do ensaio de MTT (Sigma-Aldrich) (Hung *et al.*, 2014).

4.2 Teste de Citotoxicidade

O método colorimétrico quantitativo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Mosmann, 1983) foi utilizado para mensurar a viabilidade celular e encontrar o valor do IC₂₀. Esse método se baseia na redução do composto MTT pelas desidrogenases mitocôndrias de células metabolicamente ativas a cristais de formazan. Logo, o número de células viáveis é diretamente proporcional a quantidade de cristais formados. Para o experimento, as células (3×10^4 /poço – volume final de 200 µl) foram plaqueadas em placas de 96 poços, e mantidas na presença ou ausência de concentrações crescentes de CIS (200 µM – 1,5625 µM). Após 48 h, 20 µl de uma solução de MTT (5mg/ml) foram adicionados às células e estas foram incubadas por 3-4 h a 37°C/ 5% CO₂, sem a presença de luz. Após esse tempo, 200 µl de DMSO (Sigma-Aldrich) foram adicionados aos poços para dissolver os cristais de formazan, produzindo uma solução homogênea. A densidade óptica, então, foi aferida com um comprimento de onda de 490 nm.

Para avaliar a viabilidade dos Mφ, os Monó da linhagem THP-1 (5×10^4 /poço – volume final 200 µl) foram plaqueados em placas de 96 poços, e tratados durante 48 h com 320 nM de Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA) para induzir a diferenciação Monó -Mφ. Posteriormente, as células foram tratadas por 48 h com concentrações crescentes (1,6 mM – 0,025 mM) de CIS, e a viabilidade celular monitorada pelo ensaio de MTT como descrito acima.

4.3 Protocolo de tratamento e análise do perfil do fenótipo de resistência

Para obter Mon ϕ quimioresistentes, as células foram tratadas por 6 meses com a concentração sub-letal de 25 μ M de CIS, que foi selecionada como o IC20 pelo ensaio de viabilidade celular. Durante este período, foram realizadas três passagens semanais. A capacidade das células se tornarem refratárias ao efeito citotóxico da CIS foi verificada pelo teste de MTT como citado no item 4.2. A aquisição do fenótipo de resistência a drogas em M ϕ foi investigada pelas técnicas de qPCR.

4.3.1 PCR em tempo real

Amostras de RNA oriundas das linhagens resistente e parental foram extraídas e purificadas utilizando mini colunas QIAshredder e Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Para a realização do PCR em tempo real, o RNA total foi obtido como descrito acima, e o cDNA foi preparado a partir de 2 μ g de RNA com o auxílio do kit SuperScript III first-strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) e do oligo-dT primer. O PCR foi realizado utilizando o aparelho Applied Biosystems StepOnePlus system de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Pares de primers: forward e reverse (**Tabela 1**) para as citocinas TGF- β , IL-10, IL-4, IL-12 e TNF- α e proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bad) e anti-apoptóticas (Survivina e Bcl-xL) foram utilizados nas reações.

Tabela 1. Lista de pares de primers usados nas reações de PCR em tempo real

Proteínas	Sequência de Primers
BAX F	CCTTCCCCTGCTTTCATGG
BAX R	ACCACCAGTCCCACATACAG
BAD F	CCG AGT GAG CAG GAA GAC TC
BAD R	GGT AGG AGC TGT GGC GAC T
BCL-XL F	CTG AAT CGG AGA TGG AGA CC
BCL-XL R	TGG GAT GTC AGG TCA CTG AA
SURVIVINA F	ACCGCATCTCTACATTCAAG
SURVIVINA R	CAAGTCTGGCTCGTTCTC
IL-4 F	ACTTTGAACAGCCTCACAGAG
IL-4 R	TTGGAGGCAGCAAAGATGTC
IL-10 F	GGTTGCCAAGCCTTGTCTGA
IL-10 R	AGGGAGTTCACATGCGCCT
TGF- β F	TACCTGAACCCGTGTTGCTC
TGF- β R	CCGGTAGTGAACCCGTTGAT
IL-12 p40 F	TGTGCTGGTTTTATCTTTTGTG
IL-12 p40 R	TTGGGTCTATTCCGTTGTGT
TNF- α F	CCGAGGCAGTCAGATCATCTT
TNF- α R	AGCTGCCCTCAGCTTGA

4.4 Western blot

Para a realização do WB, M ϕ induzidos ou não a resistência foram plaqueados em placas de seis poços (200.000 células/poço). Após esse processo, as células foram lisadas em solução RIPA (1% Triton X-100; 150 mM pirofosfato tetrasódico; 25 mM tris, pH 7,4; 5,0 mM EDTA; 0,5% de deoxicolato de sódio; 50 mM fluoreto de sódio; 1 mM Na₃VO₄; 2,0 mM fluoreto fenilmetilsulfonil e 0.076 unidade/ml de aprotinina). A concentração de proteínas foi determinado usando um kit de ensaio de proteína microBCA (Pierce), com BSA como padrão. Vinte microgramas de proteínas foram submetidas à SDS/PAGE, e subsequentemente, transferidas para membranas de nitrocelulose como previamente descrito (Freire-de-Lima *et al.*, 2011). As membranas foram bloqueadas em solução Tris salina (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl) com 0,05% (v/v) Tween (TBST) contendo 5% (v/v) de leite desnatado. As membranas foram, então, incubadas com anticorpos primários direcionados contra as proteínas de interesse overnight à 4°C. Após o tratamento com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas, incubadas por 1 h com o anticorpo secundário apropriado e revelados usando ECL (GE Healthcare, USA). Na tabela abaixo (**Tabela 2**) estão descritos os anticorpos utilizados no processo:

Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados para Western blot

Anticorpos
Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase (GAPDH) Santa Cruz Biotechnology Clone:0411 Catálogo: 47724 Diluição: 1:5000
Transglutaminase-2 (TGase 2) Santa Cruz Biotechnology, Clone: H237 Ccatálogo: sc20621, Diluição: 1:1000
CD68 Santa Cruz Biotechnology Clone: H285 Catálogo: 9139 Diluição: 1:5000

4.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A fim de avaliar a expressão de TGF- β (Bioscience), placas de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com 100 μ l/ poço (4 μ g/mL) dos anticorpos de captura (Santa Cruz) e incubadas overnight a 4° C. Os poços foram lavados 2 vezes com PBS pH 7,2; TWEEN-20 0,025 % (PBS/ TWEEN) e bloqueados com PBS suplementado com 10% de SFB (PBS/ 10 % SFB) num volume de 200 μ l/poço. As placas foram mantidas em repouso por 2 h a 37° C e lavadas 3 vezes com PBS/TWEEN. Posteriormente, foram adicionados aos poços, os padrões diluídos em PBS/10% SFB e 50 μ l dos sobrenadantes das culturas de M ϕ oriundos de Mon ϕ parentais ou quimioresistentes. As placas foram cobertas e incubadas overnight a 4° C. Após lavar as placas 4 vezes com PBS/ TWEEN, 100 μ l (4 μ g/ mL), os anticorpos de detecção (Santa Cruz) foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente, e lavadas 6 vezes com PBS/TWEEN. Posteriormente, em cada poço foi adicionado 100 μ l de estreptoavidina-fosfatase alcalina (1 μ g/mL) diluída em PBS suplementado com 10% de SFB. As placas foram incubadas por 3 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas 8 vezes com PBS/TWEEN e foi adicionado, em cada poço, 100 μ l da solução 1,0 mg/mL do substrato ácido bis-azina etil benzotiazolino sulfônico (Sigma) diluído em em Tris 20 mM, MgCl₂ 100 mM. As leituras foram realizadas em leitor Beckman Coulter AD 340 com filtro de 405 nm (Freire-de-Lima *et al.*, 2017).

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5, empregando o teste t de Student.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito citotóxico de CIS na linhagem THP-1

Para avaliar o efeito citotóxico de CIS, células da linhagem THP-1 foram tratadas com doses crescentes (1,5625 μM – 200 μM) da mesma. Após 48 h, a viabilidade celular foi monitorada pelo ensaio de MTT. Como observado na **Figura 5**, o IC20 para CIS foi de aproximadamente 25 μM . Os resultados obtidos a partir desse ensaio nos permitiram eleger essa concentração (25 μM) como dose sub-letal para os experimentos futuros de indução de resistência.

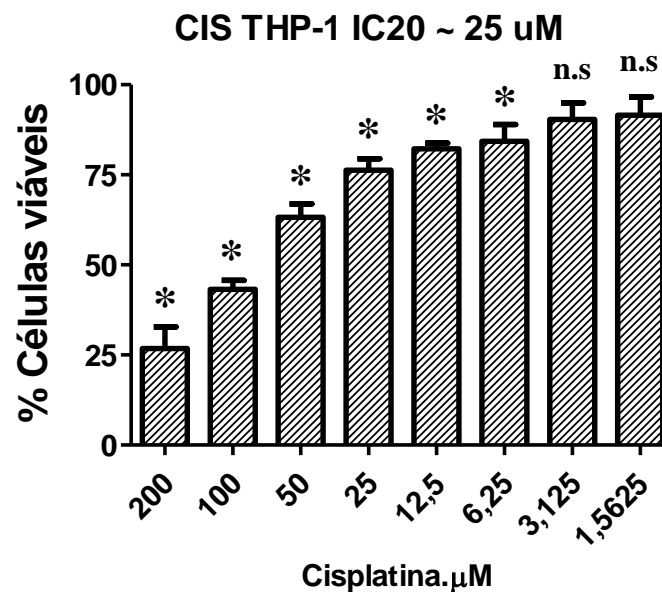


Figura 5. Teste de viabilidade celular. Mon ϕ THP-1 foram mantidos na presença de doses crescentes (1,5625 – 200 μM) de CIS e, após 48 h, o efeito citotóxico foi investigado pelo ensaio de MTT. Os dados nos permitiram determinar que o IC20 do fármaco é de ~ 25 μM . Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são mostrados como a média + SD de três experimentos. * $p \leq 0.05$; n.s. não significativo.

5.2 Análise da aquisição de resistência após tratamento prolongado com CIS em Mon ϕ

Durante 6 meses, células THP-1 foram tratadas com a dose sub-letal de 25 μM de CIS. Após esse período, para avaliar a aquisição de resistência, estas células foram submetidas novamente a doses crescentes do fármaco (1,5625 – 1600 μM) e, após 48 h, a viabilidade celular foi monitorada pelo ensaio de MTT. Embora o IC50 ainda não tenha sido calculado, os dados na **Figura 6** demonstram claramente que após os 6 meses de tratamento, as células tornaram-se mais resistentes a CIS, uma vez que necessitaram de doses mais elevadas de

quimioterápico para promover redução na viabilidade celular. O IC₂₀ estimado foi de aproximadamente 50 μ M.

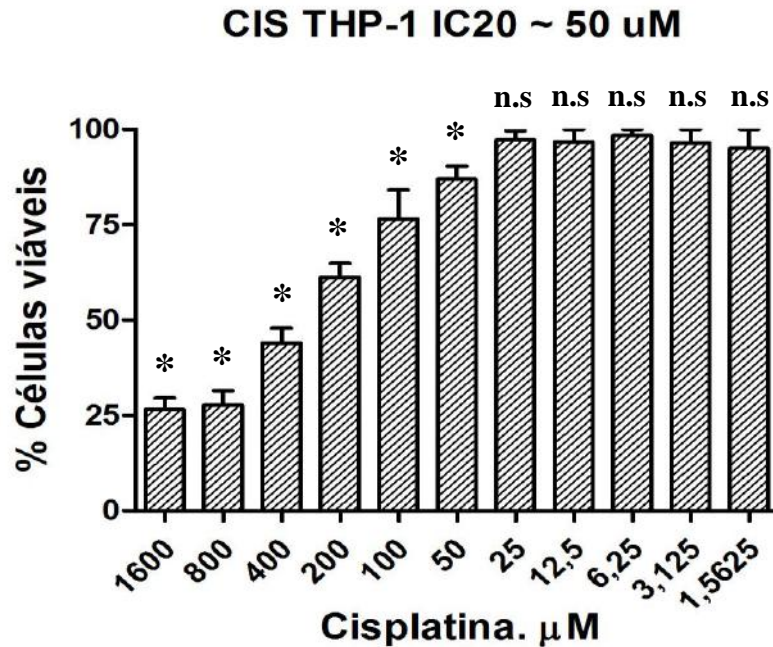


Figura 6. Avaliação do efeito citotóxico na linhagem induzida à resistência. Células expostas à concentração sub-letal de CIS foram tratadas durante 48 h com concentrações crescentes (1,5625 – 200 μ M) e o efeito citotóxico foi investigado pelo ensaio de MTT. Os resultados demonstraram que as células tratadas tornaram-se mais resistentes às concentrações citotóxicas do fármaco, uma vez que apresentaram IC₂₀ superior (50 μ M) em relação ao primeiro teste feito há 6 meses antes (item 1). O gráfico apresenta a média + SD de três experimentos em triplicata. * $p \leq 0.05$; n.s. não significativo.

5.3 Avaliação da aquisição de resistência após o tratamento prolongado com doses sub-letais de CIS em M ϕ

Para avaliar se a aquisição de resistência à CIS se mantinha após o processo de diferenciação, Mon ϕ da linhagem THP-1 tratados ou não com CIS foram diferenciados em M ϕ . Após esse processo, estes foram tratados com doses sub-letais (0,025 – 1,6 mM) do fármaco e, passado 48 h, a viabilidade celular foi monitorada pelo ensaio de MTT. Embora o IC₅₀ não tenha ainda sido calculado, os resultados apresentados na **Figura 7**, demonstram claramente que após o processo de diferenciação Mon ϕ -M ϕ , as células que foram mantidas por 6 meses na presença de CIS (25 μ M) (**Fig. 7b**) apresentaram-se mais resistentes ao quimioterápico quando comparadas as células parentais (**Fig. 7a**).

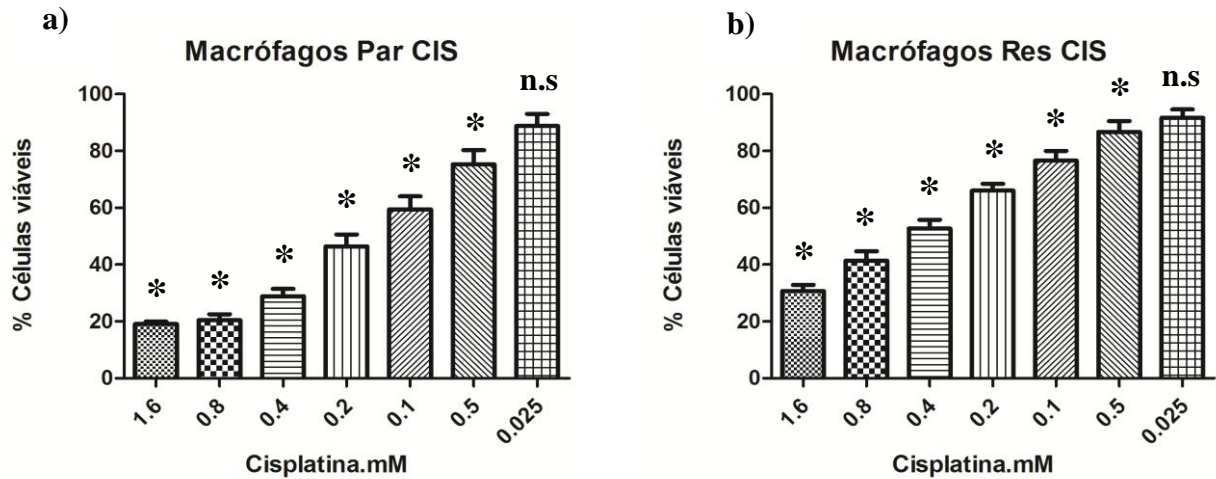


Figura 7. Avaliação do efeito citotóxico em Mφ induzidos à resistência. O efeito citotóxico em Mφ expostos durante 48 h à concentrações sub-letais (0,025 – 1,6 mM) de CIS foi investigado pelo ensaio de MTT. **a)** Mφ derivados de Monφ parentais na presença de doses sub-letais de CIS. **b)** Mφ derivados de Monφ resistentes na presença de doses sub-letais de CIS. Os resultados demonstraram que os Mφ derivados de Monφ tratados durante 6 meses com CIS tornaram-se mais resistentes às concentrações citotóxicas deste fármaco, uma vez que a porcentagem de células resistentes viáveis (**b**) foi superior a de células parentais viáveis (**a**), na presença de concentrações crescentes de CIS. O gráfico apresenta a média + SD de três experimentos em triplicata. * $p \leq 0.05$; n.s. não significativo.

5.4 Avaliação da expressão de CD68 em Monφ e Mφ

A fim de analisar se a expressão do marcador CD68, que é usualmente utilizado para distinguir populações de Monφ e Mφ (Genin *et al*, 2015), apresentava-se alterado em células sensíveis e resistentes durante o processo de diferenciação Monφ-Mφ, 20 µg do lisado celular foi submetido a técnica de SDS-PAGE, e a expressão de CD68, foi monitorado por WB. Como pode ser observado na **Figura 8**, após o processo de diferenciação, nenhuma diferença foi notada, sugerindo que a aquisição de resistência não modula a expressão do marcador CD68 em Mφ.

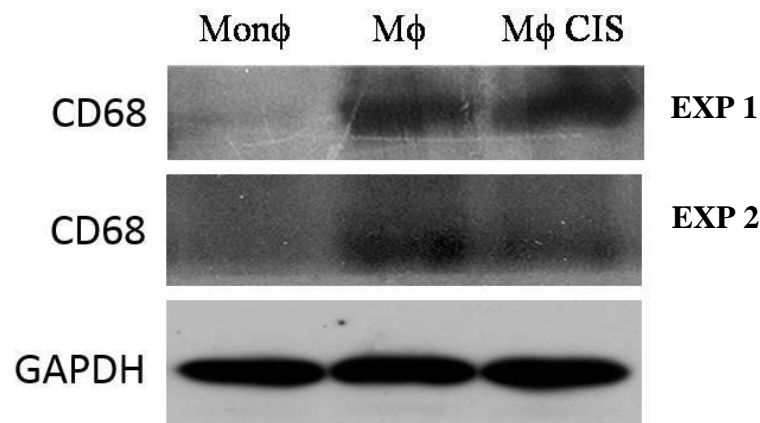


Figura 8. Análise da expressão de CD68 em Monφ e Mφ tratados ou não com CIS. A expressão do marcador CD68 em Monφ e Mφ resistentes ou não à CIS foi investigada pela técnica de WB. Os resultados mostraram que a expressão de CD68 em Mφ e em Mφ CIS aumentou após a diferenciação como esperado, uma vez que esse é um marcador expressivo de Mφ e, além disso, mostrou que o processo de aquisição de resistência não afeta a diferenciação de Monφ para Mφ. Foram realizados dois experimentos para este resultado.

5.5 Análise da morfologia de M ϕ parentais e resistentes

No intuito de verificar se M ϕ derivados de Mon ϕ expostos a CIS apresentavam alterações morfológicas, 20 fotomicrografias foram obtidas aleatoriamente com o auxílio de um microscópio óptico de campo claro (Nikon). Como pode ser observado nas imagens **a** (M ϕ parentais) e **b** (M ϕ CIS) da **Figura 9**, nenhuma diferença morfológica foi inicialmente detectada. Contudo, novos ensaios serão realizados com o auxílio do programa Image J, no intuito de verificar se existem diferenças significativas em relação ao tamanho e/ou circularidade entre os dois grupos experimentais.

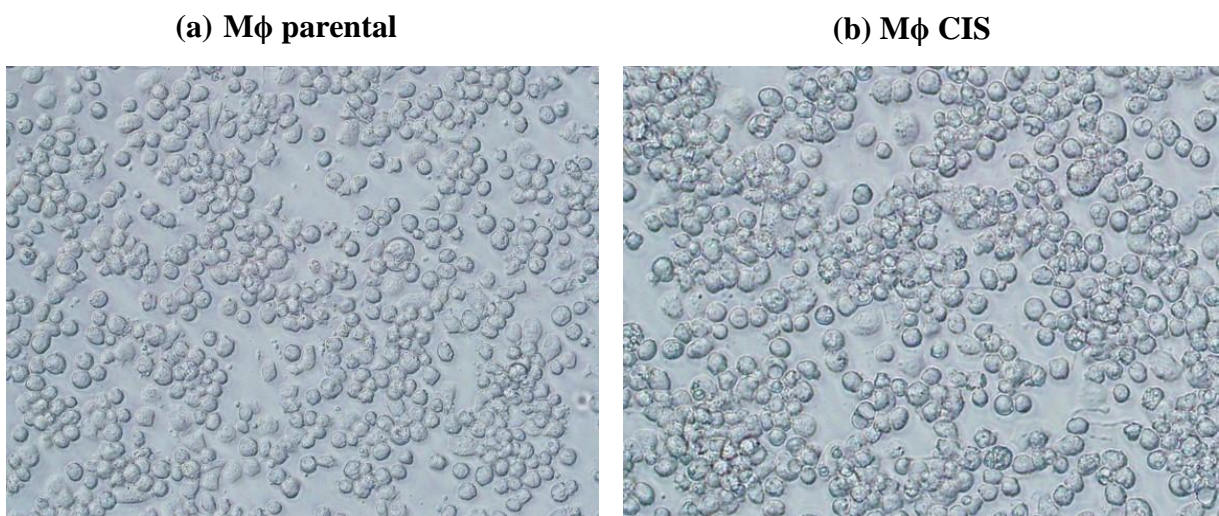


Figura 9. Comparação das morfologias de M ϕ parentais e tratados. Após a diferenciação de Mon ϕ para M ϕ as placas foram fotografadas com microscópio óptico de campo claro (Nikon). Nas imagens pode-se observar que não houve alteração na morfologia do grupo tratado em comparação ao grupo parental.

5.6 Avaliação da expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas em M ϕ

Embora os resultados ilustrados na **Figura 8** tenham revelado que o processo de diferenciação Mon ϕ -M ϕ não foi comprometido pela exposição prolongada ao quimioterápico CIS, não sabíamos se tais células apresentavam-se fenotipicamente diferente em relação às células parentais. Para confirmar essa hipótese, os níveis de transcritos para proteínas pró- e anti-apoptóticas foram monitorados através da técnica de qPCR. Como pode ser observado na **Figura 10**, os resultados revelaram que enquanto os níveis de transcritos que codificam Bax e Bad (**Fig. 10a**) apresentaram-se reduzidos, os níveis de transcritos que codificam as proteínas anti-apoptóticas Bcl-XL e Survivina apresentaram-se aumentados nos M ϕ resistentes (**Fig. 10b**), confirmando que o fenótipo de resistência na população de M ϕ derivados de Mon ϕ resistentes a CIS foi adquirido.

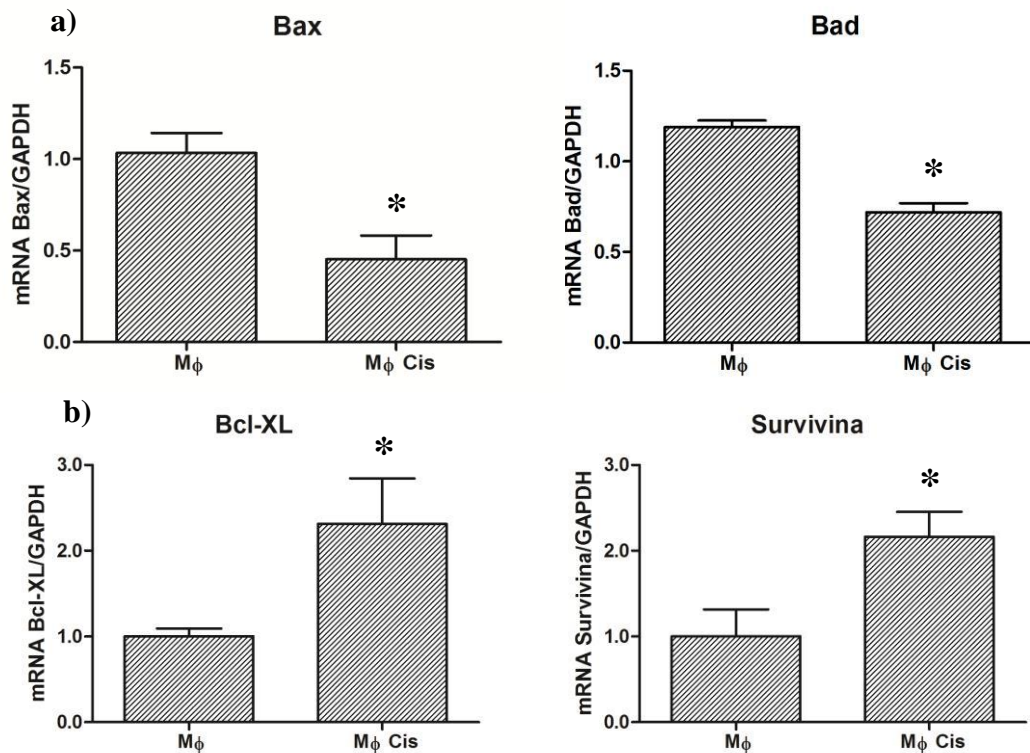


Figura 10. Determinação dos níveis de expressão gênica de proteínas anti- e pró-apoptóticas em M ϕ . Os níveis de transcritos foram determinados pela técnica de qPCR. **a)** Nível de transcrito das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bad. **b)** Nível de transcrito das proteínas anti-apoptóticas Bcl-XL e Survivina. Os resultados mostraram que o nível de transcrito das proteínas pró-apoptóticas Bad e Bax nas células tratadas com CIS apresentou uma diminuição significativa com relação ao grupo controle. Em contrapartida, o nível de transcrito das proteínas anti-apoptóticas Bcl-XL e Survivina nas células tratadas com CIS apresentou um crescimento significativo com relação ao controle, induzindo que M ϕ resistentes possuem maior capacidade de fugir dos mecanismos de apoptose. Os resultados são mostrados como a média + SD de três experimentos em triplicata. * $p \leq 0.05$.

5.7 Avaliação do perfil de citocinas em M ϕ tratados ou não com CIS

Para avaliar o perfil de citocinas expressas por M ϕ tratados ou não com CIS, foram analisados os níveis de transcritos das citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF- β e IL-4 (**a**) e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12 (**b**), através da técnica de qPCR. Como pode ser observado na **Figura 11**, os níveis de transcritos que codificam as proteínas IL-10, TGF- β e IL-4 (**Fig. 11a**) apresentaram-se significativamente aumentados quando comparados ao controle (M ϕ não tratados). Entretanto, os níveis de transcritos que codificam TNF- α e IL-12 apresentaram-se significativamente reduzidos em relação às células parentais (**Fig. 11b**). Embora novos estudos necessitam ser realizados para confirmar o fenótipo dos M ϕ derivados de Mon ϕ quimioresistentes, esses achados sugerem que tais células apresentam preferencialmente um perfil anti-inflamatório.

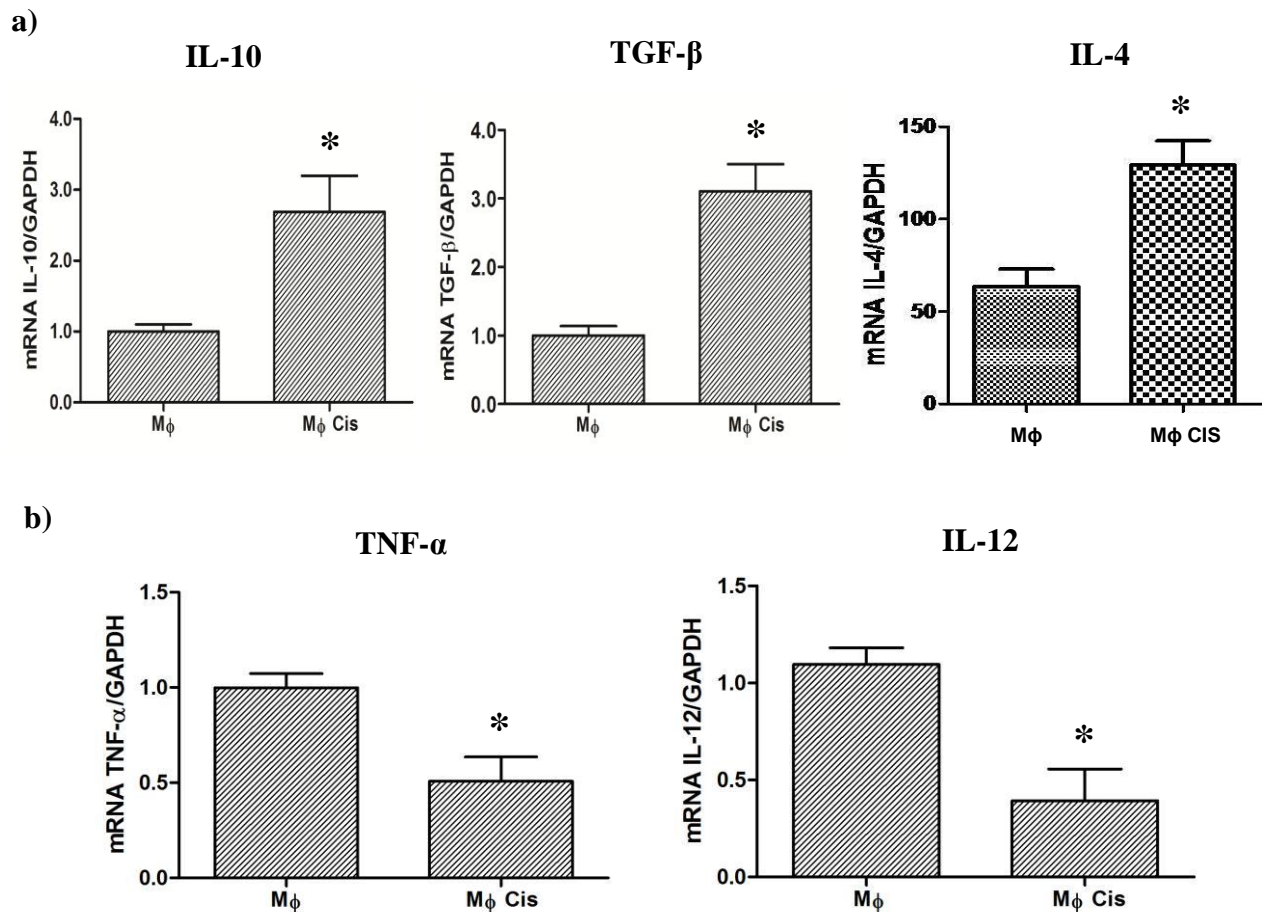


Figura 11. Determinação dos níveis de expressão gênica de citocinas anti- e pró-inflamatórias em Mφ. a) Nível de transcritos das citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF-β e IL-4. b) Nível de transcritos das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-12. Esses dados nos permitiram observar que os Mφ resistentes apresentam um perfil mais anti-inflamatório, tendendo a um perfil mais M2 associado à aquisição de resistência. Os resultados são mostrados como a média + SD de três experimentos em triplicata. * $p \leq 0.05$.

5.8 Avaliação da expressão de TGase-2 em Monφ e Mφ

Como descrito no item 5.7, o perfil de citocinas analisadas por qPCR sugerem que os Mφ derivados de Monφ expostos por períodos prolongados a CIS apresentam um perfil de células alternativamente ativadas. A fim de confirmar a polarização M2, foi avaliada a expressão do marcador TGase-2 em Mφ, tratados ou não, através da técnica de WB. Como controle negativo, foi utilizado o extrato de Monφ parentais. Como ilustrado na **Figura 12**, Mφs derivados de Monφs resistentes ao quimioterápico CIS foram capazes de induzir o aumento da expressão de TGase-2, um marcador utilizado para identificar Mφ humanos alternativamente ativados (Martinez e Gordon, 2014; Rószler, 2015).

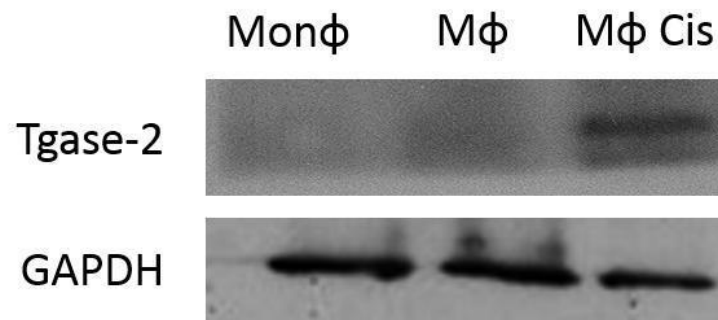


Figura 12. Avaliação da expressão de TGase-2 em Monφ e Mφ tratados ou não com CIS. A expressão de TGase-2 foi investigada pela técnica de WB. Os resultados evidenciam um aumento da expressão de TGase-2 nos Mφ resistentes, confirmando a polarização para um perfil mais M2 após um longo período de quimioterapia.

5.9 Análise da expressão de TGF-β em Mφ em períodos com e sem tratamento de CIS

Como ilustrado no item 5.7, os níveis de transcritos para citocinas anti-inflamatórias apresentaram-se aumentadas em Mφs humanos resistentes a CIS. No intuito de avaliar a expressão da proteína TGF-β, uma citocina com elevada propriedade pró-carcinogênica, pela sua habilidade de ativar o processo de TEM (Pang *et al.*, 2016; Tsubakihara e Moustakas, 2018), a técnica de ELISA foi empregada (**Figura 13**). Para tal finalidade, os sobrenadantes das culturas de Mφs derivados de Monφ sensíveis e resistentes foram utilizados. Em relação as culturas de Mφs resistentes, utilizamos três protocolos para a dosagem da citocina TGF-β:

- (a) Dosagem de TGF-β realizada com o sobrenadante de Monφ cultivados e diferenciados em Mφ na presença de CIS e PMA (**Fig. 13a**);
- (b) Dosagem de TGF-β utilizando o sobrenadante de Mφ oriundos de Monφ selecionados com CIS, mantidos por 10 dias na ausência do quimioterápico e após a diferenciação com PMA, cultivados por 48 h em meio fresco (**Fig. 13b**).

Tal protocolo foi empregado, uma vez que células induzidas a resistência com agentes quimioterápicos mostram-se capazes de promover a extrusão do fármaco. Além disso, ao longo dos últimos anos, estudos já comprovaram que a indução de resistência está associada à ativação do processo de TEM (Wang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). Com isso, nosso objetivo foi verificar se mesmo após o tratamento ser interrompido, os níveis de TGF-β permaneceriam elevados nas células previamente expostas ao quimioterápico.

Em relação ao PMA, existe na literatura um artigo que demonstra que o indutor da diferenciação Monφ-Mφ é capaz de promover o aumento da motilidade celular, bem

como a produção de MMPs em células tumorais (Hwang *et al.*, 2011), eventos intimamente associados a TEM (Piperigkou *et al.*, 2018).

(c) Dosagem de TGF- β utilizando o sobrenadante de M ϕ oriundos de Mon ϕ parentais mantidos por 48 h na presença de CIS (**Fig. 13c**).

Esse protocolo foi realizado no intuito de investigar se a produção de TGF- β por M ϕ quimioresistentes era dependente de curta ou longa exposição ao quimioterápico CIS.

Os resultados confirmaram o aumento de TGF- β após um longo período de tratamento (**Fig. 13a**), mostrando que este é um efeito prolongado e que, mesmo após o tratamento ser interrompido, os níveis de expressão de TGF- β continuam altos (**Fig. 13b**). Além disso, os dados mostraram que não foi observada diferença entre o grupo tratado por um período de apenas 48 h e o não tratado, evidenciando que este é um processo que ocorre após um período extenso de exposição à droga, (**Fig. 13c**).

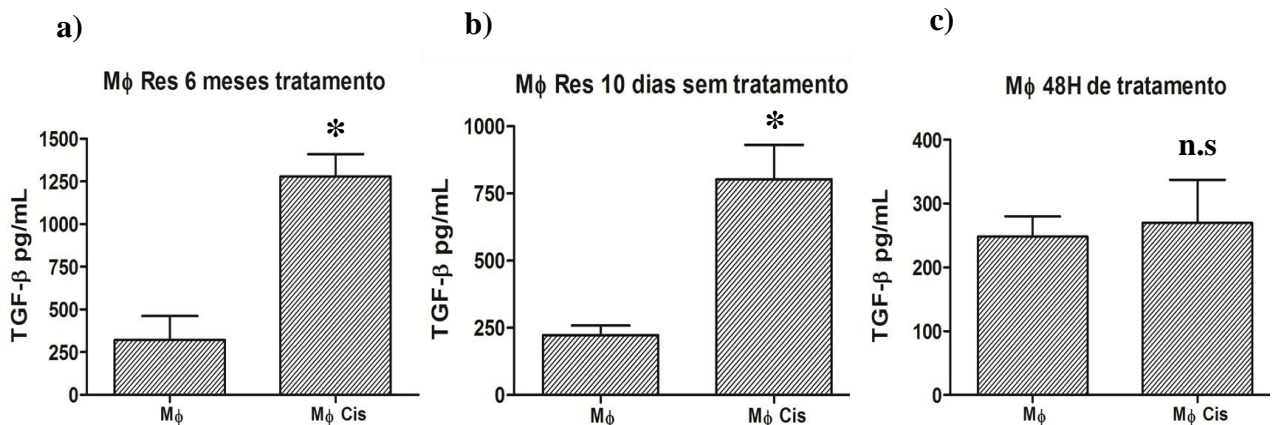


Figura 13. Avaliação da expressão proteica de TGF- β em M ϕ na presença ou não de CIS. a) Dosagem de TGF- β em M ϕ tratados com CIS durante 6 meses. b) Dosagem de TGF- β em M ϕ resistentes à CIS submetidos a um período de 10 dias sem a droga. c) Dosagem de TGF- β em M ϕ parentais mantidos durante 48 h na presença de CIS. Os resultados confirmaram o aumento da citocina alvo após um longo período de tratamento (a) e mostrou que este é um efeito prolongado que, mesmo modificando o meio desta célula para um ambiente sem a droga, os níveis de expressão de TGF- β continuam altos (b). Em contrapartida, esses dados mostraram que, de fato, este é um processo que ocorre após um período extenso de tratamento, não sendo observada diferença entre o grupo tratado e o não tratado, durante apenas 48 h (c). Os resultados são mostrados como a média + SD de três experimentos em triplicata. * $p \leq 0.05$; n.s. não significativo.

6 DISCUSSÃO

O câncer representa um enorme fardo para a sociedade, tanto nos países menos desenvolvidos quanto nos mais desenvolvidos (Torre *et al.*, 2015). Com o crescente reconhecimento que o câncer não é uma doença de um único clone maligno aberrante, mas sim de um ecossistema que envolve múltiplas populações distintas molecular e metabolicamente, com uma ampla capacidade de adaptações induzidas tanto pelo tumor, quanto pelo próprio hospedeiro, a probabilidade de se encontrar uma cura para o câncer é quase nula (Klement, 2016).

Nos últimos 60 anos, o principal objetivo das terapias convencionais tem sido a erradicação de todas as células cancerosas. Para este fim, os pacientes são, geralmente, submetidos às maiores doses possíveis tanto de radiação quanto de quimioterapia, além de, algumas vezes, partir para cirurgias radicais. Assim, quando a erradicação é possível, ela costuma vir a longo prazo, no entanto, quando ela não é possível de início, o paciente pode acabar vindo a óbito, seja pelo progresso da doença, seja por uma complicação do tratamento (Klement, 2016).

Além disso, a evolução da resistência representa um significativo obstáculo para o sucesso do controle dos tumores, uma vez que anula a resposta a terapia (Foo e Michor, 2014). O design da quimioterapia torna-se cada vez mais sofisticado, mas não há tratamento que seja 100% eficaz contra o câncer disseminado. Dentro desse contexto, o fenótipo MDR é outro resultado refratário a quimioterapia e é definido como a resistência das células cancerígenas a múltiplas drogas com diferentes estruturas e mecanismos de ação. Sendo assim, o MDR é uma das principais causas da falha da quimioterapia e um dos mais importantes responsáveis pelo aumento da mortalidade relacionada ao câncer (Li *et al.*, 2017). Com isso, essa resistência ao tratamento com antineoplásicos está relacionada a uma variedade de fatores, incluindo variações individuais em pacientes e diferenças genéticas de células somáticas em tumores, a expressão de um ou mais transportadores dependentes de energia que detectam e ejetam as drogas das células, insensibilidade a apoptose induzida por drogas, com o aumento de proteínas anti-apoptóticas, mecanismos de desintoxicação, entre diversos outros (Gottesman, 2002).

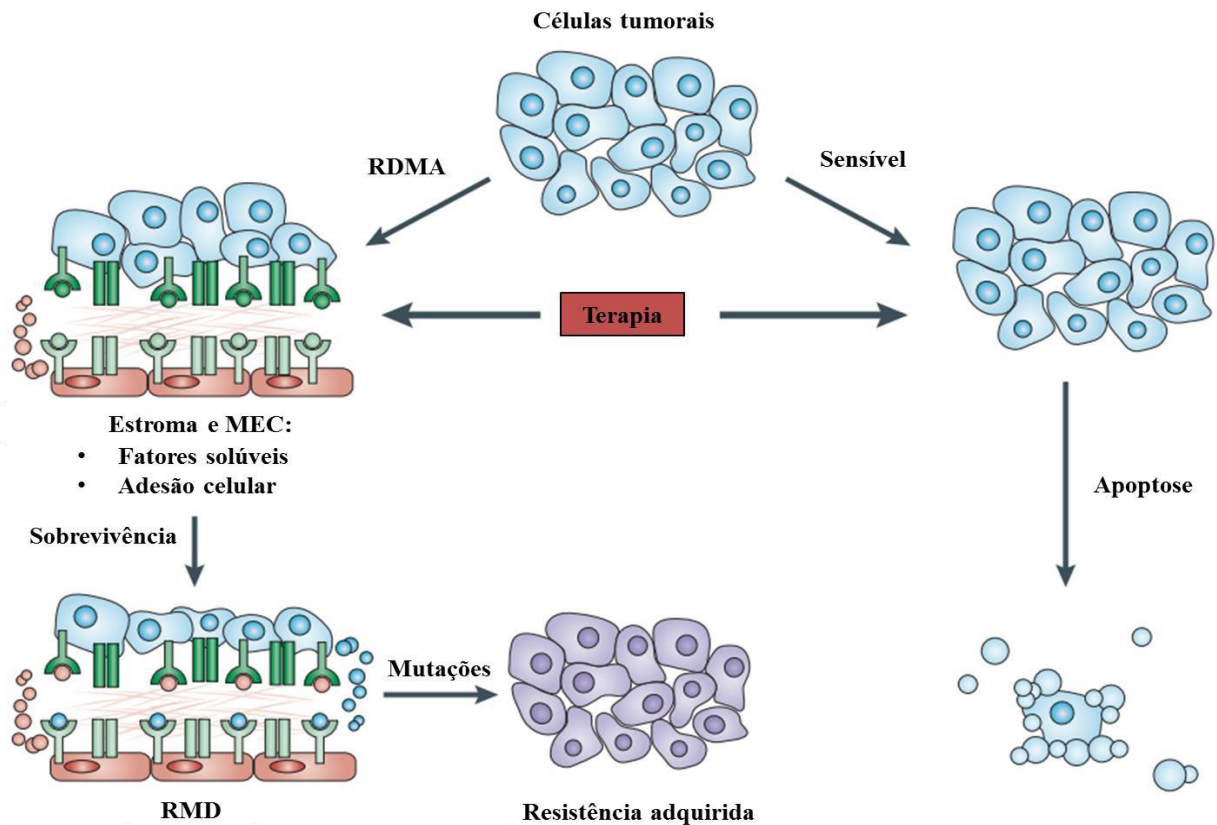


Figura 14. Processo de resistência adquirida. Fatores presentes no TME induzem a resistência às drogas mediada pelo ambiente (RDMA) por meio de dois mecanismos: resistência a medicamentos mediada por fatores solúveis e por adesão celular. A maioria das células tumorais sucumbe à terapia, mas a interação de um subconjunto dessas células com fatores microambientais lhes permite sobreviver ao ataque da terapia de forma protegida, resultando em um residual mínimo da doença (RMD). Com o passar do tempo, a instabilidade genética das células cancerosas combinada com a forte pressão seletiva da terapia leva a sucessivas mutações que causam o desenvolvimento gradual de formas mais complexas e diversificadas, além de fenótipos de resistência adquirida permanentes. Estas células sobreviventes eventualmente causam recorrência da doença e são muito menos propensas a responder à terapia subsequente após a resistência adquirida se desenvolver. Adaptado de Meads, Gatenby e Dalton, 2009.

No caso da CIS, ela irá exercer efeitos anticancerígenos através de múltiplos mecanismos, contudo o modo de ação melhor compreendido é o que envolve a geração de lesões de DNA seguidas pela ativação da resposta ao dano do DNA e a indução da apoptose. No entanto, apesar de uma taxa consistente e positiva de respostas iniciais, o tratamento com cisplatina geralmente resulta no desenvolvimento de quimiorresistência (Galluzzi *et al.*, 2012) associada aos mesmos fatores mencionados no parágrafo anterior, tais como o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como as da família Bcl-2, que são reguladores centrais da morte celular programada, e membros que inibem a apoptose, como Bcl-XL, são superexpressos em muitos tipos de câncer e contribuem para o início, progressão e resistência ao tratamento, levando ao insucesso terapêutico (Daí *et al.*, 2017; Skowron *et al.*, 2018). Nossos resultados mostraram que, de fato, há um aumento nos níveis de transcritos para as

proteínas anti-apoptóticas Bcl-XL e survivina nas células tratadas com CIS, confirmando a aquisição do fenótipo de resistência. Além disso, a citotoxicidade também teve alteração após os 6 meses de tratamento, apresentando uma viabilidade celular maior do que quando testado inicialmente, no caso dos Mon ϕ , e quando comparado às células derivadas do grupo parental, no caso dos M ϕ , evidenciando o processo de resistência adquirida após um período longo de tratamento.

Dessa forma, à medida que nosso entendimento sobre o papel do TME na progressão do tumor e na resistência a medicamentos melhora, estamos percebendo que o paradigma de matar todas as células cancerosas pode ser falho (Klement, 2016). Além disso, incluindo alterações intracelulares diretas, o início e a progressão de um tumor dependem do contato intercelular, tanto com células cancerosas vizinhas quanto com células normais que compõem o microambiente. Os componentes do estroma tumoral incluem fibroblastos associados ao tumor (CAFs), células do sistema imune e da vasculatura. Dessa forma, tem sido postulado que os mecanismos de resistência à terapia são conferidos principalmente por alterações nesse microambiente tumoral (Meads, Gatenby e Dalton, 2009).

Os M ϕ estão presentes em todos os compartimentos do corpo, incluindo tecidos cancerígenos, e suas funções são fortemente afetadas por sinais do microambiente, seja em condições homeostáticas, seja em patológicas. Além disso, eles são um importante componente celular da inflamação associada ao câncer (Mantovani e Locati, 2013). Nos nossos resultados, foi possível observar, através da expressão do marcador CD68, que não há alteração mesmo após essas células adquirirem resistência, evidenciando que este processo não interfere na diferenciação de Mon ϕ para M ϕ .

Visto isso, os M ϕ são considerados modelo para a plasticidade e polarização funcional de fagócitos mononucleares (Mantovani e Locati, 2013), ou seja, ainda que o papel natural dessas células seja promover imunidade, fagocitose de células mortas e de restos celulares, elas também podem exercer dupla influência no TME dependendo do estado de ativação, com células classicamente ativadas (M1) e as alternativamente ativadas (M2), geralmente exercendo função anti- e pró-tumoral, respectivamente. Na situação de um câncer, os tumores educam os TAMs, em grande parte, para o fenótipo M2, que promove o crescimento e disseminação dos mesmos (Brown, Recht e Strober, 2017). Com isso, nossos resultados evidenciam o aumento dos níveis proteicos de TGase-2, principalmente nos M ϕ tratados, mostrando que essas células, quando adquirem certa resistência, tendem a se aproximar de um fenótipo parecido ao de TAM, com um perfil mais M2.

Além disso, M2 apresenta propriedades anti-inflamatórias e são responsáveis pela remoção de debris e reparação tecidual. Assim, essas células são induzidas, principalmente, por IL-4 e IL-13 e produzem altas quantidades de IL-10 e TGF- β (Gharib *et al.*, 2014). Sabendo-se disso, alguns estudos têm mostrado que M2 pode induzir EMT através da expressão de TGF- β (Zhu *et al.*, 2017), uma vez que esse fator de crescimento é considerado um dos principais mediadores da indução desse processo, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Halwani *et al.*, 2011). Nossos achados indicaram que os M ϕ que adquiriram resistência à CIS, apresentaram, de fato, um perfil mais anti-inflamatório, com o aumento dos níveis gênicos para as citocinas, IL-4, IL-10 e TGF- β e a diminuição dos níveis de transcritos para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12. Com isso, sabendo-se da importância do TGF- β no processo de transição para um fenótipo mais agressivo e invasivo das células, e com a ajuda dos nossos resultados, foi possível identificar que a expressão de TGF- β aumentada é um fenômeno que ocorre ao longo do processo de aquisição de resistência, no entanto, se mantém mesmo após a parada do tratamento. Esses dados mostram como, realmente, a polarização para o perfil M2 pode modular o TME, auxiliando no processo de progressão tumoral.

Estes são extremos estados de polarização dentro de um universo de diversidade. Os M ϕ afetam, praticamente, todos os pontos de um tecido tumoral, incluindo células-tronco, metabolismo, angiogênese, invasão e metástase. Com isso, dados pré-clínicos e clínicos iniciais sugerem que essas células podem servir como ferramentas para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de diagnóstico e terapia não só em câncer, mas também em doenças crônicas ainda não resolvidas (Mantovani e Locati, 2013). No entanto, pouco se sabe, ainda, das suas funções efetivas no TME e como eles podem ser usados como possíveis alvos terapêuticos, contudo, alguns trabalhos têm apresentado resultados promissores, que fornecem encorajamento geral para o desenvolvimento dessas estratégias centradas em M ϕ , como o estudo de Germano, *et al.*, 2013, que mostrou que essas células como alvo são um componente chave da atividade antitumoral da trabectedina, um antineoplásico utilizado contra sarcoma e carcinoma de ovário.

No decorrer dos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente a importância da contribuição do estroma tanto na iniciação quanto na progressão do câncer. A complexa intercomunicação entre o tumor e o microambiente é fato em todos os estágios da progressão da doença e com isso, pode representar um nicho único, no qual marcadores moleculares e alvos para terapia ainda precisam ser identificados (Røslund e Engelsen, 2015). Como

exemplo disso, diversas evidências têm mostrado que o microambiente é capaz de normalizar as células tumorais, sugerindo que a reeducação do compartimento estromal pode ser uma efetiva estratégia para o tratamento do câncer. No caso dos M ϕ no TME, um estudo de Hagemann *et al*, 2008, mostrou ser possível manipular seu fenótipo para um perfil mais anti-tumoral, provando que a reeducação dessa população de M ϕ associados a progressão da doença pode se tornar uma inovadora e efetiva terapia contra o câncer, que pode complementar outras já existentes. Pontos adicionais para serem considerados incluem determinar quais pacientes visar, quais terapias anti-câncer combinar com os agentes direcionados ao TME e como superar a resistência intrínseca e adquirida neste ambiente. Olhando para o futuro, talvez a grande promessa possa vir da noção de que a reeducação de um TME disfuncional poderia produzir resultados notáveis para o controle e remissão do câncer (Quail e Joyce, 2013).

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que M ϕ conseguem escapar do mecanismo de morte celular induzido por CIS e adquirir o fenótipo de resistência após um longo período de tratamento, se tornando, por fim, resistentes a esta droga. Como foi confirmado através dos nossos dados obtidos, essas células quando adquirem o fenótipo de resistência expressam altos níveis de proteínas anti-apoptóticas tais com Bcl-XL e survivina, o que auxilia na fuga do mecanismo de morte celular. Além disso, nossos achados confirmaram a polarização desses M ϕ resistentes para um perfil similar ao de TAM, mais anti-inflamatório, com o aumento das citocinas, IL-4, IL-10 e TGF- β . Ainda, o aumento da expressão de TGase-2 confirma a predominância do fenótipo M2, principalmente no grupo resistente. Por fim, comprovamos que a expressão de TGF- β elevada é um fenômeno que ocorre após um longo período de quimioterapia e que ele se mantém mesmo após o tratamento ser interrompido, o que pode acabar levando a TEM. Assim, concluímos esse trabalho mostrando a relevância dos M ϕ no processo de progressão tumoral, uma vez que os mesmos podem adquirir resistência e modular o TME a favor do crescimento do tumor, através do aumento de proteínas que permitirão um meio mais propício para o seu desenvolvimento e consequente processo de metástase. Visto isso, como próximos passos, pretendemos comparar os efeitos pró-carcinogênicos provenientes dos sobrenadantes das culturas de M ϕ sensíveis e resistentes à CIS em uma linhagem de adenocarcinoma de pulmão (A459), a fim de analisar se moléculas com propriedades pró-carcinogênicas, tais como o TGF- β , seriam capazes de induzir a TEM.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, V.D., Leitão, A., Reina, L.D.C.B., Montanari, C.A., Donnici, C.L. e Lopes, M.T.P. (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova* 28, 118-129.
- Bonde, A.K., Tischler, V., Kumar, S., Soltermann, A. e Schwendener, R.A. (2012). Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC cancer* 12, 35.
- Brown, J.M., Recht, L. e Strober, S. (2017). The promise of targeting macrophages in cancer therapy. *Clinical Cancer Research* 23, 3241-3250.
- Campesato, L.F.I. (2015). Investigação do papel de SIGIRR/IL-1R8 no *crosstalk* entre células tumorais e o infiltrado leucocitário. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 168f.
- Cassetta, L. e Pollard, J.W. (2018). Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Chen, R., Alvero, A.B., Silasi, D.A. e Mor, G. (2007). Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *American journal of reproductive immunology* 57, 93-107.
- Chen, L., Wang, S., Wang, Y., Zhang, W., Ma, K., Hu, C. e Xu, N. (2018). IL-6 influences the polarization of macrophages and the formation and growth of colorectal tumor. *Oncotarget* 9, 17443.
- Chiou, S.K., Rao, L. e White, E. (1994). Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 14, 2556-2563.
- Choi, K.M., Kashyap, P.C., Dutta, N., Stoltz, G.J., Ordog, T., Donohue, T.S. e Farrugia, G. (2010). CD206-positive M2 macrophages that express heme oxygenase-1 protect against diabetic gastroparesis in mice. *Gastroenterology* 138, 2399-2409.
- Condeelis, J. e Segall, J.E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature Reviews Cancer* 3, 921.
- Cukierman, E. e Khan, D.R. (2010). The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. *Biochemical pharmacology* 80, 762-770.
- Dai, Y., Jin, S., Li, X. e Wang, D. (2017). The involvement of Bcl-2 family proteins in AKT-regulated cell survival in cisplatin resistant epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 8, 1354.
- Dasari, S. e Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology* 740, 364-378.
- Du, B. e Shim, J.S. (2016). Targeting epithelial–mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer. *Molecules* 21, 965.
- Du, F., Liu, H., Lu, Y., Zhao, X. e Fan, D. (2017). Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Liaison between Cancer Metastasis and Drug Resistance. *Critical Reviews™ in Oncogenesis* 22.
- Dudley, A.C. e Klagsbrun, M. (2009). Tumor endothelial cells join the resistance. *Clinical Cancer Research* 15, 4787-4789.
- Edlich, F. (2017). BCL-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns. *Biochemical and biophysical research communications* 500, 26-34.
- Edwards, J.P., Zhang, X., Frauwirth, K.A. e Mosser, D.M. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of leukocyte biology* 80, 1298-1307.
- Egas-Bejar, D., Anderson, P.M., Agarwal, R., Corrales-Medina, F., Devarajan, E., Huh, W.W. e Subbiah, V. (2014). Theranostic profiling for actionable aberrations in advanced high risk osteosarcoma with aggressive biology reveals high molecular diversity: the human fingerprint hypothesis. *Oncoscience* 1, 167.
- Enriquez-Navas, P.M., Kam, Y., Das, T., Hassan, S., Silva, A., Foroutan, P., Ruiz, E., Martinez, G., Minton, S., Gillies, R.J. e Gatenby, R.A. (2016). Exploiting evolutionary principles to prolong tumor control in preclinical models of breast cancer. *Science translational medicine* 8, 327ra24-327ra24.
- Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, P., Becette, V. e MacGrogan, G. (2009). A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nature medicine* 15, 68.

- Fernando, M.R., Reyes, J.L., Iannuzzi, J., Leung, G. e McKay, D.M. (2014). The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS One* 9, e94188.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the seed and soil hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer* 3, 453.
- Foo, J. e Michor, F. (2014). Evolution of acquired resistance to anti-cancer therapy. *Journal of theoretical biology*, 355, 10-20.
- Freire-de-Lima, L., Gelfenbeyn, K., Ding, Y., Mandel, U., Clausen, H., Handa, K. e Hakomori, S.I. (2011). Involvement of O-glycosylation defining oncofetal fibronectin in epithelial-mesenchymal transition process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 17690-17695.
- Freire-de-Lima, L., Gentile, L.B., Fonseca, L.M.D., da Costa, K.M., Santos Lemos, J., Jacques, L.R. e Previato, J.O. (2017). Role of Inactive and Active Trypanosoma cruzi Trans-sialidases on T Cell Homing and Secretion of Inflammatory Cytokines. *Frontiers in microbiology* 8, 1307.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O. e Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31, 1869.
- Gatenby, R.A. (2009). A change of strategy in the war on cancer. *Nature* 459, 508.
- Gatenby, R.A., Brown, J. e Vincent, T. (2009). Lessons from applied ecology: cancer control using an evolutionary double bind. *Cancer research* 69, 7499-7502.
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M. e Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC cancer* 15, 577.
- Germano, G., Frapolli, R., Belgiovine, C., Anselmo, A., Pesce, S., Liguori, M. e Nebuloni, M. (2013). Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer cell* 23, 249-262.
- Gharib, S.A., Johnston, L.K., Huizar, I., Birkland, T.P., Hanson, J., Wang, Y. e Manicone, A.M. (2014). MMP28 promotes macrophage polarization toward M2 cells and augments pulmonary fibrosis. *Journal of leukocyte biology* 95, 9-18.
- Gottesman, M.M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine* 53, 615-627.
- Hagemann, T., Wilson, J., Burke, F., Kulbe, H., Li, N.F., Plüddemann, A. e Balkwill, F.R. (2006). Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *The Journal of Immunology* 176, 5023-5032.
- Hagemann, T., Lawrence, T., McNeish, I., Charles, K.A., Kulbe, H., Thompson, R.G. e Balkwill, F.R. (2008). "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF- κ B. *Journal of Experimental Medicine* 205, 1261-1268.
- Halwani, R., Al-Muhsen, S., Al-Jahdali, H. e Hamid, Q. (2011). Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 44, 127-133.
- Hanahan, D. e Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hazlehurst, L.A., Landowski, T.H. e Dalton, W.S. (2003). Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death. *Oncogene* 22, 7396.
- Hiscox, S., Jiang, W.G., Obermeier, K., Taylor, K., Morgan, L., Burmi, R. e Nicholson, R.I. (2006). Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of β -catenin phosphorylation. *International journal of cancer* 118, 290-301.
- Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. e Korsmeyer, S.J. (1991). BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 6961-6965.
- Holden, J.A., Attard, T.J., Laughton, K.M., Mansell, A., O'Brien-Simpson, N.M. e Reynolds, E.C. (2014). Porphyromonas gingivalis LPS weakly activates M1 and M2 polarised mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Infection and immunity* IAI-02325.
- Huang, L., Perrault, C., Coelho-Martins, J., Hu, C., Dulong, C., Varna, M. e Janin, A. (2013). Induction of acquired drug resistance in endothelial cells and its involvement in anticancer therapy. *Journal of hematology & oncology* 6, 49.
- Hui, L. e Chen, Y. (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer letters* 368, 7-13.

- Hung, T.H., Hsu, S.C., Cheng, C.Y., Choo, K.B., Tseng, C.P., Chen, T.C. e Chong, K.Y. (2014). Wnt5A regulates ABCB1 expression in multidrug-resistant cancer cells through activation of the non-canonical PKA/ β -catenin pathway. *Oncotarget* 5, 12273.
- Hwang, Y.P., Yun, H.J., Kim, H.G., Han, E.H., Choi, J.H., Chung, Y.C. e Jeong, H.G. (2011). Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKC α /ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Toxicology letters* 203, 9-19.
- INCA (2017). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/livro_abc_3ed_8a_prova_final.pdf
- INCA (2017). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101. Acesso em 21/05/2018.
- Jamieson, E.R. e Lippard, S.J. (1999). Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. *Chemical reviews* 99, 2467-2498.
- Jiang, M. e Dong, Z. (2008). Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 327, 300-307.
- Jinushi, M. e Komohara, Y. (2015). Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: creating a new path from bench to bedside. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1855, 123-130.
- Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Yamashita, M., Ino, K., Nawa, A. e Kikkawa, F. (2007). Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *International journal of oncology* 31, 277-283.
- Kartal-Yandim, M., Adan-Gokbulut, A. e Baran, Y. (2016). Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. *Critical reviews in biotechnology* 36, 716-726.
- Kassim, S.K., Ali, H.S., Sallam, M.M., Fayed, S.T., Seada, L.S., Seada, M.A. e Khalifa, A. (1999). Increased bcl-2 expression is associated with primary resistance to chemotherapy in human epithelial ovarian cancer. *Clinical biochemistry* 32, 333-338.
- Klement, G.L. (2016). Eco-evolution of cancer resistance. *Science translational medicine* 8, 327fs5-327fs5.
- Klement, G.L., Arkun, K., Valik, D., Roffidal, T., Hashemi, A., Klement, C. e Mudry, P. (2016). Future paradigms for precision oncology. *Oncotarget* 7, 46813.
- Konge, J., Leteurtre, F., Goislard, M., Biard, D., Morel-Altmeier, S., Vaurijoux, A. e Lebeau, J. (2018). Breast cancer stem cell-like cells generated during TGF β -induced EMT are radioresistant. *Oncotarget* 9, 23519.
- Lang, R., Patel, D., Morris, J.J., Rutschman, R.L. e Murray, P.J. (2002). Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *The Journal of Immunology* 169, 2253-2263.
- Li, C., Shintani, S., Terakado, N., Nakashiro, K.I. e Hamakawa, H. (2002). Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports* 9, 1219-1223.
- Li, Y.J., Lei, Y.H., Yao, N., Wang, C.R., Hu, N., Ye, W.C. e Chen, Z.S. (2017). Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chinese journal of cancer* 36, 52.
- Liu, C.Y., Xu, J.Y., Shi, X.Y., Huang, W., Ruan, T.Y., Xie, P. e Ding, J.L. (2013). M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Laboratory investigation* 93, 844.
- Liu, Y.C., Zou, X.B., Chai, Y.F. e Yao, Y.M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International journal of biological sciences* 10, 520.
- Mackaness, G.B. (1964). The immunological basis of acquired cellular resistance. *Journal of Experimental Medicine* 120, 105-120.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S. e Ruco, L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology today* 13, 265-270.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. e Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* 23, 549-555.

- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. e Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25, 677-686.
- Mantovani, A. e Locati, M. (2013). Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33, 1478-1483.
- Martinez, F.O. e Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*, 6.
- Meads, M.B., Gatenby, R.A. e Dalton, W.S. (2009). Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nature reviews cancer* 9, 665.
- Mercado-Pimentel, M.E. e Runyan, R.B. (2007). Multiple transforming growth factor- β isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Cells Tissues Organs* 185, 146-156.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63.
- Mosser, D.M. e Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology* 8, 958.
- Nei, M., Maruyama, T. e Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29, 1-10.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* 133, 571-573.
- Pang, M.F., Georgoudaki, A.M., Lambut, L., Johansson, J., Tabor, V., Hagikura, K. e Jakobsson, L. (2016). TGF- β 1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. *Oncogene* 35, 748.
- Piperigkou, Z., Manou, D., Karamanou, K. e Theocharis, A.D. (2018). Strategies to Target Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Approach in Cancer. In: *Proteases and Cancer: Humana Press, New York, NY*, pp. 325-348.
- Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 4, 71.
- Quail, D.F. e Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine* 19, 1423.
- Rebelo, S.P., Pinto, C., Martins, T.R., Harrer, N., Estrada, M.F., Loza-Alvarez, P. e Brito, C. (2018). 3D-3-culture: A tool to unveil macrophage plasticity in the tumour microenvironment. *Biomaterials* 163, 185-197.
- Rho, J.K., Choi, Y.J., Lee, J.K., Ryoo, B.Y., Yang, S.H., Kim, C.H. e Lee, J.C. (2009). Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line. *Lung cancer* 63, 219-226.
- Røslund, G.V. e Engelsen, A.S.T. (2015). Novel points of attack for targeted cancer therapy. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 116, 9-18.
- Röszer, T. (2015). Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of inflammation*, 816460.
- Shah, A.N., Summy, J.M., Zhang, J., Park, S.I., Parikh, N.U. e Gallick, G.E. (2007). Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Annals of surgical oncology* 14, 3629-3637.
- Sica, A. e Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* 122, 787-795.
- Skowron, M.A., Melnikova, M., van Roermund, J.G., Romano, A., Albers, P., Thomale, J. e Hoffmann, M.J. (2018). Multifaceted Mechanisms of Cisplatin Resistance in Long-Term Treated Urothelial Carcinoma Cell Lines. *International journal of molecular sciences* 19, 590.
- Sledge, G.W., Mamounas, E.P., Hortobagyi, G.N., Burstein, H.J., Goodwin, P.J. e Wolff, A.C. (2014). Past, present, and future challenges in breast cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology* 32, 1979.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A. e Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of leukocyte biology* 86, 1065-1073.

- Sorenson, C.M. e Eastman, A. (1988). Influence of cis-diamminedichloroplatinum (II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancerresearch* 48, 6703-6707.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N. e Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine* 176, 287-292.
- Suarez, A.V. e Tsutsui, N.D. (2008). The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular Ecology* 17, 351-360.
- Theodoulou, F.L. e Kerr, I.D. (2015). ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochemical Society Transactions* 43, 1033-1040.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. e Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 65, 87-108.
- Tsubakihara, Y. e Moustakas, A. (2018). Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor β . *International journal of molecular sciences* 19, 3672.
- Wang, D. e Lippard, S.J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews Drug discovery* 4, 307.
- Wang, W., Li, Q., Yamada, T., Matsumoto, K., Matsumoto, I., Oda, M. e Yano, S. (2009). Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clinical Cancer Research* 15, 6630-6638.
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Azmi, A.S. e Sarkar, F.H. (2009). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer research* 69, 2400-2407.
- Wang, M., Qiu, R., Yu, S., Xu, X., Li, G., Gu, R. e Shen, B. (2018). Paclitaxel-resistant gastric cancer MGC-803 cells promote epithelial-to-mesenchymal transition and chemoresistance in paclitaxel-sensitive cells via exosomal delivery of miR-155-5p. *International journal of oncology* 54, 326-338.
- Xiong, Y.Q., Sun, H.C., Zhang, W., Zhu, X.D., Zhuang, P.Y., Zhang, J.B. e Tang, Z.Y. (2009). Human hepatocellular carcinoma tumor-derived endothelial cells manifest increased angiogenesis capability and drug resistance compared with normal endothelial cells. *Clinical Cancer Research* 15, 4838-4846.
- Yang, A.D., Camp, E.R., Fan, F., Shen, L., Gray, M.J., Liu, W. e Ellis, L.M. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer research* 66, 46-51.
- Yang, A.D., Fan, F., Camp, E.R., van Buren, G., Liu, W., Somcio, R. e Ellis, L.M. (2006). Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clinical cancer research* 12, 4147-4153.
- Zhang, Y., Zhang, Q., Chen, H. e Wang, C. (2018). BCL9 promotes epithelial mesenchymal transition and invasion in cisplatin resistant NSCLC cells via β -catenin pathway. *Life sciences* 208, 284-294.
- Zhou, P., Li, B., Liu, F., Zhang, M., Wang, Q., Liu, Y. e Li, D. (2017). The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Molecular cancer* 16, 52.
- Zhu, L., Fu, X., Chen, X., Han, X. e Dong, P. (2017). M2 macrophages induce EMT through the TGF- β /Smad2 signaling pathway. *Cell biology international* 41, 960-968.