

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Paula Ribeiro Braga Dib**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO METANÓLICO DE  
*Smilax officinalis* NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE  
CARCINOMA MAMÁRIO E MACRÓFAGOS MURINOS E EM  
RESPOSTAS EFETORAS DE MACRÓFAGOS *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JUIZ DE FORA

2019

**PAULA RIBEIRO BRAGA DIB**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO METANÓLICO DE  
*Smilax officinalis* NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE  
CARCINOMA MAMÁRIO E MACRÓFAGOS MURINOS E EM  
RESPOSTAS EFETORAS DE MACRÓFAGOS *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Costa Macedo**

**Co-orientador: Prof. Dr. Eugenio Damaceno Hottz**

JUIZ DE FORA

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Dib, Paula Ribeiro Braga.

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO METANÓLICO DE *Smilax officinalis* NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE CARCINOMA MAMÁRIO E MACRÓFAGOS MURINOS E EM RESPOSTAS EFETORAS DE MACRÓFAGOS IN VITRO / Paula Ribeiro Braga Dib. – 2019.

69 p.

Orientador: Gilson Costa Macedo

Coorientador: Eugenio Damaceno Hottz

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Câncer de mama. 2. Reprogramação metabólica. 3. Macrófagos. 4. *Smilax*. 5. *Smilax officinalis*. I. Macedo, Gilson Costa, orient. II. Hottz, Eugenio Damaceno, coorient. III. Título.

**PAULA RIBEIRO BRAGA DIB**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO METANÓLICO DE  
*Smilax officinalis* NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE  
CARCINOMA MAMÁRIO E MACRÓFAGOS MURINOS E EM  
RESPOSTAS EFETORAS DE MACRÓFAGOS *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Dissertação de Mestrado aprovada em: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Danielle Cristina Zimmermann Franco (Membro externo)  
Universidade Presidente Antônio Carlos

---

Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior (Membro interno)  
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Patricia Alves Reis (Suplente externo)  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr<sup>a</sup>. Flavia Marcia de Castro e Silva (Suplente interno)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Eugenio Damaceno Hottz (Co-orientador)  
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo (Orientador)  
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esse trabalho a minha família e amigos pelo amor e incentivo em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me guiou ao longo dessa jornada.

Ao meu orientador Dr. Gilson, pela confiança, aprendizado e incentivo.

Ao meu co-orientador Dr. Eugenio, pelo aprendizado, orientação e disponibilidade.

Ao professor Dr. Ademar da Faculdade de Farmácia UFJF, por ceder o extrato.

Aos professores do Departamento de Imunologia UFJF, Dr. Henrique, Dr<sup>a</sup>. Ana Paula e Dr<sup>a</sup>. Jacy por compartilharem os laboratórios IMUNOCET e LIDIPO conosco.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas UFJF, por disponibilizar o Laboratório Integrado de Pesquisa e permitir a realização desse trabalho.

As meninas que o laboratório me presenteou, Letícia, Gabi, Dani, Livinha, Cecilia e Mariana pelo incentivo e pelas alegrias, tristezas e cafés compartilhados.

A todos do laboratório, por me receberem, dividirem suas experiências e tornarem meus dias melhores.

Aos meus pais, Branca e Paulo, pelo amor e incentivo.

A minha irmã Adélia e avó Dorinha, por todo apoio e carinho.

Ao meu namorado Felipe, pelo amor, paciência e companheirismo.

As agência de fomento CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

## RESUMO

O câncer é caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas e perda da regulação dos processos celulares normais, como a proliferação e morte celular. Além disso, a reprogramação metabólica em células tumorais contribui para o crescimento, sobrevivência, evasão do sistema imune e o recrutamento de células para o microambiente tumoral. Entre as células imunes recrutadas pelo tumor, os macrófagos estão entre os mais abundantes e influenciam a progressão tumoral e resposta antitumoral. Macrófagos pró-inflamatórios (fenótipo M1) podem auxiliar na destruição tumoral, enquanto macrófagos anti-inflamatórios (perfil M2) contribuem para a imunossupressão e a progressão tumoral. Em macrófagos as alterações no metabolismo celular estão relacionadas à proliferação, sobrevivência e aos diferentes fenótipos funcionais. Nesse contexto, *Smilax* spp. são utilizadas como plantas medicinais e já foram associadas as atividades imunomoduladoras e antitumorais. Assim, o presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos do extrato metanólico de *Smilax officinalis* (SMEx) sobre a viabilidade e proliferação de carcinoma mamário e macrófagos murinos, bem como na função mitocondrial e respostas efetoras de macrófagos. Inicialmente, avaliamos a influência do SMEx sobre a viabilidade e proliferação de células 4T1 (carcinoma mamário murino) e macrófagos J774A.1 através do ensaio de MTT, exclusão de azul de tripan e contagem de células viáveis. Nossos resultados demonstram que o SMEx teve efeitos citotóxicos em células 4T1 em menores concentrações comparado a macrófagos. Os efeitos do SMEx sobre a viabilidade celular também foram avaliados por determinação de LDH extracelular e marcação com iodeto de propídeo (citometria de fluxo). O tratamento com SMEx induziu vias de morte com rupturas da membrana plasmática em células 4T1. Enquanto em macrófagos a indução de morte pelo SMEx foi observado apenas em 50 µg/mL, uma dose maior que as tóxicas para células 4T1. Uma vez que em macrófagos o SMEx nas menores doses reduziu o metabolismo do MTT sem interferir na viabilidade e proliferação, nós avaliamos a atividade mitocondrial dessas células. De acordo com os dados, o SMEx foi capaz de alterar a função mitocondrial e pode-se sugerir que o mesmo induza a reprogramação metabólica. Dessa forma, investigamos os efeitos do SMEx, nas concentrações não tóxicas, em macrófagos estimulados com IL-4 (fenótipo M2 dependente do metabolismo oxidativo), bem como em macrófagos estimulados com LPS (perfil M1 que possuem metabolismo predominantemente glicolítico). Os nossos resultados sugerem que o SMEx reduza os níveis de citocinas anti-inflamatórias e recupere parcialmente a secreção de IL-12 em macrófagos M2. Em macrófagos M1 o SMEx não alterou a produção de mediadores pró-inflamatórios e reduziu a secreção de citocinas anti-inflamatórias. Em conjunto, os efeitos tóxicos do SMEx em células tumorais associados a sua capacidade de modular a resposta de macrófagos sugerem que o SMEx possa contribuir para o controle do crescimento de células tumorais e estimular os macrófagos para um perfil antitumoral. Conforme os nossos resultados, o SMEx representa um alvo promissor para novos estudos direcionados a estratégias imunoterapêuticas para o câncer de mama.

Palavras chave: Câncer de mama. Reprogramação metabólica. Macrófagos. *Smilax*. *Smilax officinalis*.

## ABSTRACT

Cancer is characterized by the accumulation of genetic alterations and loss of regulation of normal cellular processes, such as cell proliferation and death. In addition, metabolic reprogramming in tumor cells contributes to the growth, survival, evasion of the immune system and recruitment of cells into the tumor microenvironment. Among the immune cells recruited by the tumor, macrophages are the most abundant and influence tumor progression and antitumor response. Proinflammatory macrophages (M1 phenotype) may assist in tumor destruction, while anti-inflammatory macrophages (M2 profile) contribute to immunosuppression and tumor progression. In macrophages the alterations in the cellular metabolism are related to the proliferation, survival and the different functional phenotypes. In this context, *Smilax* spp. are used as medicinal plants and have already been associated with immunomodulatory and antitumor activities. The aim of the present study was to investigate the effects of the methanolic extract of *Smilax officinalis* (SMEx) on the viability and proliferation of mammary carcinoma and murine macrophages, as well as mitochondrial function and effector response of macrophages. Initially, we assessed the influence of SMEx on the viability and proliferation of 4T1 cells (murine mammary carcinoma) and J774A.1 macrophages through the MTT assay, trypan blue exclusion and viable cell count. Our results demonstrate that SMEx had cytotoxic effects on 4T1 cells at lower concentrations compared to macrophages. The effects of SMEx on cell viability were also evaluated by extracellular LDH determination and labeling with propidium iodide (flow cytometry). Treatment with SMEx induced death pathways with plasma membrane ruptures in 4T1 cells. While in macrophages the induction of death by SMEx was observed only at the 50 µg/mL, a higher dose than those toxic to 4T1 cells. Since in macrophages, SMEx at lower doses reduced the metabolism of MTT without interfering with viability and proliferation, we evaluated the mitochondrial activity of these cells. According to the data, SMEx was able to alter mitochondrial function and it may be suggested that it induces metabolic reprogramming. In this way, we investigated the effects of SMEx, in non-toxic concentrations, on macrophages stimulated with IL-4 (M2 phenotype dependent on oxidative metabolism), as well as on LPS-stimulated macrophages (M1 profile with predominantly glycolytic metabolism). Our results suggest that SMEx reduces the levels of anti-inflammatory cytokines and partially recovers the secretion of IL-12 in M2 macrophages. In M1 macrophages SMEx did not alter the production of pro-inflammatory mediators and reduced the secretion of anti-inflammatory cytokines. Taken together, the toxic effects of SMEx on tumor cells associated with their ability to modulate macrophage response suggest that SMEx may contribute to the control of tumor cell growth and stimulate macrophages to an antitumor profile. According to our results, SMEx represents a promising target for new studies aimed at immunotherapeutic strategies for breast cancer.

Key words: Breast cancer. Metabolic reprogramming. Macrophages. *Smilax*. *Smilax officinalis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência estimada para o câncer de mama no Brasil em 2018. ....	18
Figura 2: Marcadores da polarização experimental de macrófagos M1 e M2. ....	26
Figura 3: Reprogramação metabólica em células imunes. ....	28
Figura 4: Distribuição geográfica da família Smilacaceae. ....	31
Figura 5: <i>Smilax officinalis</i> . ....	32
Figura 6: Metabolismo do MTT em células J774A.1, RAW 264.7 e 4T1 expostas ao SMEEx. ....	45
Figura 7: Efeitos do SMEEx sobre o metabolismo do MTT, viabilidade e proliferação de células J774A.1 e 4T1. ....	47
Figura 8: Viabilidade de macrófagos J774A.1 e células 4T1 tratados com SMEEx. ....	49
Figura 9: $\Delta\psi_m$ em macrófagos J774A.1 tratados com SMEEx. ....	50
Figura 10: Efeitos do pré-tratamento com SMEEx sobre a produção de citocinas em macrófagos estimulados ou não com IL-4. ....	52
Figura 11: Efeitos do pré-tratamento com SMEEx sobre a produção de citocinas em macrófagos estimulados ou não com LPS. ....	54
Figura 12: Efeitos do pré-tratamento com SMEEx na produção de NO em macrófagos estimulados ou não com LPS ou LPS+IFN- $\gamma$ . ....	55

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Uso popular e atividades biológicas de <i>Smilax</i> spp. ....	33
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK	Proteína Quinase Monofosfato-Adenosina
APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CCL2	Ligante de quimiocina C-C 2
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
cFLIP	<i>(FADD-like IL-1<math>\beta</math>-converting enzyme)-inhibitory protein</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CpG-ODN	Oligodesoxinucleótido contendo domínios CpG
CSF-1	Fator 1 estimulador de colônia
CSF1R	Receptor do fator 1 estimulador de colônia
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSTs	Doenças sexualmente transmissíveis
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ER	Receptor de estrogênio
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FAS	Proteína da superfamília TNF
HBSS	Solução balanceada de Hank's
HER2	Receptor do fator de crescimento epideérmico humano
HIF	Fator induzido por hipóxia
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFN	Interferon

IL Interleucina  
IL-10R Receptor de interleucina 10  
iNOS Óxido Nítrico Sintase induzida  
L-Arg L-Arginina  
LDH Enzima Lactato Desidrogenase  
LPS Lipopolissacarídeo  
M1 Macrófagos de perfil 1  
M2 Macrófagos de perfil 2  
MDSCs Células Supressoras de Origem Mielóide  
MFI Média de intensidade de fluorescência  
MHC Complexo de histocompatibilidade principal  
MLKL Domínio de quinase de linhagem mista  
MTT Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio  
MYC Oncogene mielocitomatose  
NADH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida  
NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida  
NEED N-1-naphtilethtilenodiamina  
NF-κB Fator nuclear-kappaB  
NK *Natural Killer*  
NO Óxido Nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> Íons nitrito  
OXPHOS Fosforilação Oxidativa  
p53 Gene supressor de tumor 53  
PAMPs Padrões Moleculares Associados a Patógenos  
PBS Solução tampão fosfato salina  
PGC-1β Coativador PPAR-γ 1-beta  
PI Iodeto de propídeo  
PI3K Fosfatidilinositol 3-quinase  
PolyI:C Ácido policitidílico

PPAR- $\gamma$  Receptor- $\gamma$  ativado por proliferadores de peroxissoma

PR Receptor de progesterona

PRRs Receptores de reconhecimento de padrões

RAS Rat Sarcoma Vírus

RIPK Proteína quinase 1

ROS Espécies reativas de oxigênio

RPM Rotações por minuto

SFB Soro Fetal Bovino

SME<sub>x</sub> Extrato metanólico de *Smilax officinalis*

STAT Transdutores de sinal e ativadores de transcrição

TAMs Macrófagos Associados a Tumores

TCA Ciclo do Ácido Tricarboxílico

TGF- $\beta$  Fator de Crescimento Transformador beta

Th T helper

TLR Receptor tipo Toll

TMRE Tetrametilrodamina Etílico Éster

TNF Fator de Necrose Tumoral

TNFR Receptor do Fator de Necrose Tumoral

TRAIL *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

Tregs T regulatórias

UFJF Universidade Federal de Juiz de Fora

VEGF Fator de Crescimento Endotelial Vascular

ZBP1 Proteína de ligação a Z-DNA 1

$\Delta\psi_m$  Potencial de membrana mitocondrial

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER .....	17
2.2 FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER.....	19
2.3 REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA EM CÉLULAS TUMORAIS .....	22
2.4 EVASÃO DO SISTEMA IMUNE.....	23
2.5 REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA NA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS .....	24
2.6 IMUNOTERAPIA DO CÂNCER .....	28
2.7 <i>Smilax officinalis</i> .....	30
3 OBJETIVOS .....	35
3.1 OBJETIVO GERAL .....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Obtenção e preparo do SMEx.....	36
4.2 LINHAGENS CELULARES .....	36
4.2.1 Cultura de células .....	37
4.3 EFEITOS DO SMEx SOBRE A VIABILIDADE CELULAR .....	37
4.3.1 Redução do MTT .....	38
4.3.2 Exclusão de azul de tripan .....	38
4.3.3 Determinação da atividade LDH extracelular.....	39
4.3.4 Marcação com Iodeto de propídeo .....	39
4.4 INFLUÊNCIA DO SMEx SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	40
4.5 INFLUÊNCIA DO SMEx NA ATIVIDADE MITOCONDRIAL EM MACRÓFAGOS J774A.1 .....	41

4.6 EFEITOS DO SMEx NA ATIVAÇÃO E PRODUÇÃO DE MEDIADORES EM MACRÓFAGOS J774A.1 .....	41
4.6.1 Determinação de nitritos .....	42
4.6.2 Dosagem de citocinas.....	42
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	43
5 RESULTADOS .....	44
5.1 SMEx reduz o metabolismo do MTT em células J774.A1, RAW 264.7 e 4T1 .....	44
5.2 O SMEx tem efeitos tóxicos em células 4T1 em doses menores comparado a macrófagos J774A.1 .....	46
5.4 O SMEx interfere na secreção de mediadores produzidos por macrófagos estimulados com IL-4 (perfil M2).....	51
5.5 O SMEx reduz a produção de citocinas anti-inflamatórias em macrófagos M1 .....	53
6 DISCUSSÃO .....	56
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	60
REFERÊNCIAS.....	61

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer, com crescente incidência, deve representar a principal causa de morte em todos os países no século XXI (BRAY et al., 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, uma em cada seis mortes no mundo ocorre devido ao câncer e a prevalência dos últimos 5 anos é cerca de 43,8 milhões de pessoas diagnosticadas com câncer. Os tipos mais frequentes e com maior mortalidade são o câncer de pulmão entre os homens e câncer de mama para as mulheres (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER IARC, 2018).

O câncer consiste em um conjunto de doenças complexas com características clássicas, por exemplo, a instabilidade genética, proliferação excessiva e evasão da morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Outros marcadores emergentes adquiridos durante o desenvolvimento do tumor são a reprogramação do metabolismo, evasão do sistema imunológico e o recrutamento de células, tais como fibroblastos e células imunes, para um microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Vias de sinalização oncogênicas e sinais do ambiente direcionam a reprogramação do metabolismo, o que sustenta o crescimento e sobrevivência das células tumorais (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; PAVLOVA; THOMPSON, 2016). A maioria das células tumorais altera diferentes vias metabólicas e a glicose representa um substrato essencial para a proliferação e progressão tumoral (LIBERTI; LOCASALE, 2016). A reprogramação do metabolismo em células tumorais resulta em diversos metabólitos que influenciam o microambiente e permitem o desenvolvimento tumoral e a evasão do sistema imune (MAMAN; WITZ, 2018). No microambiente tumoral, os macrófagos são as principais células imunes (WILLIAMS; YEH; SOLOFF, 2016).

Os macrófagos são efetores essenciais da imunidade inata e contribuem para defesa do organismo, homeostase e patologias (BISWAS; MANTOVANI, 2010). Em resposta a diferentes estímulos, essas células sofrem alterações metabólicas para suportar a proliferação, sobrevivência e os diferentes fenótipos funcionais (KELLY; O'NEILL, 2015). No microambiente tumoral, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) são comumente descritos como anti-inflamatórios (fenótipos M2), os quais

contribuem para a imunossupressão, progressão tumoral, angiogênese e metástase. No entanto, macrófagos pró-inflamatórios (fenótipos M1) podem auxiliar na destruição de células tumorais (HANAHAN; COUSSENS, 2012; WEAGEL et al., 2015). Com base na plasticidade dos macrófagos e o suporte na resposta antitumoral ou progressão tumoral, estratégias para a modulação de TAMs representam opções de imunoterapia para o câncer (GUIDUCCI et al., 2005; JOSEPHS; BAX; KARAGIANNIS, 2015).

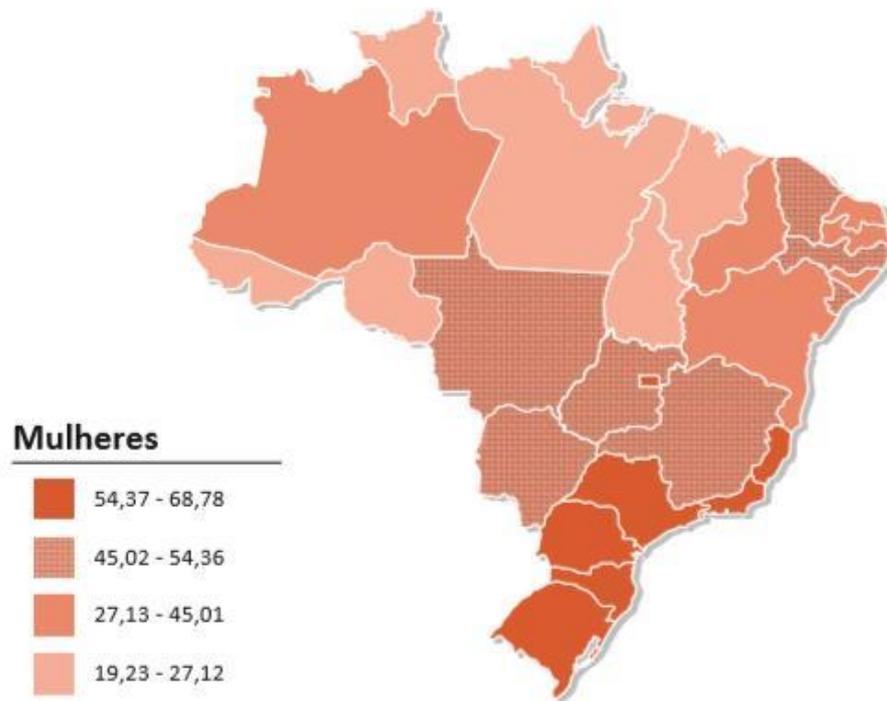
Neste contexto, as espécies do gênero *Smilax* são amplamente usadas como plantas medicinais. Diferentes estudos com *Smilax* spp. demonstraram atividades anti-inflamatória e antioxidante (HIROTA et al., 2016), imunomoduladora (JIANG; XU, 2003) e antitumoral (SHE et al., 2015; SHE et al., 2017). Apesar do seu uso popular, a espécie brasileira *Smilax officinalis* não há pesquisas relacionadas ao seu potencial antitumoral, tanto como efeitos diretos em células tumorais, como na modulação de macrófagos para combater o tumor.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

O câncer é um conjunto de doenças complexas e heterogêneas representadas por mais de 100 tipos e subtipos de tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Em termos globais estima-se 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de óbitos para 2018, enquanto até 2040 o número estimado é de 29,5 milhões de novos casos por ano (IARC, 2018). Entre os homens o câncer de pulmão é o mais comumente diagnosticado e a principal causa de morte por câncer, seguido pelo câncer de próstata e colorretal para incidência, e o câncer de fígado e estômago para mortalidade (IARC, 2018). Já na população feminina o câncer de mama é o mais frequente e a primeira causa de morte por câncer, seguido pelo câncer colorretal e de pulmão por incidência, e vice-versa pela mortalidade (IARC, 2018).

Para o câncer de mama feminino estima-se para o ano de 2018 a ocorrência de 2,1 milhões de novos casos, o que representa 24,2% dos tipos de câncer diagnosticados em mulheres em todo o mundo, e com aproximadamente 627 mil mortes em 2018 - 15% de todos os óbitos por câncer (IARC, 2018). No Brasil a estimativa é de 59.700 casos novos de câncer de mama para cada ano no biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos/100 mil habitantes. Esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil), enquanto no Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil) (Figura 1)(INCA, 2017).



**Figura 1: Incidência estimada para o câncer de mama no Brasil em 2018.**

Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2018, por estado da Federação.

Fonte: INCA, 2017.

Diversos fatores estão associados a etiologia do câncer de mama feminino: predisposição genética; idade da primeira menstruação menor do que 12 anos; menopausa após os 55 anos; gravidez após 30 anos ou mulheres que nunca engravidaram; uso de alguns tipos de anticoncepcionais; terapia de reposição hormonal na menopausa, especialmente se por tempo prolongado; exposição à radiação ionizante; consumo de bebidas alcoólicas; dietas hipercalóricas; e sedentarismo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

O câncer de mama é uma coleção de doenças com características histopatológicas distintas em decorrência de variadas alterações genéticas, ocasionando diferentes respostas aos tratamentos e desfechos clínicos (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007; ZARDAVAS et al., 2015). As características morfológicas presentes nesse tipo de câncer constituem a base do sistema de classificação histológica, o que possibilita informações prognósticas (SIMS et al., 2007; VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007; ZARDAVAS et al., 2015). Em pacientes com câncer de mama, também há expressão heterogênea do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano

(HER2), biomarcadores utilizados na prática clínica. Cerca de 60-70% dos cânceres de mama são ER positivos e esse receptor desempenha um papel importante na progressão e no tratamento. Já o receptor HER2 está presente em aproximadamente 20-30% dos casos e correlaciona-se positivamente com a agressividade do tumor (HAMMOND et al., 2010; KRISHNA et al., 2018).

## 2.2 FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER

Com o suporte da instabilidade genética, a maioria das células tumorais compartilham características essenciais que auxiliam na sobrevivência, proliferação e disseminação tumoral: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos supressores de crescimento, capacidade de resistir a sinais apoptóticos do ambiente, potencial replicativo ilimitado, secreção e intensa resposta a fatores de crescimento e sinais pró-angiogênicos, invasão tecidual e metástase, reprogramação do metabolismo, evasão do sistema imunológico, e recrutamento de células, como fibroblastos e células imunes, para um microambiente tumoral (também chamado de estroma tumoral) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O câncer é caracterizado pelo acúmulo de um número variável de alterações genéticas e perda da regulação dos processos celulares normais comumente responsáveis pela manutenção das taxas de proliferação e morte celular nos tecidos. Mutações em proto-oncogenes (genes estimuladores de divisão celular) originam os oncogenes, que permitem ganhos de funções às células alteradas. Ao contrário, os genes supressores tumorais (genes relacionados ao controle negativo do ciclo celular; gerenciamento da meia-vida ou processos de morte celular; e os genes de reparo do DNA) quando modificados apresentam ausência de sua ação e proteínas não funcionais podem ser codificadas (WARD, 2002; LEVINE; PUZIO-KUTER, 2012). As vias de sinalização oncogênicas são frequentemente ativadas por alterações genéticas como a perda da atividade do gene supressor tumoral p53 e por oncoproteínas – como RAS, MYC, AMPK e a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt, as quais influenciam diretamente a proliferação excessiva e evasão da morte celular (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011).

A proliferação celular é precisamente regulada através do equilíbrio de fatores positivos e reguladores negativos. As células normais requerem sinais de crescimento mitogênico (ação parácrina) para a entrada e progressão do ciclo de crescimento e divisão celular, garantindo a homeostase e as funções teciduais. De forma diferente, muitos tumores adquirem a capacidade de sintetizar ou induzir a secreção de fatores solúveis de crescimento necessários para a estimulação autócrina e de outros tipos celulares, por exemplo, o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); e fator de crescimento epidérmico (EGF). A sinalização proliferativa também pode ser desregulada em relação aos seus receptores, com a superexpressão permitindo hiper-responsividade a fatores de crescimento ou sinalização independente de ligante (WITSCH; SELA; YARDEN, 2010). No caso de alterações em fatores supressores de crescimento no câncer, modificações em mecanismos de retroalimentação negativos melhoram a sinalização proliferativa e auxiliam o descontrole do crescimento e o desenvolvimento tumoral (FREEMAN, 2000; AMIT et al., 2007).

Uma característica também presente no câncer é a evasão da morte celular com alterações em mecanismos regulados, como a apoptose e necroptose, que suportam a sobrevivência, progressão tumoral e resistência aos tratamentos (PENTIMALLI et al., 2018; MESSMER; SNYDER; OBERST, 2019). A apoptose é um processo fisiológico essencial para o desenvolvimento e a homeostase tecidual (FUCHS; STELLER, 2015). Normalmente a apoptose ocorre através de duas rotas: extrínseca e intrínseca. A via extrínseca é iniciada por sinais pró-apoptóticos extracelulares, que atuam via receptores de morte localizados na superfície das células. As interações de receptores da superfamília do fator de necrose tumoral (TNFR) e os seus ligantes desencadeiam essa via - por exemplo, o receptor FAS (também conhecido como CD95 ou APO-1) e o ligante de FAS (FASL), assim como o receptor TNFR e o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) (DICKENS et al., 2012). Já a via intrínseca é regulada por sinais intracelulares e a família de proteínas Bcl-2 coordena a sinalização da apoptose com a participação mitocondrial. As caspases relacionadas com as duas vias clivam seus substratos levando à condensação e fragmentação nuclear (FOX; MACFARLANE, 2016; CHIU et al., 2018). Outras características da apoptose são a redução do volume celular, externalização de fosfolípidios de membrana como a fosfatidilserina, manutenção da

integridade da membrana plasmática e liberação de corpos apoptóticos (FUCHS; STELLER, 2015).

A evasão a apoptose em tumores ocorre pela modulação da expressão ou interação de proteínas e a regulação metabólica. Nas células tumorais podem ser observadas a perda ou inibição do fator p53, expressão de inibidores das vias extrínseca (por exemplo, a proteína cFLIP) e intrínseca (fatores anti-apoptóticos da família Bcl-2), regulação negativa de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, e indução do fator 1 induzido por hipóxia (HIF1) que auxilia o metabolismo glicolítico, angiogênese e imunossupressão (FERNALD; KUROKAWA, 2013; SANIN et al., 2018).

Além da apoptose, estudos recentes demonstram que a necroptose também desempenha funções no controle tumoral. A necroptose auxilia na morte celular independente de caspases no período embrionário na ausência da apoptose, na homeostase de células T e na resposta a doenças infecciosas e ao câncer (KACZMAREK; VANDENABEELE; KRYSKO, 2013; FENG et al., 2015). Essa via de morte é iniciada por receptores como FAS e TNFR1, receptores de reconhecimento padrão (PRRs) incluindo os receptores tipo toll 3 (TLR3) e TLR4, e proteína de ligação a Z-DNA 1 (ZBP1; também conhecida como DAI). A transdução de sinais depende do complexo proteína quinase 1 (RIPK1) - RIPK3 e a proteína semelhante a um domínio de quinase de linhagem mista (MLKL) e pode ser inibida pela Necrostatina-1 (KACZMAREK; VANDENABEELE; KRYSKO, 2013; GALLUZZI et al., 2018). As alterações morfológicas observadas são aumento do volume celular, hidrólise desorganizada e extensa da cromatina e do DNA, rápida perda da integridade da membrana plasmática com liberação do conteúdo celular e a exposição de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (LAMKANFI; DIXIT, 2010).

A necroptose contribui para a eliminação de células tumorais e permite que as células apresentadoras de antígeno (APCs), via apresentação cruzada, ativem linfócitos T CD8+ naïve, efetores essenciais na resposta imune antitumoral. Apesar disso, a regulação negativa da expressão de RIPK3 e MLKL em alguns tumores sugere um mecanismo de escape da necroptose no câncer (FENG et al., 2015; KOO et al., 2015). No entanto, a necroptose extensa pode aumentar o risco de metástase tumoral com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a inflamação e a supressão do sistema imune (FENG et al., 2015; NAJAFOV; CHEN; YUAN, 2017).

Além das modificações relacionadas à proliferação excessiva e supressão da morte celular, o câncer consiste em complexos microambientes compostos por populações celulares heterogêneas e condições ambientais distintas (MAMAN; WITZ, 2018). As interações no microambiente tumoral são essenciais para a reprogramação metabólica de diferentes tipos celulares e para a evasão da resposta imune, duas características emergentes no câncer e que serão abordadas a seguir.

### 2.3 REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA EM CÉLULAS TUMORAIS

A reprogramação metabólica resulta de mutações oncogênicas e sinais extrínsecos para satisfazer as necessidades de proliferação e sobrevivência das células. As alterações nos metabólitos associadas à reprogramação metabólica no câncer têm efeitos na expressão gênica, na diferenciação celular e no microambiente tumoral (WARD; THOMPSON, 2012; PAVLOVA; THOMPSON, 2016). Um fenótipo metabólico bem descrito em diversos tumores é o efeito Warburg, em que a glicose é convertida em lactato pela fermentação em vez de ser totalmente metabolizada em dióxido de carbono via fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS), mesmo na presença de oxigênio e mitocôndrias funcionais (JUSTUS; SANDERLIN; YANG, 2015; LIBERTI; LOCASALE, 2016).

A fermentação aeróbica suporta a rápida proliferação celular com a manutenção do estado energético através da geração de adenosina trifosfato (ATP). Além disso, o metabolismo glicolítico, como fonte de carbono, fornece intermediários para as vias de biossíntese de novos nucleotídeos, lipídeos e aminoácidos necessários para a proliferação celular. Enquanto a produção da molécula reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), fornece poder redutor em muitas reações enzimáticas (como cofator) e também atividade antioxidante permitindo o equilíbrio redox apropriado (VILLALBA et al., 2013; LIBERTI; LOCASALE, 2016).

Assim como o metabolismo da glicose, o metabolismo da glutamina auxilia a proliferação de células tumorais. A glutaminólise contribui como fonte de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA, também chamado de ciclo de Krebs), como fonte de carbono e nitrogênio para produção de outros aminoácidos,

nucleotídeos e lipídeos, e para a manutenção redox (DEBERARDINIS; CHENG, 2010; BELORIBI-DJEFAFLIA; VASSEUR; GUILLAUMOND, 2016).

O catabolismo da glicose e glutamina em células tumorais produz altas concentrações de lactato. Esse metabólito pode ser utilizado como fonte de energia por células oxidativas no microambiente tumoral, ser capaz de induzir a reprogramação metabólica em outras células do estroma, e sinalizar para o endotélio estimulando a angiogênese e auxiliando o processo inflamatório no tumor (DOHERTY; CLEVELAND, 2013; PÉREZ-ESCUREDO et al., 2016).

Além disso, o fenótipo das células tumorais também é influenciado por condições do microambiente tumoral, por exemplo, a hipóxia e acidose (MAMAN; WITZ, 2018). A hipóxia desencadeia alterações moleculares como a indução de HIF1- $\alpha$  que regula a transcrição de genes associados à ativação da via glicolítica/supressão da fosforilação oxidativa, autofagia mitocondrial e síntese de ácidos graxos. Essas modificações induzidas pela hipóxia estão envolvidas na progressão do tumor como angiogênese, invasão tecidual e metástase, e recrutamento de diversas células para o microambiente (JUSTUS; SANDERLIN; YANG, 2015; SEMENZA, 2016). O acúmulo de lactato e a acidificação do meio extracelular, efeitos da reprogramação metabólica das células tumorais e da condição de hipóxia, representam estratégias para um microambiente capaz de promover a proliferação da célula tumoral e evasão do sistema imune (PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

## 2.4 EVASÃO DO SISTEMA IMUNE

No microambiente do tumor as células tumorais interagem com células residentes e/ou recrutadas, entre elas células vasculares e imunes, componentes da matriz extracelular e fatores solúveis. As interações bidirecionais resultam em diferentes fenótipos celulares e regulam a sobrevivência e crescimento tumoral (MAMAN; WITZ, 2018).

No infiltrado de células imunes presente no microambiente tumoral os macrófagos são os mais abundantes e influenciam diretamente a manutenção e progressão tumoral, a resposta imune antitumoral e a resposta terapêutica (NOY;

POLLARD, 2014; WILLIAMS; YEH; SOLOFF, 2016). A ativação e a polarização dos macrófagos são significativamente moduladas pelo tipo de câncer, estágio de desenvolvimento e os sinais solúveis no microambiente tumoral (BISWAS; MANTOVANI, 2010).

A ativação dos macrófagos resulta em um espectro de fenótipos funcionais, com as subpopulações M1 e M2 representando os extremos (MOSSER; EDWARDS, 2008; MURRAY et al., 2014). Os macrófagos M1 são recrutados para o tumor e podem auxiliar na destruição de células tumorais através de diferentes mecanismos efetores, tais como, produção de ROS, óxido nítrico (NO), fagocitose das células alvo, e produção de citocinas pró-inflamatórias capazes de direcionar a imunidade adaptativa para o perfil T helper 1 (Th1). Os macrófagos pró-inflamatórios também modulam negativamente as células imunossupressoras como macrófagos M2, células supressoras de origem mielóide (MDSCs) e células T regulatórias (Tregs) (MURRAY; WYNN, 2011; WEAGEL et al., 2015). Entretanto, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) são frequentemente caracterizados com o perfil M2. No microambiente tumoral, os produtos do metabolismo tumoral como lactato, quimiocinas e citocinas (por exemplo, CCL2, fator 1 estimulador de colônia (CSF-1), interleucina 10 (IL-10) e TGF- $\beta$ ) suportam a polarização dos macrófagos residentes para o fenótipo M2 (COLEGIO et al., 2014; JOSEPHS; BAX; KARAGIANNIS, 2015; VAHL et al., 2017). Associado a isso os TAMs atuam na produção de IL-10, fatores angiogênicos como TGF- $\beta$ , VEGF e EGF, metaloproteinases e com o recrutamento de células Treg, o que contribuem para a imunossupressão e resulta na progressão tumoral, angiogênese e metástase (HANAHAN; COUSSENS, 2012; WEAGEL et al., 2015).

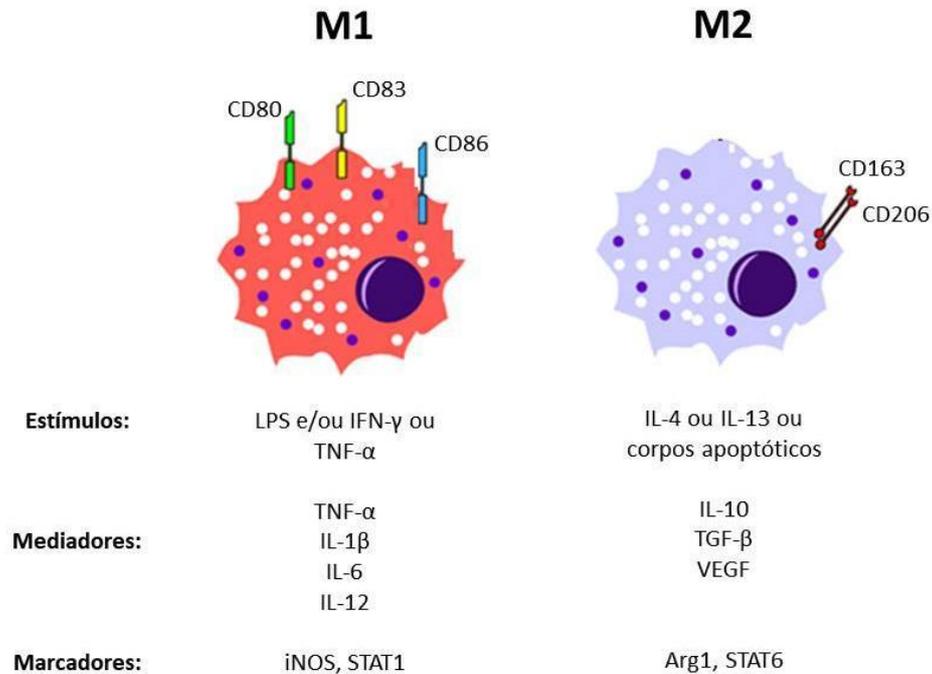
## 2.5 REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA NA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS

Os monócitos/macrófagos são efetores essenciais da imunidade inata e contribuem para o desenvolvimento dos tecidos, defesa do organismo, homeostase e em diversas patologias, inclusive o câncer. Essas células originam-se de precursores da medula óssea e são altamente heterogêneas (BISWAS; MANTOVANI, 2010; MURRAY; WYNN, 2011; ODEGAARD; CHAWLA, 2011).

Em resposta a disponibilidade de oxigênio e nutrientes, todas as células realizam alterações metabólicas para apoiar a sobrevivência e proliferação (THOMPSON, 2011). Além das condições ambientais, as células imunes também estão sujeitas a reprogramação do metabolismo frente à citocinas, DAMPs e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs)(GANESHAN; CHAWLA, 2014; PEARCE; PEARCE, 2013). As alterações nas vias metabólicas de macrófagos modulam o crescimento, sobrevivência e fenótipo celular, com controle de eventos transcripcionais e pós-transcripcionais que são centrais para a ativação e polarização (JHA et al., 2015a; KELLY; O'NEILL, 2015).

Experimentalmente, macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, um agonista do receptor tipo toll 4 (TLR4), e/ou citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  caracterizam o perfil de polarização M1 (Figura 2). A ligação LPS-TLR4 ou citocina-receptor induz a ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B (fator nuclear-kappaB) e STAT1 (transdutores de sinal e ativadores de transcrição 1) e a produção de mediadores pró-inflamatórios como intermediários reativos de nitrogênio e ROS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (LAWRENCE; NATOLI, 2011). Macrófagos M1 também apresentam aumento da expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II e moléculas coestimulatórias (por exemplo, CD80, CD83 e CD86), bem como a produção de IL-12 e IL-23 que direcionam a imunidade adaptativa para o perfil Th1 e Th17 (MANTOVANI et al., 2004; BISWAS; MANTOVANI, 2010). Contrariamente, macrófagos estimulados com IL-4, IL-13 ou corpos apoptóticos são descritos como perfil M2 (Figura 2). Macrófagos M2 ativam o fator de transcrição STAT6 além de outros fatores como STAT3 e PPAR- $\gamma$  (receptor- $\gamma$  ativado por proliferadores de peroxissoma) (ODEGAARD et al., 2007; MARTINEZ et al., 2013). O fenótipo M2 caracteriza-se pela baixa produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento de mediadores anti-inflamatórios (por exemplo, IL-10 e IL-1RA). Essas células também apresentam maior expressão das moléculas de superfície CD206 e CD163, e quimiocinas que participam do recrutamento de linfócitos do perfil Th2, eosinófilos, basófilos e linfócitos Treg. Assim, os macrófagos M2 contribuem para a polarização de uma resposta adaptativa de perfil Th2 (VAN DEN BOSSCHE et al., 2009; BISWAS; MANTOVANI, 2010). Além disso, macrófagos M2 produzem fatores de crescimento que estimulam as células epiteliais e os fibroblastos, incluindo TGF $\beta$ 1 e

VEGF, o que auxilia no reparo tecidual, angiogênese e imunossupressão (BISWAS; MANTOVANI, 2010; MURRAY; WYNN, 2011).



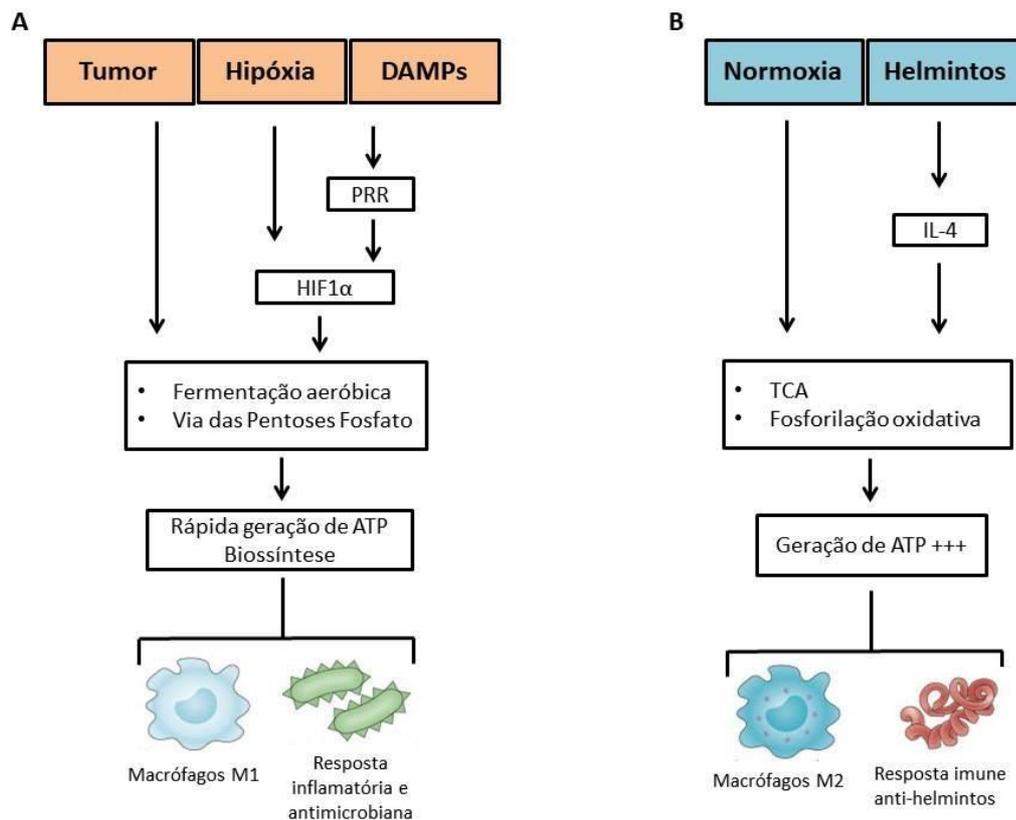
**Figura 2: Marcadores da polarização experimental de macrófagos M1 e M2.**

Macrófagos M1 podem ser induzidos experimentalmente pela ativação com LPS ou citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Enquanto citocinas anti-inflamatórias IL-4 e/ou IL-13, e corpos apoptóticos induzem experimentalmente macrófagos M2. A figura representa as moléculas de superfície, citocinas, enzimas e fatores de transcrição para os dois fenótipos de macrófagos. Adaptado de LUGO-VILLARINO et al., 2011.

A ativação e polarização dos macrófagos para os perfis M1 e M2 e suas funções efetoras são suportadas por alterações no metabolismo celular (PEARCE; PEARCE, 2013; VAN DEN BOSSCHE et al., 2016). Os macrófagos M1 alteram o metabolismo da glicose para a fermentação aeróbica (semelhante ao que ocorre em células tumorais) com a supressão da fosforilação oxidativa. Observa-se também o aumento da via das pentoses fosfato e geração de intermediários para síntese de proteínas e nucleotídeos, bem como NADPH para produção de ROS pela NADPH oxidase (Figura 3A) (FREEMERMAN et al., 2014; KELLY; O'NEILL, 2015; NAGY; HASCHEMI, 2015). Em macrófagos pró-inflamatórios a atividade mitocondrial também é desviada para a geração de ROS (VAN DEN BOSSCHE et al., 2016).

Além disso, em macrófagos M1 parte do piruvato produzido pelo metabolismo glicolítico alimenta o TCA. No entanto o piruvato não é totalmente metabolizado em CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono), uma vez que o TCA apresenta duas quebras. A primeira quebra no TCA ocorre ao nível do citrato, que é desviado para síntese de ácidos graxos, enquanto as etapas posteriores do TCA são alimentadas pela glutaminólise. Já a segunda quebra é observada ao nível do succinato, o qual é translocado para o citoplasma e estabiliza HIF1 $\alpha$  (MICHELUCCI et al., 2013; TANNAHILL et al., 2013; O'NEILL, 2015). O HIF1 $\alpha$  ativa a transcrição de genes para o fluxo glicolítico e a produção de mediadores inflamatórios, por exemplo, IL-1 $\beta$  (RODRIGUEZ-PRADOS et al., 2010; TANNAHILL et al., 2013). Já o metabolismo da L-Arginina é realizado pela enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS2 ou iNOS) sustentando a produção de NO e L-citrulina (BISWAS; MANTOVANI, 2011).

Em contraste com macrófagos M1, no fenótipo M2 o metabolismo oxidativo é regulado positivamente. A fosforilação oxidativa é realizada para geração de ATP e o TCA está intacto (Figura 3B) (JHA et al., 2015; PEARCE; PEARCE, 2013). Em resposta a IL-4 os macrófagos M2 realizam a lipólise lisossomal como fonte de ácidos graxos (HUANG et al., 2014). A maior captação e oxidação de ácidos graxos e a biogênese mitocondrial são suportadas pelos fatores PPAR- $\gamma$  e PGC-1 $\beta$  (PPAR- $\gamma$  coativador 1-beta) (VATS et al., 2006; NOMURA et al., 2016). Além do piruvato e a oxidação dos ácidos graxos o TCA é alimentado pelo aumento do metabolismo da glutamina e outros aminoácidos (SICA; MANTOVANI, 2012; O'NEILL, 2015). Outra diferença metabólica em macrófagos M2 é a conversão da L-Arginina pela enzima arginase 1 (Arg1) em ornitina e uréia (BISWAS; MANTOVANI, 2011; O'NEILL; HARDIE, 2013).



**Figura 3: Reprogramação metabólica em células imunes.**

Vias metabólicas descritas na polarização de (A) macrófagos M1 e na resposta inflamatória e antimicrobiana e (B) macrófagos M2 e na resposta imune anti-helmintos. Adaptado de O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016.

Com base na plasticidade efetora e metabólica dos macrófagos e no suporte à resposta antitumoral e progressão tumoral oferecido pelos TAMs, estratégias para a modulação de TAMs podem auxiliar o sistema imune a combater o câncer (NOY; POLLARD, 2014; WEAGEL et al., 2015).

## 2.6 IMUNOTERAPIA DO CÂNCER

O sistema imune apresenta um grande potencial para o controle da progressão tumoral e destruição específica, sem toxicidade para os tecidos normais, bem como geração de memória imunológica em longo prazo (FINN, 2012). A imunovigilância possui mecanismos de supressão tumoral através das células e moléculas efetoras da imunidade inata e adaptativa, incluindo macrófagos, células NK e linfócitos T e B (VESELY et al., 2011; CORTHAY, 2014). No entanto, com o

auxílio do microambiente tumoral e a reprogramação do metabolismo celular, uma característica do câncer é a evasão da destruição imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011; BISWAS, 2015).

Os estudos dos componentes das respostas imunes antitumorais e os mecanismos de escape no câncer permitiram o desenvolvimento de novas formas de tratamento (TOPALIAN; DRAKE; PARDOLL, 2015). A imunoterapia envolve intervenções para induzir ou estimular o sistema imune a reconhecer, rejeitar e destruir o tumor (LESTERHUIS; HAANEN; PUNT, 2011). Atualmente várias abordagens imunoterapêuticas são utilizadas em pacientes com estágios avançados de câncer, como inibidores de pontos de verificação imunológicos e as citocinas IL-2 e interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) (ABDEL-WAHAB; ALSHAWA; SUAREZ-ALMAZOR, 2017; ANDREWS; WARGO, 2017; PATEL; MINN, 2018).

Estratégias imunoterapêuticas e direcionadas para células tumorais modulam diretamente os TAMs ou influenciam componentes do microambiente tumoral, por exemplo, respostas imunes adaptativas (MANTOVANI; ALLAVENA, 2015). Opções imunoterapêuticas com macrófagos para o câncer são o bloqueio do recrutamento dessas células para os tumores, a supressão da sobrevivência de TAMs, sua reprogramação para o fenótipo M1 ou o aumento de suas atividades antitumorais (JOSEPHS; BAX; KARAGIANNIS, 2015; WEAGEL et al., 2015).

Os métodos descritos para reprogramar os macrófagos para o fenótipo M1 e estimular as atividades antitumorais de TAMs incluem: administração de agonistas de TLR, por exemplo, LPS, ácido policitidílico (polyI:C), monofosforil-A, imiquimod e oligodesoxinucleótido contendo domínios CpG (CpG-ODN); anticorpos coestimulatórios de CD40; bloqueio de IL-10 com anticorpos contra o seu receptor IL-10R; entrega de citocinas imunoestimuladoras como IL-12 para indução da resposta de linfócitos Th1; ou direcionamento de moléculas sinalizadoras intracelulares como PI3K $\gamma$  (COUSSENS; ZITVOGEL; PALUCKA, 2013; CASSETTA; POLLARD, 2017).

No que diz respeito à imunoterapia com alvo em macrófagos residentes no tumor, a sinalização através do CSF1R (receptor do fator 1 estimulador de colônia) também regula os fenótipos de TAMs. O bloqueio do CSF1 ou seu receptor CSF1R reduz o infiltrado de macrófagos e promove respostas adaptativas efetoras em modelos de adenocarcinomas mamários (DENARDO et al., 2011; STRACHAN et al., 2013). Já em modelo murino de glioma, a inibição do CSF1R direciona o fenótipo de

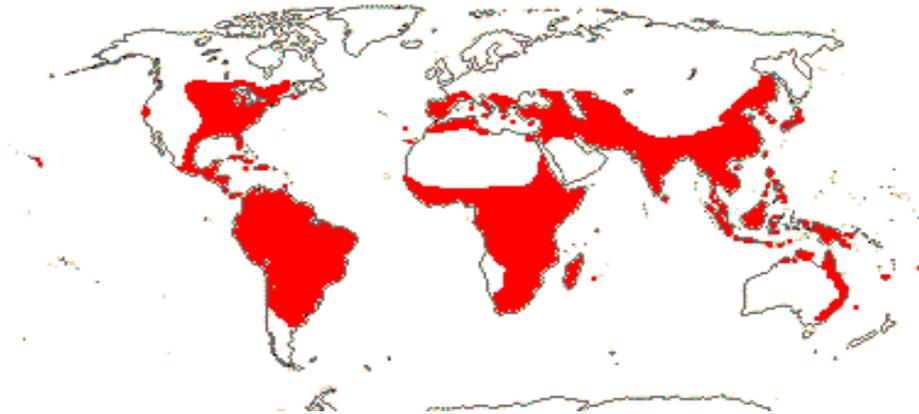
TAMs para a resposta antitumoral e tem efeitos na progressão tumoral (PYONTECK et al., 2013).

Estudos recentes demonstram que os TAMs também modulam as respostas de várias terapias antitumorais, incluindo a quimioterapia, radioterapia, drogas direcionadas para as células tumorais e vasculares, e imunoterapêuticos (DE PALMA; LEWIS, 2013). As abordagens terapêuticas atualmente utilizadas para o câncer podem promover mecanismos antitumorais de TAMs ou permitir que os TAMs auxiliem a progressão tumoral, revascularização, disseminação e resistência aos tratamentos (TARIQ et al., 2017).

Apesar das diversas estratégias imunoterapêuticas voltadas para os TAMs empregadas até o momento, nenhuma explorou a reprogramação metabólica de macrófagos anti-inflamatórios. O direcionamento de vias metabólicas em macrófagos M2 representa um potencial alvo terapêutico antitumoral e possível mecanismo para contornar a resistência à terapia para o câncer.

## 2.7 *Smilax officinalis*

O gênero *Smilax* é um dos representantes da família Smilacaceae. Essa família, uma das maiores entre as angiospermas, compreende mais quatro gêneros: Anikenton, Coprosmanthus, Heterosmilax, Nemexia (THE PLANT LIST, 2013). A família Smilacaceae é composta por plantas herbáceas ou arborizada, esguia ou trepadeira geralmente pouco ereta (CRONQUIST, 1981). A distribuição ocorre em regiões de clima pantropical a temperado, conforme observado na Figura 4 (STEVENS, 2017).



**Figura 4: Distribuição geográfica da família Smilacaceae.**  
 Fonte: STEVENS, 2017.

Dentre os gêneros da família Smilacaceae, *Smilax* é o maior compreendendo cerca de 310 espécies, das quais 33 estão distribuídas no Brasil em ecossistemas diferentes. O país possui 15 espécies exclusivas e a região sudeste pode ser considerada o centro da diversidade genética do gênero (ANDREATA, 1997, 2009; SOARES et al., 2014).

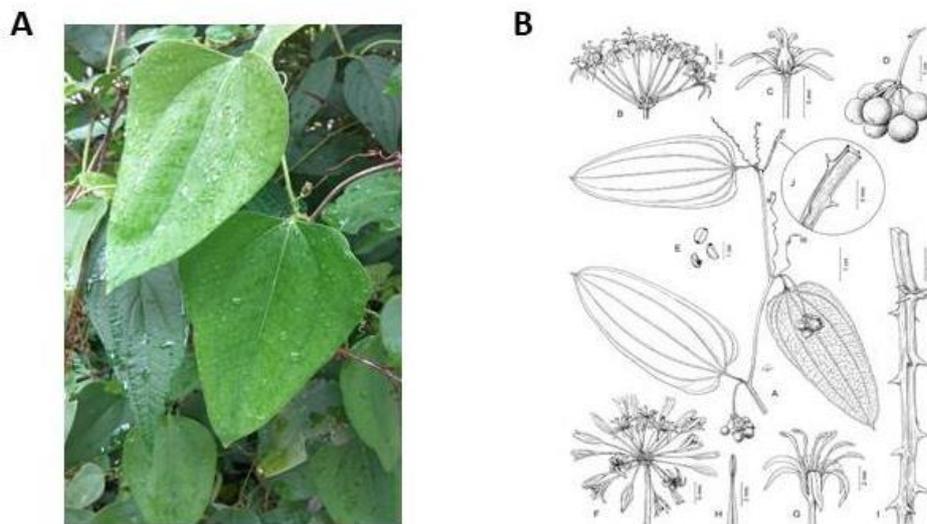
Espécies *Smilax* spp. são utilizadas como condimentos alimentares e na medicina tradicional em todo o mundo (AO et al., 2011; COX; JAYASINGHE; MARKHAM, 2005). O sistema subterrâneo é a parte vegetal mais usada. Entretanto análises com as folhas também evidenciaram importantes atividades terapêuticas (DE OLIVEIRA DIAS-NETO et al., 2013).

Estudos anteriores com *Smilax* spp. demonstraram atividades anti-inflamatória e antioxidante (HIROTA et al., 2016), imunomoduladora (JIANG; XU, 2003) e antitumoral (SHE et al., 2015; SHE et al., 2017). O uso popular e atividades terapêuticas relacionadas à *Smilax* spp. estão representadas no Quadro 1.

No Brasil, as espécies *Smilax* são conhecidas popularmente como “salsaparrilha” e “japacanga”. O consumo de folhas e frutos de *Smilax* spp. é relatado desde a época da colonização do país. Enquanto o uso medicinal, principalmente das raízes, demonstra ação depurativa, diurética e no tratamento de reumatismo e sífilis (LORENZI; MATOS, 2002; MEDEIROS; SENNA-VALLE; ANDREATA, 2007).

A espécie brasileira *Smilax officinalis* (Figura 5A) possui diversas sinônimas científicas: *Smilax barbillana* Cufod, *Smilax bernhardii* Apt, *Smilax chiriquensis* C. V.

Morton, *Smilax gilgiana* Apt, *Smilax tonduzii* Apt, *Smilax vanilliodora* Apt (FERRUFINO-ACOSTA, 2010). Essa espécie tem como características: rizomas alongados e os caules glabros, armados com espinhos grandes, retos e dispersos nos ramos terminais. Já as folhas são ovadas, lanceoladas, glabras, com ápice acuminado, base aguda ou arredondada. Enquanto as inflorescências são do tipo umbela, escalas emparelhadas e os frutos tipo bagas e vermelhos quando maduro (Figura 5B) (FERRUFINO-ACOSTA, 2010).



**Figura 5: *Smilax officinalis*.**

(A) Folhas de *Smilax officinalis*. (B) Características da espécie *Smilax officinalis*: A: ramo frutífero; B: inflorescência pistilada; C: flor pistilada; D: infrutescência; E: sementes; F: inflorescência estaminada; G: flor estaminada; H: estame; I: haste; J: caule com asas.

Fonte: FERRUFINO-ACOSTA, 2010.

<b>Espécie vegetal</b>	<b>Uso</b>	<b>País(es)</b>	<b>Referências</b>
<i>S. officinalis</i>	Gota, reumatismo, sífilis, diurético e depurativo.	Brasil	(DA SILVA; PARENTE, 2008; SOARES et al., 2014)
<i>S. larvata</i>	Anti-inflamatório e antinoceptivo.	Brasil	(HIROTA et al., 2016).
<i>S. china</i>	Diurético, desintoxicante, gota, artrite reumatoide, sífilis, disenteria bacilar aguda, doenças inflamatórias e antitumoral.	China	(CHEN et al., 2011; SHU; GAO; YANG, 2006; WU et al., 2010).
<i>S. glabra</i>	Dermatite, sífilis, gota, hiperuricemia, brucelose, nefrite aguda e crônica, e intoxicação por metais, problemas hepáticos, anti-inflamatório e antitumoral.	China	(CHU; NG, 2006; SHE et al., 2015; XIA et al., 2010).
<i>S. riparia</i>	Diurético, anti-inflamatório e antitumoral.	China	(WANG et al., 2013).
<i>S. canariensis</i>	Diurético, depurativo, hipoglicêmico e antiespasmódico.	Ilhas Canárias	(ABDALA et al., 2012).
<i>S. domingensis</i>	Diurético, anti-inflamatório, antialérgico, antifúngico, antipruriginoso, antisséptico, cicatrizantes, doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), e infecção urinária.	Guatemala	(CÁCERES et al., 2012).
<i>S. glycyphylla</i>	Reumatismo, sífilis, doenças pulmonares, profilaxia do escorbuto e flavorizante.	Austrália	(COX; JAYASINGHE; MARKHAM, 2005).

**Quadro 1: Uso popular e atividades biológicas de *Smilax* spp.**

Apesar do uso popular da espécie brasileira *Smilax officinalis* não há pesquisas relacionadas ao seu potencial antitumoral, tanto com efeitos diretos em células tumorais, como na modulação de macrófagos para combater o tumor.

No presente trabalho temos como hipótese que, além da ação citotóxica em células tumorais, o extrato metanólico de *Smilax officinalis* (SMEx) possa apresentar ações moduladoras sobre a resposta de macrófagos, sendo um alvo potencial para estudos relacionados a imunoterapia do câncer de mama. Dessa forma, a investigação dos efeitos do SMEx em células tumorais e na reprogramação do metabolismo celular em macrófagos pode fornecer bases para novas estratégias terapêuticas direcionadas para o câncer.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do SMEx na viabilidade e proliferação de células de carcinoma mamário e macrófagos murinos, bem como na ativação e respostas efetoras de macrófagos *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a influência do SMEx na viabilidade e proliferação de macrófagos J774A.1 e células 4T1(carcinoma mamário murino);
- ✓ Avaliar o efeito do SMEx na atividade mitocondrial de células J774A.1;
- ✓ Analisar os efeitos do SMEx na ativação e produção de mediadores em macrófagos J774A.1 estimulados com IL-4;
- ✓ Investigar as ações do SMEx na ativação e secreção de mediadores em macrófagos J774A.1 estimulados com LPS ou LPS+IFN.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e preparo do SMEx

O SMEx foi cedido pelo professor Dr. Ademar Alves da Silva Filho, do Núcleo de Identificação e Isolamento de Princípios Ativos Naturais da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). A coleta das folhas de *Smilax officinalis* ocorreu em maio de 2017 no Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Uma exsicata foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, registrada sob o código CESJ 65909.

O material vegetal foi seco em estufa de ar quente e circulante a  $40 \pm 5^\circ \text{C}$  por três dias, totalizando 298 g de folhas secas. Posteriormente, as folhas foram trituradas por moinho de facas e submetidas ao processo de extração a frio por solventes denominado maceração. A extração foi feita com o solvente metanol por 21 dias resultando na fração metanólica de *Smilax officinalis*.

Inicialmente preparou-se uma solução estoque (4 mg/mL) na qual o SMEx foi completamente solubilizado em Dimetilsulfóxido (DMSO; Synth). Para obter as concentrações do SMEx testadas, o estoque foi diluído em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO). Em todos os ensaios realizados utilizou-se o SMEx da mesma partida vegetal e extração.

### 4.2 LINHAGENS CELULARES

No presente trabalho, foram utilizadas as linhagens de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC® TIB67™) e RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™), assim como células de carcinoma mamário murino 4T1 (ATCC® CRL2539™). O cultivo celular foi realizado conforme descrito a seguir.

#### 4.2.1 Cultura de células

As células estavam criopreservadas em nitrogênio líquido em uma temperatura de -196 °C, em meio de congelamento composto por 90% de SFB e 10% do crioprotetor DMSO. O descongelamento ocorreu a 37°C e as células foram transferidas para tubos falcon de 15 mL contendo meio de cultura DMEM. Após a centrifugação (1400 RPM por 10 minutos), descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 2 mL de meio de cultura suplementado (10% de SFB + 1% de antibiótico). Em seguida, as células em suspensão foram transferidas para garrafas de cultura de 75 cm<sup>3</sup> (SARSTEDT) contendo 13 mL de meio suplementado e incubadas à temperatura de 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A cada dois ou três dias realizou-se a troca do meio de cultura até as células atingirem confluência de aproximadamente 80%.

Uma vez que as linhagens celulares utilizadas são aderentes, para sua remoção das garrafas de cultivo utilizou-se um suporte plástico (*cell scraper* – SARSTED) para os macrófagos J774A.1 e RAW 264.7. Para células 4T1 foi utilizado o tratamento com solução de tripsina-EDTA (0,25%; SIGMA-ALDRICH) por 3 a 5 minutos em 37 °C.

#### 4.3 EFEITOS DO SMEx SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

Os efeitos do SMEx sobre a viabilidade de macrófagos e células 4T1 foram avaliados através de diferentes técnicas, incluindo o ensaio de MTT, exclusão de azul de tripan, determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante das culturas e marcação das células com iodeto de propídeo seguida de leitura por citometria de fluxo.

Para os ensaios, realizou-se a contagem de células viáveis utilizando o corante azul de tripan 0,4% (Sigma) em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas em meio de cultura suplementado e incubadas para aderência celular por 24 horas. Em seguida, descartou-se o meio de cultura e foi adicionado novo meio suplementado e as concentrações a serem avaliadas do SMEx.

#### 4.3.1 Redução do MTT

Inicialmente avaliou-se a influência do SMEx no metabolismo do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em macrófagos J774A.1, RAW 264.7 e células 4T1. Esse método colorimétrico quantifica a conversão do reagente MTT, por desidrogenases mitocondriais, em cristais de formazan (composto com coloração roxa) (MOSMANN, 1983).

Células J774A.1 e RAW 264.7 ( $10^5$  células por poço) e 4T1 ( $10^4$  células por poço) em placas de 96 poços de fundo chato (KASVI) foram expostas ao SMEx nas doses de 0, 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , com três ou mais replicatas técnicas, e incubadas no tempos de 24 e 48 horas, a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Como controle foi utilizado o veículo DMSO na concentração de 0,05% (veículo).

Após o período de incubação desejado, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  por poço de uma solução contendo meio de cultura suplementado e 10% (v/v) do reagente MTT (5  $\text{mg/mL}$ , GIBCO™). As células foram novamente incubadas por 2 horas e 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  (RISS et al., 2013). Ao final deste intervalo, os sobrenadantes foram descartados e os cristais de formazan ressuspensos em 100  $\mu\text{L}$  de DMSO, sendo realizadas as leituras em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) a 595 nm. Os ensaios foram realizados três vezes e os resultados obtidos comparados às células não tratadas com SMEx, consideradas como o metabolismo celular em 100%.

#### 4.3.2 Exclusão de azul de tripan

Células J774A.1 ( $2 \times 10^5$  células por poço) e 4T1 ( $10^4$  células por poço) foram transferidas para placas de 24 poços de fundo chato (KASVI) e realizou-se o tratamento com SMEx (0, 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e as células removidas com tripsina-EDTA (300  $\mu\text{L}$  por poço de 3 a 5 minutos, a  $37^\circ\text{C}$ ) e SFB (300  $\mu\text{L}$  por poço) para inativação enzimática. As suspensões celulares foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e o pellet

ressuspendido em meio de cultura suplementado. Logo depois, as células foram diluídas na solução de corante azul de tripan 0,4% (fator de diluição 10 x). Dessa forma, as células não coradas e coradas foram contadas em câmara de Neubauer no microscópio de luz e determinado o número de células por mL. Os dados obtidos foram convertidos em porcentagem com o número total de células por poço representando 100%.

#### 4.3.3 Determinação da atividade LDH extracelular

Os macrófagos J774A.1 ( $2 \times 10^4$  células por poço) e células 4T1 ( $5 \times 10^3$  células por poço) foram inicialmente transferidas para placas de 96 poços de fundo chato. O tratamento com SMEx (0, 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) em macrófagos J774A.1 foi realizado por 6 ou 24 horas, enquanto em células 4T1 por 24 ou 48 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a 250 x g por 10 minutos. A atividade da enzima LDH nos sobrenadantes foi determinada por método colorimétrico utilizando o kit para detecção de LDH extracelular (Roche), conforme protocolo do fabricante. O sobrenadante de células expostas à solução de triton x-100 a 2% em meio de cultura foi utilizado como controle positivo (100% de atividade da LDH extracelular). As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados em expressos em porcentagem.

#### 4.3.4 Marcação com Iodeto de propídeo

Células J774A.1 ( $2 \times 10^5$  células por poço) e 4T1 ( $2 \times 10^4$  células por poço) foram plaqueadas em placas de 48 poços e tratadas com SMEx. Em macrófagos J774A.1 as concentrações testadas foram 0, 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$  por 6 ou 24 horas. Já as células 4T1 foram expostas a 0, 10, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  do SMEx por 24 ou 48 horas. Ao final do tempo de incubação, os sobrenadantes foram recolhidos e transferidos para tubos de centrifugação (eppendorf). Na coleta das células utilizou-se tripsina-EDTA (150  $\mu\text{L}$  por poço de 3 a 5 minutos a 37 °C) e SFB (150  $\mu\text{L}$  por poço) para inativação

da enzima. As células foram transferidas para os mesmos tubos dos sobrenadantes. Além disso, para garantir a retirada de todas as células, adicionou-se 200 µL por poço de PBS (solução fosfato salina) gelado, que foram também transferidos para os tubos eppendorf.

As suspensões celulares foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram ressuspensas em 200 µL de solução tampão FACS (PBS com 1% de SFB) gelado e transferidas para os tubos específicos para citometria (CORNING). A marcação foi realizada através da adição de 3 µL por tubo de iodeto de propídeo (10 µg/mL) 15 minutos antes da leitura. Células não tratadas com SMEx e não marcadas foram utilizadas como controle.

As amostras foram avaliadas em citômetro de fluxo FACScanto II (Becton & Dickinson) com 30.000 eventos adquiridos. Para as análises utilizou-se o programa *FlowJo*® onde o percentual de células positivas para o iodeto de propídeo foi determinada.

#### **4.4 INFLUÊNCIA DO SMEx SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR**

Com o auxílio do corante azul de tripan, o número de células foi determinado antes e após o tratamento com SMEx. Para isso, células J774A.1 ( $2 \times 10^5$  células por poço) e 4T1 ( $10^4$  células por poço) foram transferidas para placas de 24 poços de fundo chato e incubadas por 24 horas para aderência celular. Após esse período, realizou-se o tratamento com SMEx (0, 5, 10, 25 e 50 µg/mL) por 24 horas. Em seguida, as células foram removidas com tripsina-EDTA (300 µL por poço de 3 a 5 minutos, a 37° C) e SFB (300 µL por poço) para inativação enzimática. As suspensões celulares foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e o pellet ressuspensado em meio de cultura suplementado. Para a contagem em solução do corante azul de tripan 0,4% (fator de diluição 10) das células viáveis utilizou-se a câmara de Neubauer e o número de células por mL foi determinado. Os dados foram comparados com os valores obtidos de células não tratadas no tempo de 0 hora (momento do tratamento com SMEx) e convertidos em porcentagem com o número total de células por poço representando 100%.

#### **4.5 INFLUÊNCIA DO SMEx NA ATIVIDADE MITOCONDRIAL EM MACRÓFAGOS J774A.1**

A atividade mitocondrial em macrófagos expostos ao SMEx foi avaliada com a sonda fluorescente tetrametilrodamina etílico éster (TMRE)(Fluka Analytical) que mede o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) por citometria de fluxo. Para isso, células J774A.1 foram transferidas para placas de petri 90 x 15 mm estéril (com 1 divisão) na concentração de  $10^6$  células por parte da placa e incubadas para aderência por 24 horas. Posteriormente, descartou o meio de cultura e adicionou-se novo meio suplementado e o tratamento com SMEx (0, 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após a incubação por 6 horas, as células foram removidas com solução de tripsina-EDTA (1 mL de 3 a 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$ ) e adicionou-se SFB para inativação da enzima. A suspensão celular foi centrifugada a 1500 RPM por 5 min e as células ressuspensas em 300  $\mu\text{L}$  de solução balanceada de Hank's (HBSS). Em tubos para citometria realizou-se a marcação com a sonda TMRE (100 nM por tubo) por 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Como controles foram utilizadas células não tratadas com SMEx e células não marcadas.

As amostras foram avaliadas em citômetro de fluxo com 30.000 eventos adquiridos e para as análises utilizou-se o programa *FlowJo*®. Os dados obtidos foram representados em média de intensidade de fluorescência (MFI).

#### **4.6 EFEITOS DO SMEx NA ATIVAÇÃO E PRODUÇÃO DE MEDIADORES EM MACRÓFAGOS J774A.1**

Para avaliar a produção de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e citocinas em macrófagos J774A.1 tratados com SMEx, as células foram transferidas para placas de 24 poços de fundo chato na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células por poço e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas para adesão celular.

#### 4.6.1 Determinação de nitritos

Na determinação de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), células J774A.1 foram tratadas com SMEx nas doses de 0, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  por 6 horas. Logo depois, essas células foram estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) ou LPS e IFN- $\gamma$  (9  $\text{ng/mL}$ ) por 24 horas e os sobrenadantes coletados.

A quantidade de  $\text{NO}_2^-$  foi determinada no sobrenadante dessas culturas através da Reação de Griess como indicadora da produção de NO (TSIKAS, 2007). Para isso, em placa de 96 poços adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  por poço dos sobrenadantes das culturas, seguido de 25  $\mu\text{L}$  da solução de sulfanilamida 1% diluída em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2,5% e 25  $\mu\text{L}$  de N-1-naphtilettilenodiamina (NEED) a 0,1%, em solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 2,5%. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Os ensaios foram realizados com quatro replicatas técnicas e essas comparadas a curva padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200  $\mu\text{M}$  preparada por diluição seriada em água destilada. Os sobrenadantes de células não tratadas na presença ou ausência dos estímulos foram utilizados como controles. Os resultados obtidos foram expressos em  $\mu\text{M}$ .

#### 4.6.2 Dosagem de citocinas

Para avaliar a produção de citocinas, células J774A.1 foram tratadas com SMEx nas concentrações de 0, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  por 6 horas e em seguida, estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) ou IL-4 (20  $\text{ng/mL}$ ) por 24 horas. Nos sobrenadantes coletados, citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12, e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  foram quantificadas por método imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche, utilizando kits comerciais (Becton & Dickinson Company), conforme protocolo do fabricante. Os controles utilizados foram células não tratadas com SMEx na presença ou ausência dos estímulos. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm e as concentrações das citocinas ( $\text{pg/mL}$ ) determinadas em comparação às curvas padrões obtidas.

## 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism versão 7 e os resultados analisados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância *one-way* ANOVA seguido do pós-teste Dunnett ou Tukey. Além disso, para avaliar os efeitos do SMEx sobre a viabilidade em células J774A.1 e 4T1, através do ensaio de LDH, realizou-se a análise *two-way* ANOVA com o pós-teste Sidak's. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

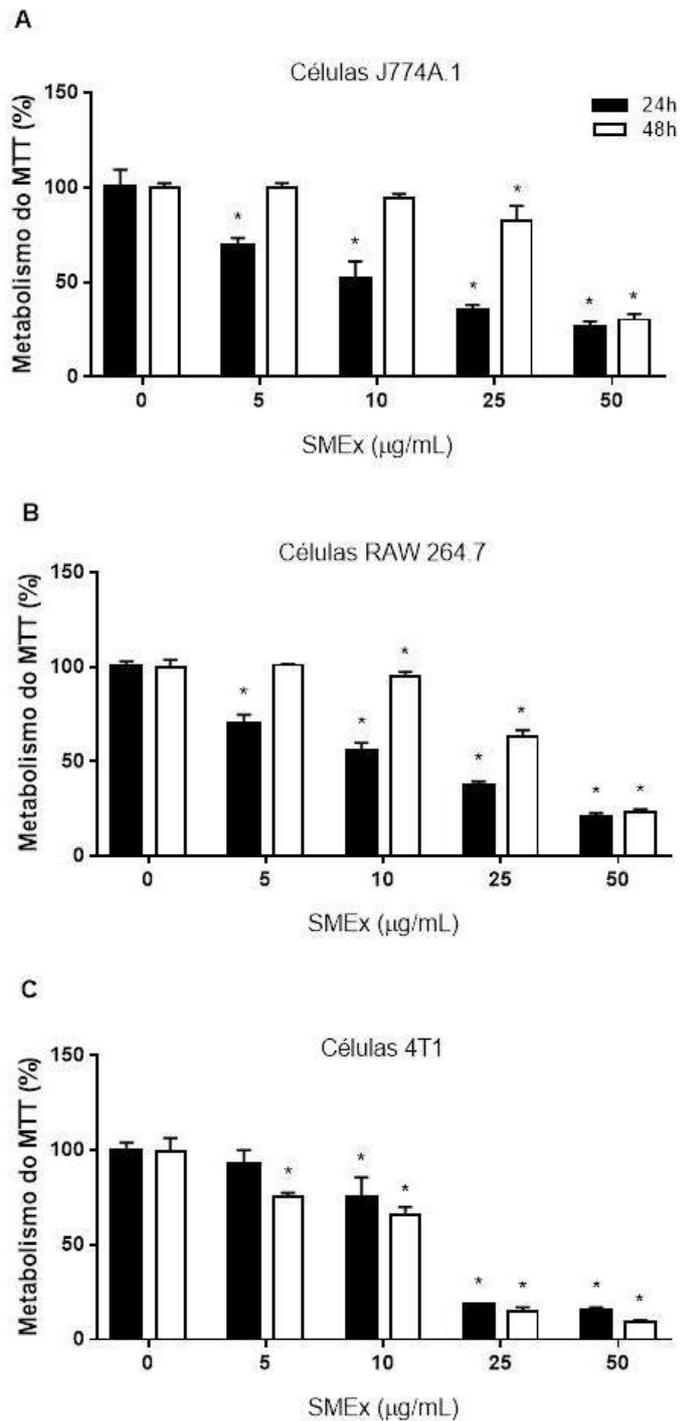
## 5 RESULTADOS

### 5.1 SMEx reduz o metabolismo do MTT em células J774.A1, RAW 264.7 e 4T1

Inicialmente foram avaliados os possíveis efeitos do SMEx sobre o metabolismo do MTT em macrófagos murinos J774A.1 e RAW 264.7, e células de carcinoma mamário murino 4T1. Para isso, as células foram expostas ao SMEx nas concentrações de 0, 5, 10, 25 e 50 µg/mL nos tempos de 24 e 48 horas. O MTT em células eucarióticas é reduzido em cristais de formazan através de enzimas mitocondriais (desidrogenases succínicas), e a reação envolve a transferência de elétrons de moléculas redutoras, como o NADH, para o MTT (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2013).

Conforme demonstrado na figura 6A, em todas as concentrações testadas, o SMEx reduziu de forma significativa o metabolismo do MTT em macrófagos no tempo de 24 horas. Entretanto, após 48 horas as células J774A.1 tratadas com as doses de 5 e 10 µg/mL recuperaram o metabolismo do MTT para níveis semelhantes ao controle não tratado (Figura 6A). Para confirmar os dados obtidos avaliamos os efeitos do SMEx em uma segunda linhagem de macrófagos murinos, RAW 264.7. De forma semelhante às células J774A.1, o SMEx foi capaz de diminuir o metabolismo do MTT em macrófagos RAW 264.7 no tempo de 24 horas, seguido do retorno do metabolismo celular para os níveis basais após 48 horas (Figura 6B). Já em células 4T1, as concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL do SMEx reduziram o metabolismo do MTT no tempo de 24 horas. Entretanto em 48 horas não foi observado o retorno do metabolismo de células 4T1 expostas ao SMEx e todas as doses diminuíram a conversão do MTT (Figura 6C).

Em conjunto, esses dados demonstram que o tratamento com SMEx nas duas menores concentrações (5 e 10 µg/mL) reduziu o metabolismo do MTT após 24 horas em macrófagos J774A.1 e RAW 264.7 com a recuperação do metabolismo no tempo de 48 horas. No entanto em células tumorais 4T1 a diminuição do metabolismo do MTT foi observada em 24 e persistiu por 48 horas após o tratamento, sem a recuperação do metabolismo celular.



**Figura 6: Metabolismo do MTT em células J774A.1, RAW 264.7 e 4T1 expostas ao SMEx.**

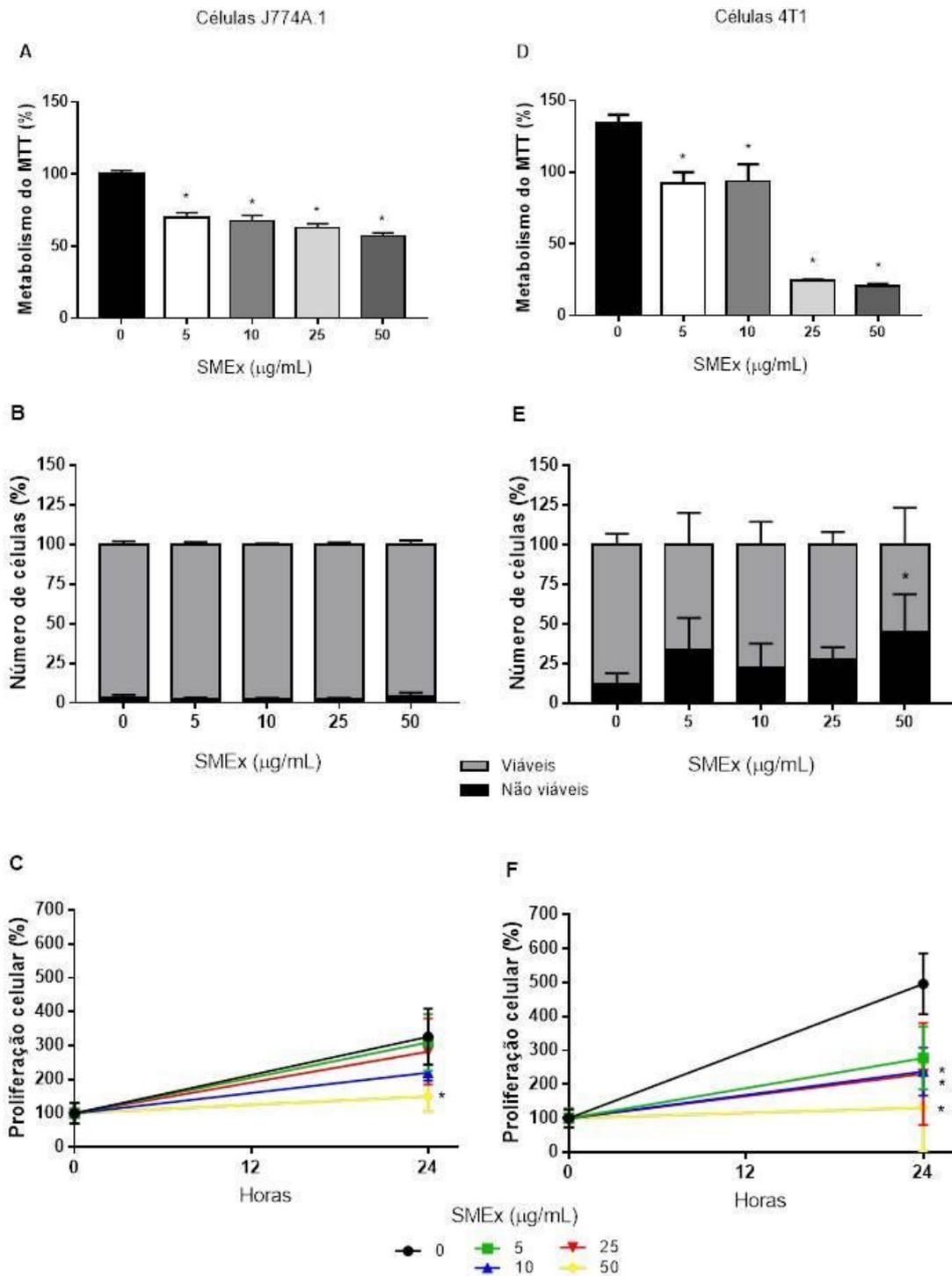
(A) Células J774A.1; (B) células RAW 264.7; (C) células 4T1 foram tratadas com SMEx nas doses de 0, 5, 10, 25 e 50 µg/mL. Após 24 ou 48 horas determinou-se o percentual do metabolismo do MTT. As barras representam média  $\pm$  desvio padrão da média de 5 replicatas experimentais. Os gráficos são representativas de 5 a 6 experimentos independentes (J774A.1 e 4T1) ou 2 experimentos em RAW 264.7. \* $p < 0,05$  em comparação as células não tratadas. Como controle o veículo DMSO (0,05%) não alterou o metabolismo do MTT (não demonstrado).

## 5.2 O SMEx tem efeitos tóxicos em células 4T1 em doses menores comparado a macrófagos J774A.1

O método de MTT pode ser utilizado para a avaliação do metabolismo mitocondrial, determinação indireta da viabilidade ou proliferação celular (GAUCHER; JARRAYA, 2015; RISS et al., 2013). De acordo com os resultados anteriores, o SMEx é capaz de diminuir significativamente o metabolismo do MTT em macrófagos no tempo de 24 horas e em células tumorais 4T1 nos tempos de 24 e 48 horas (Figura 6). Assim, com o intuito de melhor compreender os efeitos do SMEx no tempo de 24 horas em macrófagos J774A.1 e em células tumorais 4T1, o metabolismo do MTT foi avaliado em paralelo a avaliação da viabilidade e proliferação celular pela técnica de exclusão do azul de tripan e pela contagem de células viáveis. O método de exclusão de corante baseia-se no princípio de que células viáveis apresentam membranas celulares intactas e capacidade para excluir corantes como o azul de tripan através das ATPases celulares, enquanto células inviáveis permanecem coradas (STROBER, 2015).

Os dados obtidos demonstram que apesar do SMEx reduzir o metabolismo do MTT (Figura 7A) não houve influência na viabilidade de células J774A.1, conforme demonstrado pelo percentual de células positivas para o azul de tripan (Figura 7B). Além disso, somente na dose de 50 µg/mL o SMEx teve efeito sobre a proliferação celular (Figura 7C). No entanto, em células 4T1 o SMEx foi capaz de diminuir o metabolismo do MTT (Figura 7D), bem como aumentar o número de células não viáveis (Figura 7E) e nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL reduzir significativamente a proliferação tumoral em comparação as células não tratadas (Figura 7F).

De acordo com os resultados, o SMEx nas menores concentrações (5- 25 µg/mL) foi capaz de reduzir o metabolismo do MTT sem interferir na viabilidade e proliferação de macrófagos J774A.1. Enquanto nas células tumorais 4T1 o tratamento com o SMEx tem efeito citotóxico sobre a viabilidade e proliferação celular em todas as concentrações testadas.



**Figura 7: Efeitos do SMEx sobre o metabolismo do MTT, viabilidade e proliferação de células J774A.1 e 4T1.**

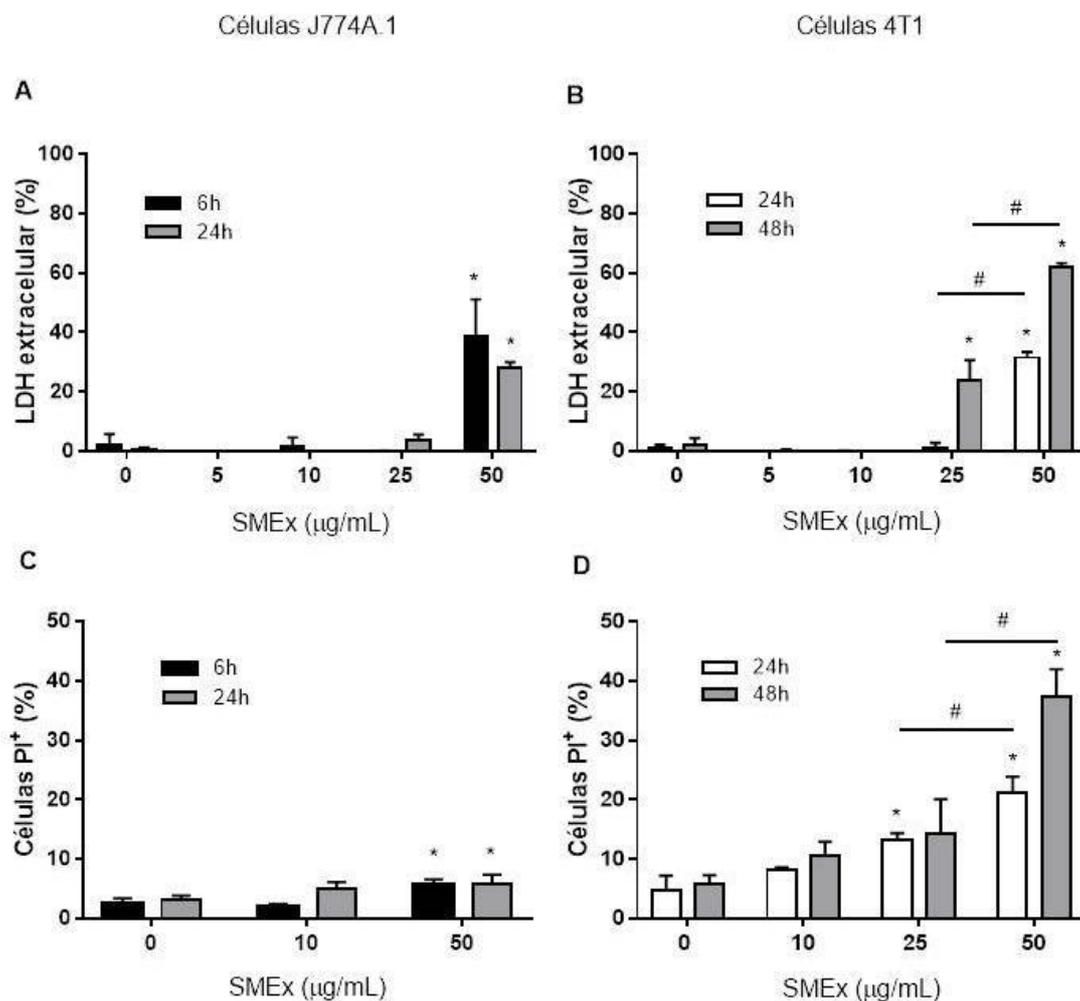
Células J774A.1 e 4T1 foram tratadas com as doses de 0, 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  do SMEx. Após 24 horas determinou-se o percentual de (A e D) metabolismo do MTT, (B e E) viabilidade celular através do método de exclusão do azul de tripan, e (C e F) a proliferação celular por contagem de células viáveis. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 replicatas experimentais. Os gráficos são representativos de 3 a 4 experimentos independentes (ensaio de MTT) e 1 a 2 para a viabilidade e proliferação celular. \* $p < 0,05$  comparado com células não tratadas.

Uma vez que o SMEx somente na dose de 50 µg/mL foi capaz de interferir na proliferação de macrófagos J774A.1, enquanto em células de carcinoma mamário murino as concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL apresentaram efeito citotóxico no tempo de 24 horas, nós investigamos se o tratamento com SMEx induz a morte celular através de vias que cursam com perda da integridade da membrana plasmática. Para tanto, em células J774A.1 nós avaliamos a atividade da enzima LDH no sobrenadante das culturas tratadas por 6 e 24 horas, uma vez que no tempo de 48 horas o tratamento com SMEx já apresenta perda do efeito em macrófagos (Figura 6). Além disso, nós avaliamos o percentual de células positivas para o corante iodeto de propídeo (PI) por citometria de fluxo. Já em células 4T1 como as ações do SMEx ocorreram em 24 e 48 horas, realizamos as análises nesses dois tempos de tratamento.

A atividade da lactato desidrogenase no sobrenadante de cultura de células pode ser mensurada devido à rápida liberação dessa enzima para o meio extracelular após danos na membrana plasmática (DECKER; LOHMANN-MATTHES, 1988). Dessa forma, no tratamento de células J774A.1 com SMEx, somente com 50 µg/mL pôde ser determinado aumento significativo na atividade da LDH no meio extracelular nos tempos de 6 e 24 horas (Figura 8A). Nos sobrenadantes de células 4T1 expostas ao SMEx por 24 horas foi observado o aumento da LDH extracelular na concentração de 50 µg/mL e após 48 horas nas doses de 25 e 50 µg/mL (Figura 8B).

No ensaio com o iodeto de propídeo por citometria de fluxo, esse corante fluorescente é capaz de se intercalar a ácidos nucleicos somente em células com alterações na integridade da membrana, enquanto células viáveis não são coradas (CROWLEY et al., 2016). Conforme demonstrado na Figura 8C, o tratamento de macrófagos J774A.1 com SMEx por 6 ou 24 horas na concentração de 10 µg/mL não induziu aumento significativo no percentual de células PI positivas. Já na dose de 50 µg/mL pode-se observar o aumento de células PI positivas nos dois tempos avaliados (Figura 8C). Em relação às células 4T1 tratadas com o SMEx, em 24 horas houve o aumento significativo de células PI positivas na dose de 25 µg/mL e após 48 horas nas concentrações de 25 e 50 µg/mL (Figura 8D). Além disso, após 48 horas os dados obtidos pelas duas técnicas sugerem uma resposta dose dependente das células tumorais 4T1 ao SMEx (Figuras 8B e D).

Os dados obtidos demonstram que em macrófagos J774A.1 o tratamento com SMEx foi tóxico somente na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , sendo capaz de induzir a morte celular por vias que cursam com a ruptura da membrana plasmática. Enquanto em células 4T1 o SMEx foi tóxico em concentrações inferiores, e nas doses de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  induziu a morte por vias que cursam com danos na membrana celular.

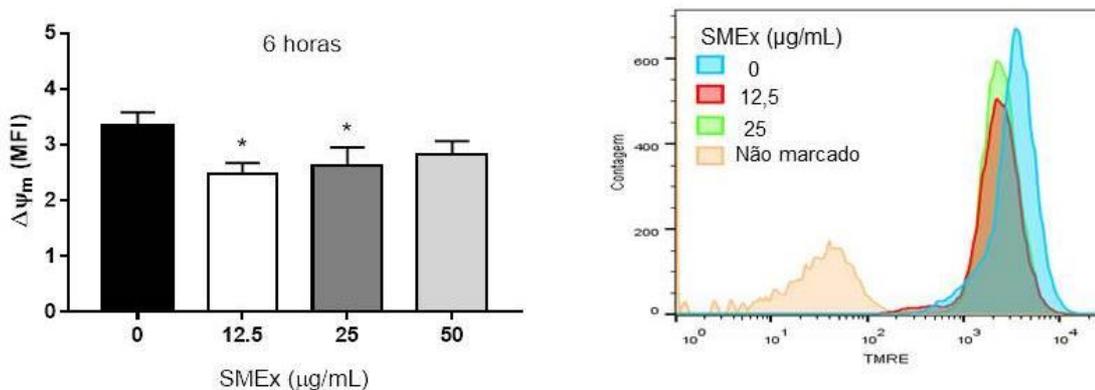


**Figura 8: Viabilidade de macrófagos J774A.1 e células 4T1 tratados com SMEx.**

Células J774A.1 foram tratadas com diferentes doses do SMEx e após 6 ou 24 horas determinou-se o percentual de (A) LDH extracelular e (C) células PI positivas. Células 4T1 foram expostas ao SMEx em diferentes concentrações por 24 ou 48 horas e também foi determinado o percentual de (B) LDH extracelular e (D) e células PI positivas. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média de 4 a 8 replicatas experimentais para LDH e 3 a 4 replicatas para PI. Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes para LDH e PI. \* $p < 0,05$  comparado com células não tratadas. #  $p < 0,05$  entre as doses de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  no mesmo tempo de tratamento.

### 5.3 O tratamento com SMEx reduz o $\Delta\psi_m$ em macrófagos J774A.1

Uma vez que o SMEx nas menores concentrações foi capaz de reduzir o metabolismo do MTT em macrófagos murinos sem interferir na sua viabilidade e proliferação em 24 horas (Figuras 6, 7 e 8), nós tomamos por hipótese que o SMEx altere a função mitocondrial e, portanto, seja capaz de reprogramar metabolicamente essas células. Para verificar essa hipótese, células J774A.1 foram expostas ao SMEx (0, 12,5, 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 6 horas. Em seguida, determinou-se o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) utilizando a sonda TMRE por citometria de fluxo. As mitocôndrias são as principais responsáveis por fornecer energia na maioria das células através da síntese de ATP pela fosforilação oxidativa. Essas organelas são fundamentais em processos fisiológicos complexos, incluindo crescimento, divisão e morte celular programada, bem como nos fenótipos de células imunes e suas funções efetoras (MEHTA; WEINBERG; CHANDEL, 2017; WEINBERG; SENA; CHANDEL, 2015). Conforme o esperado, o SMEx reduziu significativamente o  $\Delta\psi_m$  nas concentrações de 12,5 e 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em relação as células não tratadas (Figura 9). A despolarização mitocondrial e a diminuição do metabolismo do MTT não relacionadas à perda de viabilidade celular indicam menor atividade mitocondrial e podem sugerir uma reprogramação metabólica nos macrófagos tratados com SMEx.



**Figura 9:  $\Delta\psi_m$  em macrófagos J774A.1 tratados com SMEx.**

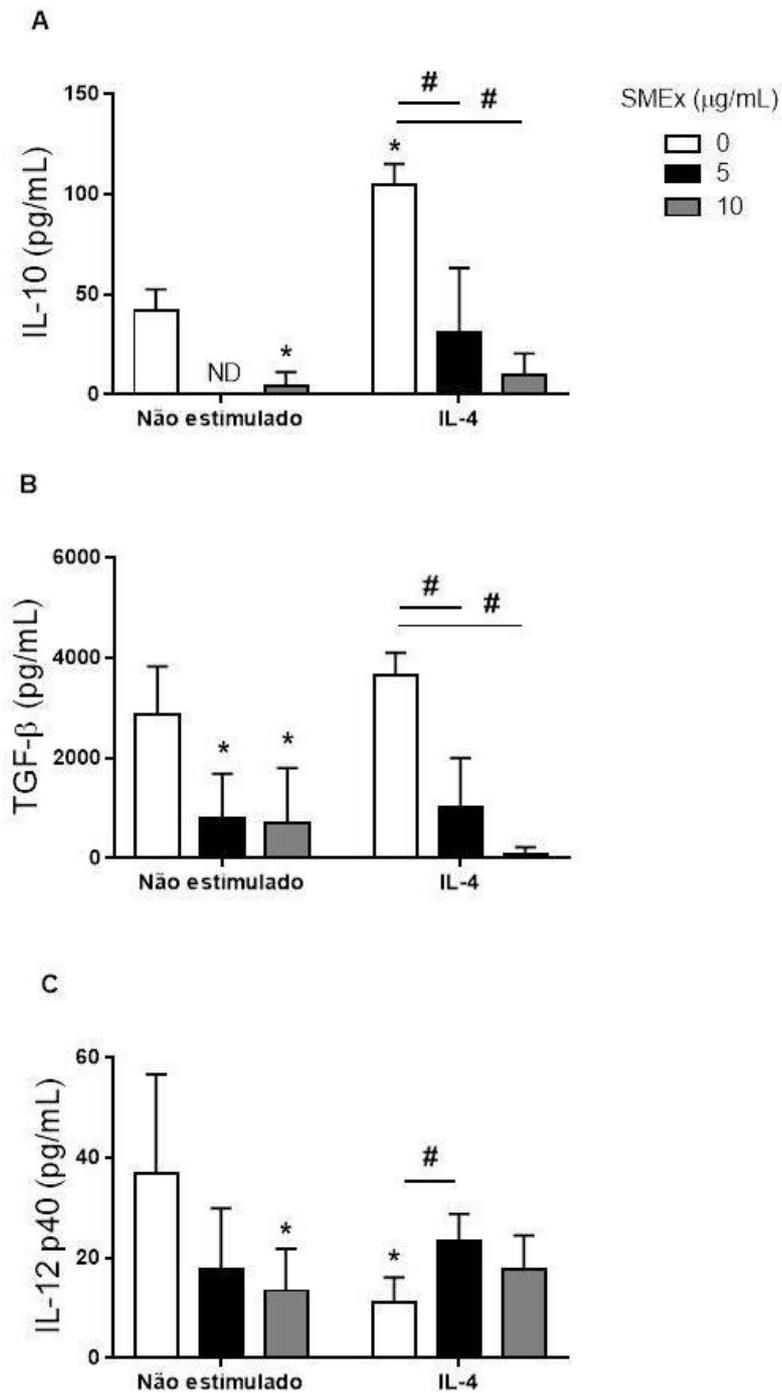
Células J774A.1 foram tratadas com SMEx em 0, 12,5, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 6 horas. Em seguida, determinou-se a média de intensidade de fluorescência (MFI) do TMRE. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 replicatas experimentais. Gráfico representativo de 1 experimento independente. \* $p < 0,05$  comparado com células não tratadas. Os histogramas representam a MFI do TMRE em células J774A.1 expostas ao SMEx nas doses de 0, 12,5 e 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e o controle de células não marcadas.

#### 5.4 O SMEx interfere na secreção de mediadores produzidos por macrófagos estimulados com IL-4 (perfil M2)

Uma vez que o SMEx diminuiu a atividade mitocondrial em células J774A.1 e o metabolismo oxidativo é fundamental para ativação de macrófagos anti-inflamatórios (fenótipo M2), nós avaliamos os efeitos do pré-tratamento com SMEx sobre a secreção de mediadores produzidos por macrófagos estimulados com IL-4 (perfil M2) ou por células não estimuladas. Para isso, células J774A.1 foram tratadas com SMEx nas concentrações não tóxicas (0, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) por 6 horas e em seguida estimuladas ou não com IL-4 por 24 horas. Após o tempo de estímulo os sobrenadantes foram recolhidos para dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12, e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ .

Como esperado, macrófagos estimulados com IL-4 secretaram níveis aumentados de IL-10 (Figura 10A). Já o tratamento com SMEx nas células estimuladas ou não com IL-4 reduziu significativamente a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, nas duas concentrações avaliadas (Figura 10A). Embora o estímulo com IL-4 não tenha induzido a produção de TGF- $\beta$ , o SMEx nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  reduziu a secreção desse mediador em macrófagos na presença ou ausência de IL-4 (Figura 10B). Além disso, em macrófagos de perfil M2 houve baixa produção de IL-12 em comparação as células não estimuladas (Figura 10C). Contudo, o pré-tratamento com SMEx na dose de 5  $\mu\text{g/mL}$  foi capaz de prevenir parcialmente a diminuição na secreção de IL-12 em macrófagos anti-inflamatórios (Figura 10C). Conforme previsto, o estímulo com IL-4 não afetou os níveis secretados de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  por macrófagos (dados não mostrados).

Com base nos dados obtidos, a despolarização mitocondrial (Figura 9) e a menor produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ , bem como o aumento parcial da IL-12 em macrófagos estimulados com IL-4 sugerem que o SMEx possa modular a ativação de macrófagos M2.



**Figura 10: Efeitos do pré-tratamento com SMEx sobre a produção de citocinas em macrófagos estimulados ou não com IL-4.**

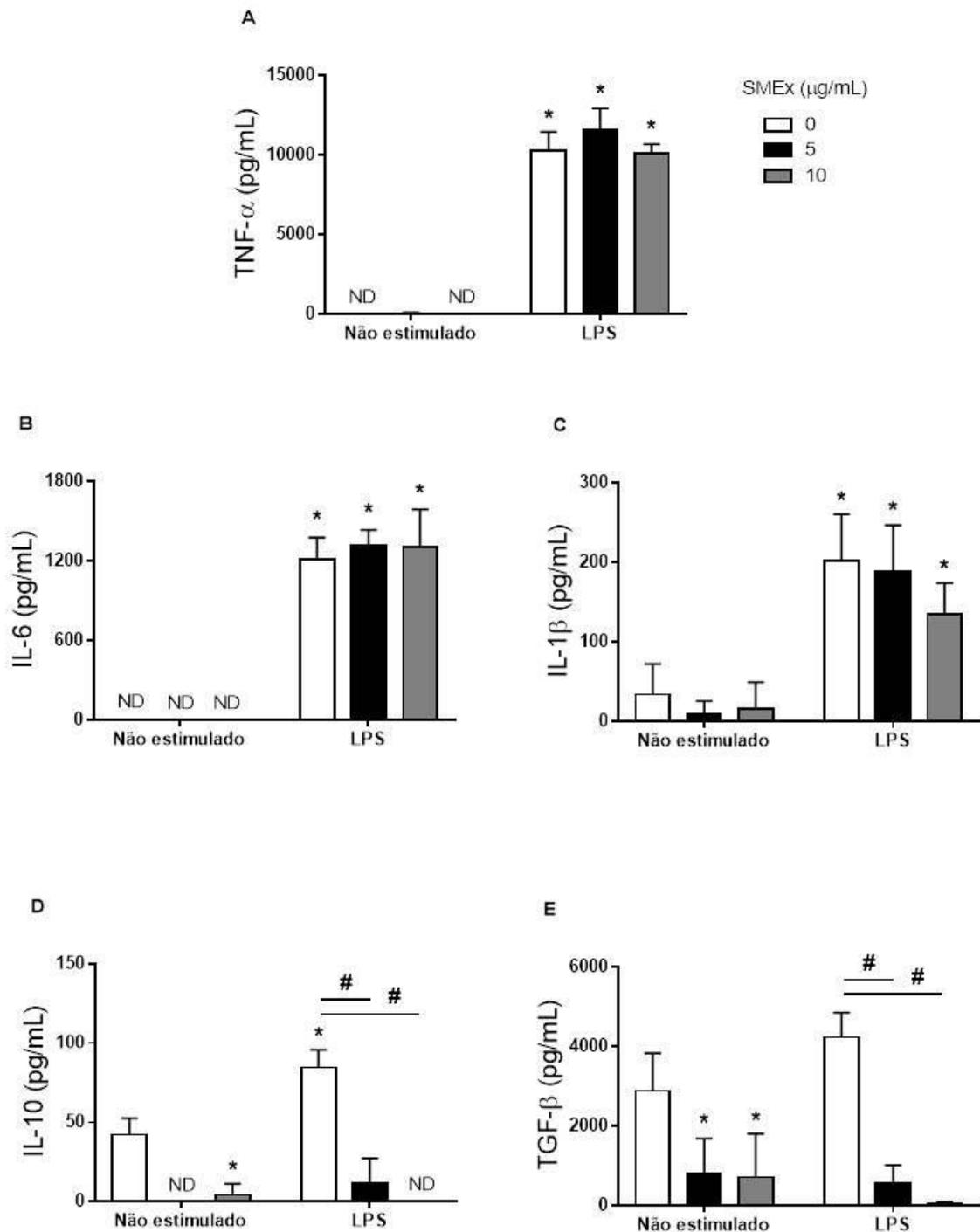
Células J774A.1 foram tratadas com SMEx em 0, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  por 6 horas e em seguida, estimuladas ou não com IL-4 por 24 horas. No sobrenadante, determinou-se a produção de (A) IL-10, (B) TGF- $\beta$  e (C) IL-12. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 a 4 replicatas experimentais. Gráfico representativo de 1 experimento. \* $p < 0,05$  comparado com células não tratadas. #  $p < 0,05$  comparado a dose 0  $\mu\text{g/mL}$  do mesmo grupo (estimulado ou não com IL-4).

## 5.5 O SMEx reduz a produção de citocinas anti-inflamatórias em macrófagos M1

Em seguida, investigamos se o pré-tratamento com SMEx também interfere na ativação de macrófagos pró-inflamatórios (fenótipo M1), que não dependem da mitocôndria para síntese de ATP. Para isso, as células J774A.1 foram tratadas com SMEx por 6 horas e logo depois, estimuladas ou não com LPS por 24 horas. Diante disso, no sobrenadante realizou-se a dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-10 e TGF- $\beta$ .

De acordo com o descrito na literatura, o estímulo com LPS em macrófagos induziu a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (LAWRENCE; NATOLI, 2011). No entanto, o tratamento com SMEx não alterou os níveis dessas citocinas (Figuras 11A, B e C). Enquanto em relação aos mediadores anti-inflamatórios, macrófagos estimulados com LPS produziram níveis aumentados de IL-10, mas não de TGF- $\beta$  (Figura 11D-E). O tratamento com SMEx em 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  reduziu significativamente a secreção de IL-10 induzida por LPS, bem como em células não estimuladas (Figura 11D). Além disso, o SMEx nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  também reduziu a secreção de TGF- $\beta$  em células não estimuladas e macrófagos M1, mesmo que o estímulo com LPS não tenha aumentado a produção desse fator (Figura 11E). Já a produção da citocina IL-12 não foi induzida nos macrófagos estimulados com LPS (dados não representados).

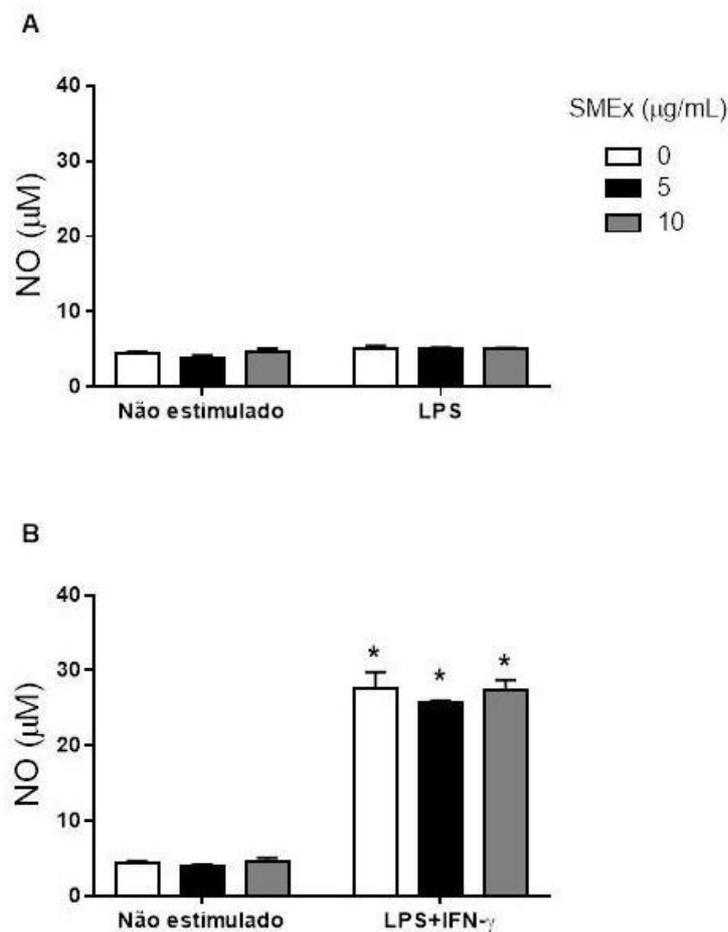
Os resultados demonstram que o tratamento com SMEx em macrófagos estimulados com LPS mantém os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . No entanto, o SMEx é capaz de reduzir significativamente a produção dos mediadores anti-inflamatórios IL-10 e TGF- $\beta$  em macrófagos na presença ou ausência de LPS.



**Figura 11: Efeitos do pré-tratamento com SMEx sobre a produção de citocinas em macrófagos estimulados ou não com LPS.**

Células J774A.1 foram tratadas com SMEx em 0, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  por 6 horas e em seguida, estimuladas ou não com LPS por 24 horas. No sobrenadante, determinou-se a produção de (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-6, (C) IL-1 $\beta$ , (D) IL-10 e (E) TGF- $\beta$ . Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 a 4 replicatas experimentais. Gráfico representativo de 1 experimento. \* $p < 0,05$  comparado com células não tratadas. #  $p < 0,05$  comparado a dose de 0  $\mu\text{g/mL}$  do mesmo grupo (estimulado ou não com LPS).

Como em macrófagos J774A.1 estimulados somente com LPS não houve indução da secreção de NO (Figura 12A), para avaliar a influência do pré-tratamento com SMEx sobre a atividade da enzima iNOS e produção de NO, nós estimulamos os macrófagos pré-tratados com SMEx com LPS + IFN- $\gamma$  por 24 horas. Como observado na Figura 12B, o SMEx não interferiu na secreção de NO, dados consistentes com o fato do SMEx não alterar a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Figura 11A, B e C).



**Figura 12: Efeitos do pré-tratamento com SMEx na produção de NO em macrófagos estimulados ou não com LPS ou LPS+IFN- $\gamma$ .**

Células J774A.1 foram tratadas com SMEx em 0, 5 e 10 µg/mL por 6 horas e em seguida, estimuladas ou não com (A) LPS ou (B) LPS+IFN- $\gamma$  por 24 horas. No sobrenadante, determinou-se a produção de NO. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média de 4 replicatas experimentais. Gráfico representativo de 1 experimento. \*p < 0,05 comparado com células não tratadas.

## 6 DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma coleção de doenças heterogêneas com capacidade de proliferação excessiva e evasão à morte celular, com o suporte de alterações oncogênicas e a reprogramação do metabolismo (PAVLOVA; THOMPSON, 2016; KULKOYLUOGLU-COTUL; ARCA; MADAK-ERDOGAN, 2019). No presente trabalho, investigamos os possíveis efeitos do SMEx na viabilidade e proliferação em modelo de carcinoma mamário murino. Nossos resultados demonstram que o SMEx nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL foi capaz de atuar diretamente sobre células tumorais 4T1 com a diminuição do metabolismo do MTT e da proliferação, bem como da viabilidade celular, dados convergentes com outras espécies do gênero *Smilax*. De acordo com Gao e colaboradores (2011), o extrato de raízes de *Smilax glabra*, diminuiu o metabolismo do MTT em linhagens celulares humanas de câncer de mama (MCF7), carcinoma de colon (HT-29) e câncer de estômago (BGC-823) de maneira dose dependente (GAO et al., 2011). Enquanto, substâncias isoladas de raízes de *Smilax riparia* demonstraram citotoxicidade para uma grande variedade de linhagens tumorais, entre elas de câncer de mama humano (WANG et al., 2013). Já o extrato de rizomas de *Smilax china* em células de câncer de ovário (A2780) induziu a supressão da proliferação, de forma dose dependente (HU et al., 2015). Dessa forma, o estudo de possíveis alterações no ciclo celular e as vias de morte induzidas podem contribuir para compreender os efeitos tóxicos do SMEx em células tumorais.

Além da proliferação excessiva e supressão da morte celular, o câncer consiste em complexos microambientes com populações celulares heterogêneas (MAMAN; WITZ, 2018; PAVLOVA; THOMPSON, 2016). No infiltrado imune presente no microambiente tumoral os macrófagos são as células mais abundantes e influenciam diretamente a resposta imune e o desenvolvimento do tumor (OBEID et al., 2013; WILLIAMS; YEH; SOLOFF, 2016). Assim, nós também avaliamos a influência do tratamento com SMEx na proliferação e viabilidade de macrófagos murinos. Os dados obtidos demonstram que o SMEx reduziu o metabolismo do MTT, entretanto, somente em 50 µg/mL alterou a viabilidade e proliferação de macrófagos.

Uma vez que as células tumorais foram mais susceptíveis aos efeitos tóxicos do SMEx do que os macrófagos, investigamos se o tratamento com SMEx induz a

morte celular por vias que cursam com a ruptura da membrana plasmática. O SMEx nas concentrações de 25 e 50 µg/mL induziu vias de morte com ruptura da membrana em células de carcinoma mamário, de forma dose dependente. Enquanto em macrófagos apenas na concentração de 50 µg/mL o tratamento com SMEx apresentou efeito citotóxico.

Nas possíveis vias de morte celular induzidas pelo SMEx é observado danos na membrana plasmática e provável liberação de DAMPs. O fenótipo encontrado nas células tumorais e macrófagos expostos ao SMEx sugere a ocorrência de necroptose e/ou piroptose, tipos de morte celular regulada (GALLUZZI et al., 2018). A necroptose é regulada pelas proteínas RIPK1-RIPK3 e MLKL e representa uma via de morte induzida em resposta ao estresse celular e ausência da apoptose com liberação do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular (CHEN; YU; ZHANG, 2016; FENG et al., 2015). Já a piroptose é uma via de morte dependente de caspase-1 e ativação de inflamassomo, que induz intensa resposta inflamatória (DIPESO et al., 2017; TAABAZUING; OKONDO; BACHOVCHIN, 2017). Essas duas vias de morte podem contribuir para a eliminação de células tumorais e sinalização para o sistema imune. Por outro lado, a necroptose e piroptose extensas promovem a progressão tumoral devido à intensa resposta inflamatória (CHU et al., 2016; NAJAFOV; CHEN; YUAN, 2017). Assim, o tratamento com SMEx em células tumorais pode ser caracterizado como um mecanismo citotóxico imunogênico e com potencial para auxiliar no controle tumoral.

De modo que o SMEx nas menores concentrações alterou a redução do MTT por enzimas mitocondriais em macrófagos murinos sem interferir na sua viabilidade e proliferação, nós tomamos por hipótese que o SMEx altere a atividade mitocondrial e, portanto, induza a reprogramação metabólica dos macrófagos. As células imunes em resposta a sinais do ambiente e de outras células realizam alterações em suas vias metabólicas para suportar a proliferação, sobrevivência e os diferentes fenótipos funcionais (KELLY; O'NEILL, 2015). Em células quiescentes a glicólise e o ciclo do TCA estão integrados para alimentar a fosforilação oxidativa, na qual há geração de ATP nas mitocôndrias. Enquanto na ativação e proliferação de células imunes ocorre a fermentação aeróbica, o que permite no citoplasma a síntese de ATP dependente de glicose, produção de macromoléculas e manutenção do equilíbrio redox (JHA et al., 2015; PEARCE; PEARCE, 2013). Como esperado, em nossos dados preliminares o SMEx nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL reduziu

significativamente o  $\Delta\psi_m$  em relação as células não tratadas. A despolarização mitocondrial e a diminuição do metabolismo do MTT sem a perda da viabilidade celular indicam menor atividade mitocondrial e podem sugerir uma reprogramação metabólica nos macrófagos tratados com SMEx. Para confirmar a possível reprogramação do metabolismo em macrófagos expostos ao SMEx, devemos investigar a via glicolítica, por exemplo, pela determinação do consumo de glicose e produção de lactato, e aumento da expressão de enzimas que participam dessa via.

Os macrófagos no microambiente tumoral são frequentemente caracterizados com o fenótipo M2, células dependentes do metabolismo oxidativo (HANAHAN; COUSSENS, 2012; ODEGAARD; CHAWLA, 2011). Os TAMs com a produção de citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, a IL-10), e de fatores angiogênicos como TGF- $\beta$  e VEGF contribuem para a imunossupressão e progressão tumoral (NOY; POLLARD, 2014; WEAGEL et al., 2015). Como o SMEx foi capaz de diminuir a atividade mitocondrial em macrófagos, nós investigamos os efeitos do SMEx na ativação de macrófagos estimulados com IL-4 (fenótipo M2 semelhante ao encontrado em tumores). Nossos resultados preliminares sugerem que em macrófagos anti-inflamatórios o tratamento com SMEx, nas concentrações não citotóxicas, é capaz de reduzir as citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ . Além disso, o SMEx pode prevenir parcialmente a redução de IL-12 em macrófagos estimulados com IL-4.

No microambiente tumoral, macrófagos pró-inflamatórios (fenótipos M1) podem ser recrutados. Em macrófagos M1, que possuem metabolismo glicolítico e supressão da fosforilação oxidativa, a produção de mediadores pró-inflamatórios e mecanismos efetores (como a fagocitose de células alvo) são capazes de auxiliar na resposta antitumoral (NOY; POLLARD, 2014; WEAGEL et al., 2015). Dessa forma, avaliamos a influência do tratamento com SMEx em macrófagos estimulados com LPS (perfil M1). Os dados obtidos demonstram que o SMEx em macrófagos pró-inflamatórios manteve os níveis dos mediadores TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e NO, bem como reduziu a secreção de IL-10 induzida por LPS e da citocina TGF- $\beta$ , secretada de modo independente do estímulo.

Em conjunto, o SMEx pode ser capaz de modular a resposta de macrófagos M2, reduzindo os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  e recuperando parcialmente os níveis de IL-12. Enquanto em macrófagos M1, o SMEx não afetou a secreção dos mediadores pró-inflamatórios e reduziu a de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, o SMEx em macrófagos não estimulados reduziu a

secreção de IL-10 e TGF- $\beta$ . Considerando a capacidade do SMEx de reduzir a citocina imunossupressora IL-10 e o fator de crescimento TGF- $\beta$ , em um ensaio de cocultura (macrófagos e células tumorais) esses efeitos podem auxiliar no controle da proliferação tumoral e estimular as respostas antitumorais dos macrófagos.

As citocinas são proteínas capazes de modular o crescimento e sobrevivência de células tumorais, como também as células imunes e suas respostas antitumorais (BERRAONDO et al., 2019; LIPPITZ, 2013). O TGF- $\beta$  na fase inicial do câncer inibe o desenvolvimento e crescimento tumoral. Entretanto, em células tumorais a via de sinalização desse mediador pode ser inativada ou a capacidade de resposta ao TGF- $\beta$  exógeno promover o crescimento e progressão tumoral. Enquanto em células estromais o TGF- $\beta$  também estimula a angiogênese e a evasão da resposta imune (COLAK; TEN DIJKE, 2017; XIE et al., 2018). Outra citocina imunossupressora produzida por TAMs e células no microambiente tumoral é a IL-10, com efeitos pleiotrópicos e suporte para o desenvolvimento do tumor. A IL-10 inibe a apresentação antigênica, produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 e IL-12, e conseqüentemente suprime o direcionamento para a resposta de perfil Th1 (SAXENA et al., 2015; VAHL et al., 2017). Enquanto a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  e IL-12 descritas em macrófagos M1 são potentes imunoestimuladoras e podem contribuir para que os macrófagos e outras células efetoras imunes destruam o tumor (TANIGUCHI; KARIN, 2018; WEAGEL et al., 2015).

Por fim, os efeitos tóxicos do SMEx em células tumorais somados a sua capacidade de modular a resposta de macrófagos representam potencial alternativa para novos estudos direcionados a imunoterapia do câncer de mama.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que o SMEx possui efeitos tóxicos em células de carcinoma mamário murino nas menores concentrações comparados a macrófagos. Esses efeitos citotóxicos do SMEx envolvem a indução de vias de morte que cursam com a ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular. Além disso, o SMEx em macrófagos nas menores doses não alterou a viabilidade e proliferação. No entanto, o SMEx reduziu a atividade mitocondrial e foi capaz de modular a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos. Dessa forma, pode-se sugerir que o SMEx em macrófagos induza a reprogramação imunometabólica dos mesmos. Em conjunto, o potencial tóxico do SMEx em células de carcinoma mamário associado a capacidade de modular as respostas de macrófagos apresentam uma alternativa promissora para a realização de novos estudos com alvo na imunoterapia do câncer de mama. Mais experimentos serão necessários para melhor compreender os efeitos tóxicos do SMEx em células tumorais e as ações no metabolismo e respostas efetoras de macrófagos.

## REFERÊNCIAS

- ABDALA, S. et al. Diuretic activity of some *Smilax canariensis* fractions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 277–281, 2012.
- ABDEL-WAHAB, N.; ALSHAWA, A.; SUAREZ-ALMAZOR, M. E. Adverse Events in Cancer Immunotherapy. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l.: s.n.]. v. 995p. 155–174.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html>>. Acesso em: 29 out. 2018.
- AMIT, I. et al. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. **Nature Genetics**, v. 39, n. 4, p. 503–512, 25 abr. 2007.
- ANDREATA, R. H. P. Revisão das espécies brasileiras do genero *Smilax Linnaeus* (Smilacaceae). **Pesquisas em Botanica**, v. 47, p. 1–243, 1997.
- ANDREATA, R. H. P. A New Species of *Smilax* and a Key to All Species from Minas Gerais, Brazil. **Systematic Botany**, v. 34, n. 1, p. 28–31, 2009.
- ANDREWS, M. C.; WARGO, J. A. Cancer Evolution during Immunotherapy. **Cell**, v. 171, n. 4, p. 740–742, 2 nov. 2017.
- AO, C. et al. Antioxidant phenolic compounds from *Smilax sebeana* Miq. **Food Science and Technology**, v. 44, n. 7, p. 1681–1686, 2011.
- BELORIBI-DJEFAFLIA, S.; VASSEUR, S.; GUILLAUMOND, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. **Oncogenesis**, v. 5, n. 1, p. e189, 25 jan. 2016.
- BERRAONDO, P. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 120, n. 1, p. 6–15, 9 jan. 2019.
- BISWAS, S. K. Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. **Immunity**, v. 43, n. 3, p. 435–449, 2015.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, 20 out. 2010.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Minireview Orchestration of Metabolism by Macrophages Minireview. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 4, p. 432–437, 2011.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 1 nov. 2018.
- CÁCERES, A. et al. Ethnobotanical, pharmacognostical, pharmacological and phytochemical studies on *Smilax domingensis* in Guatemala. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 239–248, 2012.
- CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, 1 fev. 2011.

- CASSETTA, L.; POLLARD, J. W. Repolarizing macrophages improves breast cancer therapy. **Cell Research**, v. 27, n. 8, p. 963–964, 21 ago. 2017.
- CHEN, D.; YU, J.; ZHANG, L. Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1865, n. 2, p. 228–236, abr. 2016.
- CHEN, L. et al. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 399–405, 2011.
- CHIU, W.-T. et al. Bcl-2 regulates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry to modulate ER stress-induced apoptosis. **Cell Death Discovery**, v. 4, n. 1, p. 37, 26 dez. 2018.
- CHU, K. T.; NG, T. B. Smilaxin, a novel protein with immunostimulatory, antiproliferative, and HIV-1-reverse transcriptase inhibitory activities from fresh *Smilax glabra* rhizomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, n. 1, p. 118–124, fev. 2006.
- CHU, Q. et al. Pyroptosis is involved in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 51, p. 84658–84665, 20 dez. 2016.
- COLAK, S.; TEN DIJKE, P. Targeting TGF- $\beta$  Signaling in Cancer. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 1, p. 56–71, jan. 2017.
- COLEGIO, O. R. et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 559–563, 13 set. 2014.
- CORTHAY, A. Does the immune system naturally protect against cancer? **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 197, 2014.
- COUSSENS, L. M.; ZITVOGEL, L.; PALUCKA, A. K. Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? **Science**, v. 339, n. 6117, p. 286–291, 18 jan. 2013.
- COX, S. D.; JAYASINGHE, K. C.; MARKHAM, J. L. Antioxidant activity in Australian native sarsaparilla (*Smilax glycyphylla*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1–3, p. 162–168, 2005.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press, 1981.
- CROWLEY, L. C. et al. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2016, n. 7, p. pdb.prot087163, 1 jul. 2016.
- CURREN SMITH, E. W. Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 06, n. 04, p. 1–8, 7 jul. 2015.
- DA SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Three new steroidal saponins from *Smilax officinalis*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 95–100, 2008.
- DE OLIVEIRA DIAS-NETO, A. et al. Anatomia De Cinco Espécies Brasileiras De *Smilax* L. (Smilacaceae). **Pesquisas Botânica**, v. 64, p. 101–114, 2013.

- DE PALMA, M.; LEWIS, C. E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. **Cancer cell**, v. 23, n. 3, p. 277–86, 18 mar. 2013.
- DEBERARDINIS, R. J.; CHENG, T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 3, p. 313–324, 2 jan. 2010.
- DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M.-L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. **Journal of Immunological Methods**, v. 115, n. 1, p. 61–69, 25 nov. 1988.
- DENARDO, D. G. et al. Leukocyte Complexity Predicts Breast Cancer Survival and Functionally Regulates Response to Chemotherapy. **Cancer Discovery**, v. 1, n. 1, p. 54–67, jun. 2011.
- DICKENS, L. S. et al. The 'complexities' of life and death: Death receptor signalling platforms. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 11, p. 1269–1277, 1 jul. 2012.
- DIPESO, L. et al. Cell death and cell lysis are separable events during pyroptosis. **Cell Death Discovery**, v. 3, p. 17070, 13 nov. 2017.
- DOHERTY, J. R.; CLEVELAND, J. L. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 9, p. 3685–3692, 3 set. 2013.
- FENG, X. et al. Receptor-interacting protein kinase 3 is a predictor of survival and plays a tumor suppressive role in colorectal cancer. **Neoplasia**, v. 62, n. 04, p. 592–601, 2015.
- FERNALD, K.; KUROKAWA, M. Evading apoptosis in cancer. **Trends in cell biology**, v. 23, n. 12, p. 620–33, dez. 2013.
- FERRUFINO-ACOSTA, L. Taxonomic revision of the genus *Smilax* (*Smilacaceae*) in Central America and the Caribbean Islands. **Willdenowia**, v. 40, n. 2, p. 227–280, dez. 2010.
- FINN, O. J. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. **Annals of Oncology**, v. 23, n. suppl 8, p. viii6–viii9, 1 set. 2012.
- FOX, J. L.; MACFARLANE, M. Targeting cell death signalling in cancer: minimising 'Collateral damage'. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 1, p. 5–11, 3 jun. 2016.
- FREEMAN, M. Feedback control of intercellular signalling in development. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 313–319, 16 nov. 2000.
- FREEMERMAN, A. J. et al. Metabolic Reprogramming of Macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7884–7896, 14 mar. 2014.
- FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 6, p. 329–44, jun. 2015.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the

Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 23 mar. 2018.

GANESHAN, K.; CHAWLA, A. Metabolic regulation of immune responses. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 609–34, 2014.

GAO, Y. et al. Mitochondrial apoptosis contributes to the anti-cancer effect of *Smilax glabra* Roxb. **Toxicology Letters**, v. 207, n. 2, p. 112–120, 30 nov. 2011.

GAUCHER, S.; JARRAYA, M. Technical note: comparison of the PrestoBlue and LDH release assays with the MTT assay for skin viability assessment. **Cell and Tissue Banking**, v. 16, n. 3, p. 325–329, 22 set. 2015.

GUIDUCCI, C. et al. Redirecting In vivo Elicited Tumor Infiltrating Macrophages and Dendritic Cells towards Tumor Rejection. **Cancer Research**, v. 65, n. 8, p. 3437–3446, 15 abr. 2005.

HAMMOND, M. E. H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 134, n. 7, p. e48-72, jul. 2010.

HANAHAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HIROTA, B. C. K. et al. Phytochemical and antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant studies of *Smilax larvata* (Smilacaceae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

HU, L. et al. *Smilax china* L. rhizome extract inhibits nuclear factor- $\kappa$ B and induces apoptosis in ovarian cancer cells. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 21, n. 12, p. 907–915, 16 dez. 2015.

HUANG, S. C.-C. et al. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. **Nature immunology**, v. 15, n. 9, p. 846–55, set. 2014.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Incidência de Câncer no Brasil**. 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **GLOBOCAN 2018: Latest global cancer data**. Geneva, Switzerland, 2018. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>.

JHA, A. K. et al. Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 419–430, 17 mar. 2015.

JIANG, J.; XU, Q. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of

*Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 1, p. 53–59, 2003.

JOSEPHS, D. H.; BAX, H. J.; KARAGIANNIS, S. N. Tumour-associated macrophage polarisation and re-education with immunotherapy Development , Growth and Metastasis Activity to Target Tumour Cells. Targeting TAMs as an Immunotherapeutic Strategy for Cancer Antibodies Macrophages *In vitro* and *In vivo*. **Frontiers in Bioscience**, p. 334–351, 2015.

JUSTUS, C.; SANDERLIN, E.; YANG, L. Molecular Connections between Cancer Cell Metabolism and the Tumor Microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 11055–11086, 15 maio 2015.

KACZMAREK, A.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, D. V. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 209–23, 21 fev. 2013.

KELLY, B.; O'NEILL, L. A. J. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. **Cell research**, v. 25, n. 7, p. 771–84, jul. 2015.

KOO, G.-B. et al. Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. **Cell Research**, v. 25, n. 6, p. 707–725, 8 jun. 2015.

KRISHNA, B. M. et al. Her2 Ile655Val polymorphism and its association with breast cancer risk: an updated meta-analysis of case-control studies. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7427, 9 dez. 2018.

KULKOYLUOGLU-COTUL, E.; ARCA, A.; MADAK-ERDOGAN, Z. Crosstalk between Estrogen Signaling and Breast Cancer Metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 25–38, jan. 2019.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections. **Cell Host & Microbe**, v. 8, n. 1, p. 44–54, 22 jul. 2010.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 750–761, nov. 2011.

LESTERHUIS, W. J.; HAANEN, J. B. A. G.; PUNT, C. J. A. Cancer immunotherapy – revisited. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 8, p. 591–600, 1 ago. 2011.

LEVINE, A. J.; PUZIO-KUTER, A. M. The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1340–1344, 3 dez. 2010.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, mar. 2016.

LIPPITZ, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 6, p. e218–e228, maio 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**, 2002.

- LUGO-VILLARINO, G. et al. Macrophage polarization: convergence point targeted by mycobacterium tuberculosis and HIV. **Frontiers in immunology**, v. 2, p. 43, 2011.
- MAMAN, S.; WITZ, I. P. A history of exploring cancer in context. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 6, p. 359–376, 26 jun. 2018.
- MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–86, 1 dez. 2004.
- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. **The Journal of experimental medicine**, v. 212, n. 4, p. 435–45, 6 abr. 2015.
- MARTINEZ, F. O. et al. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. **Blood**, v. 121, n. 9, p. e57-69, 28 fev. 2013.
- MEDEIROS, M.F.T., SENNA-VALLE, L.DE., ANDREATA, R. H. P. Histórico e o uso da “ salsa parrilha ” (*Smilax* spp.) pelos boticários no Mosteiro de São Bento. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 27–29, 2007.
- MEHTA, M. M.; WEINBERG, S. E.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial control of immunity: beyond ATP. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 10, p. 608–620, 3 jul. 2017.
- MESSMER, M. N.; SNYDER, A. G.; OBERST, A. Comparing the effects of different cell death programs in tumor progression and immunotherapy. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, n. 1, p. 115–129, 19 jan. 2019.
- MICHELUCCI, A. et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 19, p. 7820–7825, 7 maio 2013.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 1 dez. 2008.
- MURRAY, P. J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 17 jul. 2014.
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011.
- NAGY, C.; HASCHEMI, A. Time and Demand are Two Critical Dimensions of Immunometabolism: The Process of Macrophage Activation and the Pentose Phosphate Pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 164, 8 abr. 2015.
- NAJAFOV, A.; CHEN, H.; YUAN, J. Necroptosis and Cancer. **Trends in cancer**, v. 3, n. 4, p. 294–301, 2017.

- NOMURA, M. et al. Fatty acid oxidation in macrophage polarization. **Nature immunology**, v. 17, n. 3, p. 216–7, mar. 2016.
- NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 49–61, 17 jul. 2014.
- O'NEILL, L. A. J. A Broken Krebs Cycle in Macrophages. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 393–394, 17 mar. 2015.
- O'NEILL, L. A. J.; HARDIE, D. G. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 346–355, 16 jan. 2013.
- O'NEILL, L. A. J.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature reviews. Immunology**, v. 16, n. 9, p. 553–65, 2016.
- OBEID, E. et al. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 1, p. 5–12, jul. 2013.
- ODEGAARD, J. I. et al. Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116–1120, 28 jun. 2007.
- ODEGAARD, J. I.; CHAWLA, A. Alternative Macrophage Activation and Metabolism. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 275–297, 28 fev. 2011.
- PATEL, S. A.; MINN, A. J. Combination Cancer Therapy with Immune Checkpoint Blockade: Mechanisms and Strategies. **Immunity**, v. 48, n. 3, p. 417–433, 20 mar. 2018.
- PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27–47, 12 jan. 2016.
- PEARCE, E. L.; PEARCE, E. J. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 633–43, 18 abr. 2013.
- PENTIMALLI, F. et al. Cell death pathologies: targeting death pathways and the immune system for cancer therapy. **Genes & Immunity**, 19 dez. 2018.
- PÉREZ-ESCUREDO, J. et al. Lactate promotes glutamine uptake and metabolism in oxidative cancer cells. **Cell Cycle**, v. 15, n. 1, p. 72–83, 2 jan. 2016.
- PYONTECK, S. M. et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1264–1272, 22 out. 2013.
- RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assays**. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.
- RODRIGUEZ-PRADOS, J.-C. et al. Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 1, p. 605–614, 1 jul. 2010.
- SANIN, D. E. et al. Mitochondrial Membrane Potential Regulates Nuclear Gene Expression in Macrophages Exposed to Prostaglandin E<sub>2</sub>. **Immunity**, v. 49, n. 6, p.

1021–1033.e6, dez. 2018.

SAXENA, A. et al. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 27–34, jul. 2015.

SEMENZA, G. L. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 3, p. 382–391, 1 mar. 2016.

SHE, T. et al. Sarsaparilla (*Smilax Glabra* Rhizome) Extract Inhibits Migration and Invasion of Cancer Cells by Suppressing TGF- $\beta$ 1 Pathway. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0118287, 5 mar. 2015.

SHE, T. et al. Sarsaparilla (*Smilax Glabra* Rhizome) Extract Activates Redox-Dependent ATM/ATR Pathway to Inhibit Cancer Cell Growth by S Phase Arrest, Apoptosis, and Autophagy. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 8, p. 1281–1289, 2017.

SHU, X.-S.; GAO, Z.-H.; YANG, X.-L. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Smilax china* L. aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 327–332, 20 fev. 2006.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 3, p. 787–95, 1 mar. 2012.

SIMS, A. H. et al. Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 4, n. 9, p. 516–525, set. 2007.

SOARES, M. K. M. et al. The sarsaparilla market in the state of São Paulo (Brazil) and the challenges of cultivation. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 1, p. 73–79, 2014.

STEVENS, P. F. **ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE, version 14. [and more or less continuously updated since]**, 2017. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>>.

STRACHAN, D. C. et al. CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing infiltration by CD8<sup>+</sup> T cells. **Oncolmmunology**, v. 2, n. 12, p. e26968, 27 dez. 2013.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In: **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2015. v. 111p. A3.B.1-A3.B.3.

TAABAZUING, C. Y.; OKONDO, M. C.; BACHOVCHIN, D. A. Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 4, p. 507–514.e4, 20 abr. 2017.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 309–324, 22 jan. 2018.

TANNAHILL, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238–242, 24 abr. 2013.

TARIQ, M. et al. Macrophage Polarization: Anti-Cancer Strategies to Target Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 9, p. 2484–2501, 1 set. 2017.

**The Plant List A working list of all plant species**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

THOMPSON, C. B. Rethinking the regulation of cellular metabolism. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 76, p. 23–9, 1 jan. 2011.

TOPALIAN, S. L.; DRAKE, C. G.; PARDOLL, D. M. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. **Cancer Cell**, v. 27, n. 4, p. 450–461, 13 abr. 2015.

VAHL, J. M. et al. Interleukin-10-regulated tumour tolerance in non-small cell lung cancer. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 11, p. 1644–1655, 21 nov. 2017.

VAN DEN BOSSCHE, J. et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. **Cell Reports**, v. 17, n. 3, p. 684–696, 11 out. 2016.

VAN DEN BOSSCHE, J. et al. Alternatively activated macrophages engage in homotypic and heterotypic interactions through IL-4 and polyamine-induced E-cadherin/catenin complexes. **Blood**, v. 114, n. 21, p. 4664–74, 19 nov. 2009.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 9, p. 659–672, set. 2007.

VATS, D. et al. Oxidative metabolism and PGC-1 $\beta$  attenuate macrophage-mediated inflammation. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 13–24, jul. 2006.

VESELY, M. D. et al. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 235–271, 23 abr. 2011.

VILLALBA, M. et al. The International Journal of Biochemistry From tumor cell metabolism to tumor immune escape &. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 1, p. 106–113, 2013.

WANG, W. et al. Tumoral cytotoxic and antioxidative phenylpropanoid glycosides in *Smilax riparia* A. DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 527–532, 2013.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351–360, ago. 2002.

WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. **Cancer cell**, v. 21, n. 3, p. 297–308, 20 mar. 2012.

WEAGEL, E. et al. Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 06, n. 04, p. 1–8, 7 jul. 2015.

WEINBERG, S. E.; SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 406–17, 17 mar. 2015.

WILLIAMS, C. B.; YEHL, E. S.; SOLOFF, A. C. Tumor-associated macrophages:

unwitting accomplices in breast cancer malignancy. **NPJ breast cancer**, v. 2, p. 15025, 2016.

WITSCH, E.; SELA, M.; YARDEN, Y. Roles for growth factors in cancer progression. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 25, n. 2, p. 85–101, abr. 2010.

WU, L. et al. Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax china* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 460–464, 2010.

XIA, D. et al. Protective effect of *Smilax glabra* extract against lead-induced oxidative stress in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 414–420, 2010.

XIE, F. et al. TGF- $\beta$  signaling in cancer metastasis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 50, n. 1, p. 121–132, 1 jan. 2018.

ZARDAVAS, D. et al. Clinical management of breast cancer heterogeneity. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 7, p. 381–394, 21 jul. 2015.