



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

CARLOS WAGNER DE SOUZA WANDERLEY

**PACLITAXEL REDUZ O CRESCIMENTO TUMORAL ATRAVÉS DA
REPROGRAMAÇÃO DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR PARA O
PERFIL M1 via TLR4**

FORTALEZA

2018

CARLOS WAGNER DE SOUZA WANDERLEY

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título do doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr Roberto Cesar Pereira Lima Junior

Co-orientador: Prof. Fernando de Queiroz Cunha

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

W215p Wanderley, Carlos Wagner de Souza.
PACLITAXEL REDUZ O CRESCIMENTO TUMORAL ATRAVÉS DA REPROGRAMAÇÃO
DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR PARA O PERFIL M1 via TLR4 / Carlos
Wagner de Souza Wanderley. – 2018.
84 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Junior.

Coorientação: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha.

1. Polarização de macrófagos. 2. macrófagos associados ao tumor. 3. microambiente
tumoral. I. Título.

CDD 615.1

CARLOS WAGNER DE SOUZA WANDERLEY

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr Roberto Cesar Pereira Lima Junior

Co-orientador: Prof. Fernando de Queiroz Cunha

Aprovado em: 20/agosto/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima-Junior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha (Co-orientador)
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Romulado Barroso de Souza
Hospital Sírio-Libanês

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Marcelo Leite Vieira Costa
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Diego Veras Wilke
Universidade Federal do Ceará

DEDICATÓRIA

“Não morre aquele que deixou na terra
a melodia de seu cântico na música de seus versos”

Cora Coralina

*Dedico esse trabalho à aquele que deixou na terra
um grande legado científico e que através do seu amor pela docência
transformou a vida de muitos.*

Ao compositor de destinos Prof. Ronaldo Ribeiro (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Cunha, que na ausência física do prof. Ronaldo estendeu a mão e me recebeu em seu laboratório na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, permitindo uma experiência única que contribuiu muito para o meu amadurecimento científico, pessoal e para a realização desse estudo.

Ao Professor Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior, pela confiança e paciência, por ter me ensinado os caminhos da redação científica. Pela convivência que nesses anos de formação acadêmica (mestrado e doutorado) agregaram em mim bons valores e princípios.

Ao prof. Thiago Cunha pela disponibilidade para discutir e ajudar nos delineamentos experimentais desse estudo. Com o senhor aprendi a importância do rigor científico.

A Clarissa Sampaio por ter acolhido a mim e a Camila em Fortaleza como filhos, por todos os momentos de alegria que fizeram o tempo passar mais rápido. Além disso, sem a ajuda da fundação Sampaio & Ribeiro de apoio a ciência esse trabalho não seria concluído. Muitíssimo obrigado.

Ao amigo David Cólón pelo apoio, não só no desenvolvimento desse trabalho como em várias outras dificuldades encontradas. Obrigado pela confiança, ajuda nos experimentos e principalmente pela amizade.

Aos amigos Rangel Silva e João Paulo pela ajuda na realização desse trabalho, pela amizade e pelos maravilhosos momentos de descontração durante este período.

Ao amigo Caio Abner por me receber em Ribeirão Preto oferecendo-me diversas formas de ajuda. Obrigado pela amizade e confiança.

Aos colegas de laboratório: Cesar, Andreza Urba, Vanessa, Miriam, Braulio, Juliana, Joana, Talita, Taty, Ferreirinha, Dani, Paula Veacava, Paula Barbim, Alexandre, Fábio, Cassia, André, Lívia, Douglas, Eduardo, Bruno, Guilherme, Panda, Kaliu obrigado pelo acolhimento no LID.

Aos funcionários do laboratório Giu, Kátia, Ieda, Marquinhos, Serginho, Carol e Diva, pelo suporte técnico, amizade e boa convivência.

As amigas Anielle Torres e Livia Nobre pela amizade sincera, apoio e as alegrias compartilhadas durante esse tempo.

Aos demais amigos do LAFICA: Lucas Carvalho, Lucas Nicolau, Camila Fernandez, Diego Holanda Renata e Livia Talita pelos momentos agradáveis juntos.

Em especial à Camila, por todo amor, cuidado, companheirismo e imensurável apoio, por dar sentido a minha vida e tornar meus dias mais felizes. Sem você eu não faria nada.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPESP, pelo financiamento da pesquisa e pela bolsa de doutorado (CNPq).

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e por todas as contribuições dadas a este trabalho.

*“Amar e mudar as coisas,
amar e mudar as coisas
me interessa mais...”*

(Belchior, Alucinação 1976)

RESUMO

O paclitaxel (PCX) é um agente antineoplásico amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de tumores sólidos. O mecanismo primário de ação dessa droga é baseado na estabilização de microtúbulos, indução de parada mitótica e consequente apoptose de células que proliferam rapidamente. No presente estudo, investigou-se a capacidade do PCX de reprogramar a resposta imune antitumoral mediante modulação do fenótipo funcional de macrófagos associados ao tumor (TAMs), bem como avaliou-se a dependência dos receptores TLR4 na realização desse processo. Macrófagos da medula óssea de camundongos selvagens (do inglês *Wild type* [WT]) ou TLR4 *knockout*, em estado basal de ativação (*naive* - macrófago M0), ou previamente polarizados para o perfil M2 com IL-4 (10 ng/mL por 24h) foram estimulados com PCX (10, 30, 100 μ M), ou LPS (100 ng/mL). Após 48 horas, marcadores de polarização de macrófagos M1 e M2 foram avaliados por citometria e ELISA. Além disso, camundongos WT, TLR4 *knockout* ou com deleção condicional de TLR4 em macrófagos (LysM-Cre^{+/+}/TLR4^{fl/fl}) foram inoculados com linhagens celulares murinas de câncer de mama (4T1), ou melanoma (B16) e tratados com salina ou PCX. Em seguida, os tumores foram colhidos e os TAMs isolados em gradientes de percoll (seleção positiva) para caracterização fenotípica por qRT-PCR. Ainda, foi realizada análise de bioinformática do transcriptoma de biópsia de pacientes com câncer de ovário obtidas antes e após 3 ciclos de terapia com PCX (GSE15622) com foco na identificação de assinaturas imunológicas. Em condições *in vitro*, o estímulo com PCX polarizou macrófagos *naive* M0 para o sentido M1, bloqueou a polarização para o perfil M2 e reprogramou macrófagos M2 para o fenótipo M1, via ativação dos receptores TLR4, de maneira similar ao LPS. Em seguida, foi observado que parte do efeito antitumoral do PCX estava associado a modulação do perfil fenotípico dos TAMs. A análise da expressão gênica de TAMs isolados de tumores de camundongos tratados com PCX, mostrou uma redução na expressão de marcadores M2 (*cd206*, *relm α* , *mmp9* e *arg1*) e um aumento na expressão de genes característicos de macrófagos M1 (*il12*, *inos* e *il6*) que foi associada a redução do crescimento tumoral. Para confirmar se o mecanismo imune do PCX envolvia a polarização de TAMs via TLR4, foram gerados camundongos com deleção seletiva de TLR4 em macrófagos (LysM-Cre^{+/+}/TLR4^{fl/fl}). Notadamente, o efeito antitumoral do PCX foi reduzido nos camundongos LysM-Cre^{+/+}/Tlr4^{fl/fl}. Além disso, a análise de enriquecimento gênico realizada nas biópsias tumorais de pacientes antes e após o tratamento com PCX, demonstrou que o PCX aumenta a expressão de genes ligados a macrófagos com perfil M1, nesses tumores. Esses dados indicam que o PCX promove a polarização de TAMs para um perfil imunocompetente M1 via TLR4, e esse efeito contribui para sua eficácia antitumoral.

Palavras chave: Polarização de macrófagos, macrófagos associados ao tumor e microambiente tumoral.

ABSTRACT

Paclitaxel reduces tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages to M1-profile via TLR4

Paclitaxel (PCX) is an antineoplastic agent widely used to treat several solid tumor types. The primary mechanism of action of this drug is based on microtubule stabilization and induction of mitotic arrest leading to cells that proliferate rapidly to apoptosis. Here, was investigated whether PCX could reprogram the antitumor immune response by modulating the functional phenotype of tumor-associated macrophages (TAMs), as well as the involvement of TLR4 receptors on this process. Bone marrow macrophages from wild-type (WT) or TLR4 knockout mice in basal state of activation (*naïve*, M0) or previously polarized to M2-profile with IL-4 (10 ng/mL) were stimulated with PCX (10, 30, 100 μ M) or LPS (100 ng/mL). After 48h, M1 and M2 markers of polarization status were measured by cytometry and ELISA. Furthermore, mice WT, TLR4 knockout or with a conditional deletion of TLR4 on macrophages (LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl}) were inoculated with murine breast cancer (4T1) or melanoma (B16) cell lines and treated with saline or PCX. Following, the tumors were harvested and the TAMs isolated by standard percoll (positive selection) for phenotype analysis by qRT-PCR. A bioinformatical analysis of an online database containing biopsy transcripts from patients with ovarian cancer obtained before and after 3 cycles of PCX therapy (GSE15622) was performed with focus on immunological signatures. In *in vitro* conditions, PCX polarized *naïve* M0 macrophages to the M1-profile, blocked the M2-polarization and reprogrammed M2-polarized macrophages to the M1 phenotype in a TLR4-dependent manner, similarly to LPS. Accordingly, was observed that PCX played an antitumor effect through modulating the TAMs profile. Gene expression analysis of TAMs from tumors of PCX treated mice showed reduced expression of M2 markers (*cd206*, *relma*, *mmp9* and *arg1*) and up-regulation of M1 linked genes (*Il12*, *inos* and *Il6*). To confirm whether the PCX immune mechanism involved TAMs polarization via TLR4, we used mice selectively lacking TLR4 on macrophages (LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl}). Strikingly, the antitumor effect of PCX was significantly reduced in LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl} mice. Furthermore, the gene expression dataset analysis indicated an enrichment of genes linked to M1-profile in tumor biopsies from PCX treated patients. These findings indicate that PCX skews TAMs towards an M1 immunocompetent profile via TLR4 and this effect may contribute to the antitumor efficacy of PCX.

Keywords: Macrophage Polarization, Tumor-associated macrophage and Tumor Microenvironment

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismos de sinalização dos receptores TLR4	22
Figura 2. Espectro de ativação de macrófagos	24
Figura 3. Estratégia de imunofenotipagem de macrófagos por citometria de fluxo. ...	38
Figura 4. Paclitaxel (PCX) induz a polarização de macrófagos no sentido M1 via TLR4	42
Figura 5. Paclitaxel (PCX) induz a polarização de macrófagos para o perfil M1 em células deficientes de TLR2.	43
Figura 6. Paclitaxel (PCX) induz a ativação do NF- κ B via TLR4.	44
Figura 7. Paclitaxel (PCX) potencializa a resposta a um segundo estímulo inflamatório.	45
Figura 8. Macrófagos são resistentes ao efeito citotóxico do paclitaxel (PCX).	46
Figura 9. Paclitaxel (PCX) bloqueia a polarização dos macrófagos M2 induzida por IL-4.	48
Figura 10. Paclitaxel (PCX) induz polarização de macrófagos para o perfil M1 em células estimuladas com IL-4.	49
Figura 11. Paclitaxel (PCX) bloqueia a polarização de macrófagos M2 induzida por IL-4 de maneira dependente de TLR4.	51
Figura 12. TLR4 é essencial para o paclitaxel (PCX) bloquear a polarização de macrófagos para o sentido M2 e guiar as células no sentido M1.	52
Figura 13. Paclitaxel (PCX) bloqueia a polarização para M2 induzida por IL-4/STAT6	53
Figura 14. Paclitaxel (PCX) reprograma macrófagos M2 para o perfil M1.	55

Figura 15. Paclitaxel (PCX) reduz a expressão de marcadores M2 em macrófagos previamente polarizados para perfil M2 com IL-4.....	56
Figura 16. Paclitaxel (PCX) aumenta a produção de marcadores M1 em macrófagos previamente polarizados para o fenótipo M2 com IL-4.....	57
Figura 17. Paclitaxel (PCX) reprograma macrófagos associados ao tumor (TAMs) do tipo M2 para o perfil M1.....	59
Figura 18. TLR4 contribui para o efeito antitumoral do paclitaxel (PCX) através de um mecanismo independente de sua ação antiproliferativa.....	62
Figura 19. TLR4 é essencial para o paclitaxel (PCX) polarizar macrófagos associados ao tumor (TAMs) com perfil M2 para o perfil M1.	63
Figura 20. Paclitaxel (PCX) aumenta o infiltrado de células mielóides no tumor.....	64
Figura 21. Paclitaxel (PCX) reduz a expressão do CD206 especificamente em TAMs maduros.	65
Figura 22. Geração de camundongos condicionais deficientes de TLR4 em células mielóides.	66
Figura 23. A ativação dos receptores TLR4 nos macrófagos associados ao tumor contribui para o efeito antitumoral do paclitaxel (PCX).....	67
Figura 24. Análise de enriquecimento de conjunto de genes (AECG) da resposta ao paclitaxel (PCX) em pacientes com câncer de ovário.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AECG	Análise de enriquecimento de conjuntos de genes
ANOVA	Análise de variância
Arg1	Arginase 1
BSA	Albumina sérica bovina
CCL22	Quimiocina ligante C-C 22
CCL3/MIP1 α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 α
CD11b	Integrina alpha M
CD206/MR	Receptor de manose
CD4	Linfócito T CD4
CD45	Antígeno comum de leucócitos
CD8	Linfócitos T CD8
CDK4/6	Quinases dependentes de ciclina 4/6
cDNA	DNA complementar
COX-2	Ciclooxigenase-2
CRE	Recombinase - Topoisomerase do tipo I
CSF-R1	Receptor do fator estimulador de colônia 1
CXCL-1/KC	Quimiocina C-X-C ligante 1
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
F4/80	Receptor contendo hormônio semelhante a mucina 1
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDR	Taxa de falsas descobertas
FOXP3	Fator de transcrição Forkhead Box P3
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
IFG-1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IFN γ	Interferon gama
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-1 β	Interleucina 1beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INC	Instituto nacional do câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRF3	Fator 3 regulatório de interferon
L929	Linhagem de fibroblastos
LPS	Lipopolissacarídeo
Ly6C	Glicoproteína de superfície ancorada por GPI
LysM	Lisozima M

M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
M1	Macrófago M1
M2	Macrófago M2
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitogeno
MCP1	Proteína quimioatraente para monócitos – 1
MDMOs	Macrófagos derivados da medula óssea
MHCII	Complexo de histocompatibilidade do tipo II
Mmp9	Metaloproteinase 9
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Células natural killer
NO	Óxido Nítrico
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução salina tamponada
PCX	Paclitaxel
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
qRT-PCR	Reação de cadeia da polimerase em tempo real
Rel α	Molécula do tipo resistina α
RNA	Ácido ribonucléico
STAT6	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6
TAM	Macrófagos associados ao tumor do inglês <i>Tumor-associated macrophages</i>
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TLR2	Receptor Toll do tipo 2
TLR3	Receptor Toll do tipo 3
TLR4	Receptor Toll do tipo 4
TLRs	Receptores Toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TMB	Tetrametilbenzidina
TRAM	Cadeias de translocação associada a proteína 1 de membrana
Treg	Linfócitos T reguladores
TRIF	Adaptador contendo domínio TIR induzindo Interferon- β
USDA	Departamento de agricultura dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Papel da resposta imune na eficácia do tratamento oncológico	16
1.2 O Paclitaxel	18
1.3 O Paclitaxel e a resposta imune	18
1.4 Papel dos receptores TLR4 na resposta imune contra o câncer	20
1.5 Macrófagos associados ao tumor (TAMs) e seu potencial para o tratamento do câncer	23
2. HIPÓTESE	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Animais.....	28
4.2 Polarização de Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs)	29
4.3 Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)	30
4.4 Ensaio de gene repórter para o NF- κ B.....	31
4.5 Ensaio de Western Blotting	32
4.7 Dosagem de nitrito	32
4.6 Dosagem de Ureia	33
4.8 Ensaio de viabilidade celular (MTT)	33
4.9 Apoptose e necrose.....	34
4.10 Modelos de câncer de mama e melanoma murino	34
4.11 Isolamento de macrófagos associados a tumor (TAMs).....	35
4.12 Expressão gênica por PCR em tempo real.....	36
4.13 Contagem de leucócitos do sangue.....	37
4.14 Imunofenotipagem das populações de macrófagos por citometria de fluxo	37
4.14.1 Anticorpos utilizados para citometria de fluxo:	37
4.14.2 Painéis de marcação.....	38
4.15 Estratégia de seleção (gate) das subpopulações de macrófagos.....	38

4.16	Análise de enriquecimento de conjuntos de genes (AECG).....	40
4.17	Mapas de calor (heat maps).....	40
4.18	Análise estatística.....	40
5.	RESULTADOS.....	41
5.1	Paclitaxel (PCX) induz a polarização de macrófagos para o perfil M1 através da ativação dos receptores TLR4	41
5.2	Paclitaxel (PCX) impede a polarização de macrófagos para o sentido M2 induzida por IL-4	48
5.3	Paclitaxel (PCX) via TLR4/NF- κ B bloqueia a polarização de macrófagos para o sentido M2	51
5.4	Paclitaxel (PCX) reprograma macrófagos M2 para o sentido M1	55
5.5	Paclitaxel (PCX) reprograma o perfil dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) para o perfil M1	59
5.6	Paclitaxel (PCX) promove regressão tumoral através da polarização de TAMs para perfil M1 via TLR4.....	61
5.7	Paclitaxel (PCX) altera a assinatura imunológica de genes no microambiente tumoral	69
6.	DISCUSSÃO	71
7.	CONCLUSÃO	78
8.	REFERÊNCIAS.....	79
	ANEXO A - Artigo aceito no periódico Cancer Research (IF 9,1).....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Papel da resposta imune na eficácia do tratamento oncológico

No início do século XXI, Hanahan e Weinberg compilaram décadas de pesquisa experimental e clínica nas seis características registradas do câncer (do inglês *Hallmarks of cancer*): (I) autossuficiência em sinais de crescimento, (II) insensibilidade a sinais antiproliferativos, (III) resistência à morte celular, (IV) potencial replicativo ilimitado, (V) atividade pró-angiogênica e (VI) comportamento invasivo e metastático (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Esse modelo, deu suporte à ainda utilizada descrição do câncer como um conjunto de doenças nas quais células anormais dividem-se sem controle, invadem tecidos adjacentes e migram para outras regiões do corpo (WHO, 2018, TORRE et al., 2015).

Ao longo de décadas, esse conceito fundamentou a base para a pesquisa e desenvolvimento de terapias focadas na identificação de princípios ativos capazes de limitar a proliferação e induzir a morte de células malignas (ZITVOGEL et al., 2013). No entanto, a evolução do conhecimento fez emergir a noção de que a progressão dos tumores não depende exclusivamente da proliferação celular. Sabe-se hoje que um tumor é formado por um complexo aglomerado de células neoplásicas, estroma, componentes endoteliais, e várias populações de células imunológicas que interagem dentro de um microambiente (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essa renovada visão do microambiente tumoral propõem que além da inibição dos mecanismos de controle de proliferação celular, tumores precisam necessariamente adquirir a capacidade de suprimir a resposta imune para se desenvolver e progredir (CAVALLO et al., 2011; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Nos últimos anos, um dos campos mais promissores da pesquisa médica investiga mecanismos e formas para reativar a imunidade antitumoral. Nesse novo contexto, tem sido surpreendente notar que a eficácia de vários agentes antineoplásicos desenvolvidos ao longo do século XX sob o paradigma do câncer como uma doença celular autônoma, não se limitam à ação antiproliferativa, mas também a efeitos “colaterais” imunológicos capazes de induzir ou mesmo reativar a resposta imune contra os tumores (COFFELT; DE VISSER, 2015; GALLUZZI et al., 2015; ZITVOGEL et al., 2013).

Várias classes de quimioterápicos apresentam propriedades imunoestimulatórias. Dentre os vários exemplos, tem-se: 1) o tratamento com ciclofosfamida, um agente alquilante utilizado para tratar tumores sólidos e hematológicos, induz a supressão ou depleção de linfócitos T reguladores (Treg) (GHIRINGHELLI et al., 2004); 2) A quimioterapia com pemetrexede, um antimetabólito usado rotineiramente contra o mesotelioma pleural e câncer de pulmão, estimula a ativação de células NK (DAVIS et al., 2012). 3) A quimioterapia neoadjuvante a base de antraciclina (doxorubicina e idarrubicina) aumenta a proporção de linfócitos T CD8 infiltrados no tumor (LADOIRE et al., 2011). 4) Mais recentemente, foi demonstrado que o tratamento com o inibidor de quinases dependente de ciclinas 4/6 (CDK4/6) também pode aumentar a imunogenicidade do tumor, reduzir o número de linfócitos T reguladores e aumentar a quantidade de linfócitos CD8 infiltrados no microambiente tumoral (GOEL et al., 2017).

Esse conjunto de evidências mostra que a resposta imune pode, ao menos em parte, contribuir para a eficácia de agentes antineoplásicos classicamente utilizados no tratamento do câncer. No presente estudo foi investigado qual seria a contribuição da resposta imune para o efeito antineoplásico do paclitaxel (PCX).

1.2 O Paclitaxel

O paclitaxel (PCX) foi descoberto através de um programa de triagem (*screening*) realizado em uma colaboração entre o Instituto Nacional do Câncer (INC) e o departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA). Foram testados 115 mil extratos de 15 mil plantas diferentes. Verificou-se que as amostras do extrato de casca do teixo do pacífico, *Taxus brevifolia*, detinha propriedades citotóxicas (WEAVER, 2014). Em 1967, Mansukh Wani e Monroe Wall isolaram e identificaram o princípio ativo e o denominaram taxol ou PCX e publicaram sua estrutura em 1971 (WANI et al., 1971). Após a realização de testes experimentais e clínicos o *Food and Drug Administration* (FDA) americano aprovou em 1992 o uso do PCX para câncer de ovário, em 1994 para câncer de mama e em 1999 para câncer de pulmão (WEAVER, 2014). Na época, o PCX, único medicamento descoberto pelo programa de triagem, foi considerado o quimioterápico mais lucrativo da história e ainda hoje continua sendo extensivamente utilizado na prática clínica oncológica (WEAVER, 2014).

1.3 O Paclitaxel e a resposta imune

O mecanismo primário de ação do PCX baseia-se na polimerização e estabilização de microtúbulos compostos por subunidades de α - e β -tubulinas. A estabilização dos microtubulos previne a segregação dos cromossomos durante a metáfase da mitose ativando mecanismos de apoptose celular (MEKHAIL; MARKMAN, 2002; WEAVER, 2014).

A hipótese predominante nas últimas décadas tem sido que o PCX inibe o crescimento tumoral como consequência da estabilização dos microtúbulos e parada mitótica atuando preferencialmente em células que proliferam rapidamente. No entanto, evidências apontam que a ação farmacológica desse antineoplásico não está limitada à parada mitótica. Essa afirmação baseia-se no fato de que, comparado às linhagens de células tumorais, tumores humanos têm um tempo de duplicação celular mais lento. Além disso, cálculos que predizem índices mitóticos baseados nas taxas de duplicação celular dos tumores sugerem que o número de células em parada mitótica durante o tratamento com PCX não se correlaciona com a retração no crescimento tumoral produzida (KOMLODI-PASZTOR et al., 2011; MILROSS et al., 1996; MITCHISON, 2012). Esse paradoxo indica que a eficácia antineoplásica do PCX pode envolver outros mecanismos além da estabilização dos microtúbulos.

Curiosamente, Byrd-Lifer et al. em 2001 demonstrou que o PCX efetivamente induz a produção de TNF- α e óxido nítrico (NO) via ativação de receptores da resposta imune inata do tipo toll 4 (TLR4) em macrófagos murinos. Além disso, os autores demonstraram que a estabilização de microtúbulos produzida por essa droga ocorria independentemente da via TLR-4/MyD88, provando a distinção entre os mecanismos. Esse efeito alternativo do PCX foi demonstrado em outros modelos. Pfannenstiel et al. em 2010 evidenciaram que o PTX induz a maturação e ativação de células dendríticas via TLR4 *in vitro* (PFANNENSTIEL et al., 2010). Outros estudos mostraram que o PCX pode induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1 e IL-1) e das enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) em monócitos, neurônios e células tumorais provenientes de animais e humanos de maneira dependente da ativação

dos receptores TLR4 (CASSIDY et al., 2002; LI et al., 2015; PERERA et al., 2001; RESMAN et al., 2014; TLR et al., 2008; VOLK-DRAPER et al., 2014).

Esses achados demonstram as múltiplas ações do PCX no sistema imunológico, regulando a produção de citocinas/enzimas em diferentes tipos celulares. No entanto, até o momento o impacto da ativação dos receptores TLR4 pelo PCX sobre a resposta imune especificamente no microambiente tumoral e a contribuição desse mecanismo para a eficácia antineoplásica do PCX ainda é desconhecida.

1.4 Papel dos receptores TLR4 na resposta imune contra o câncer

Os receptores do tipo Toll (TLRs) são os principais receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) da resposta imune (MOGENSEN, 2009). Os TLRs reconhecem patógenos através da detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e moléculas endógenas associadas a dano tecidual (DAMPs), desempenhando um papel chave na iniciação da resposta imune inata e proteção do organismo (ADAMS, 2009; MOGENSEN, 2009). Os TLRs são predominantemente expressos em células do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas e no epitélio do trato gastrointestinal e pulmonar (MOGENSEN, 2009). Até o momento, foram caracterizados dez TLRs em humanos (TLR1 à TLR10) e doze em camundongos (TLR1 à TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13) (ADAMS, 2009; MOGENSEN, 2009).

Dentre os TLRs expressos em animais e humanos o TLR4 é o mais extensivamente estudado. Em 1997, Medzhitov et al. clonaram um homólogo humano da proteína Toll da *Drosophila sp.*, agora conhecido como TLR4, e

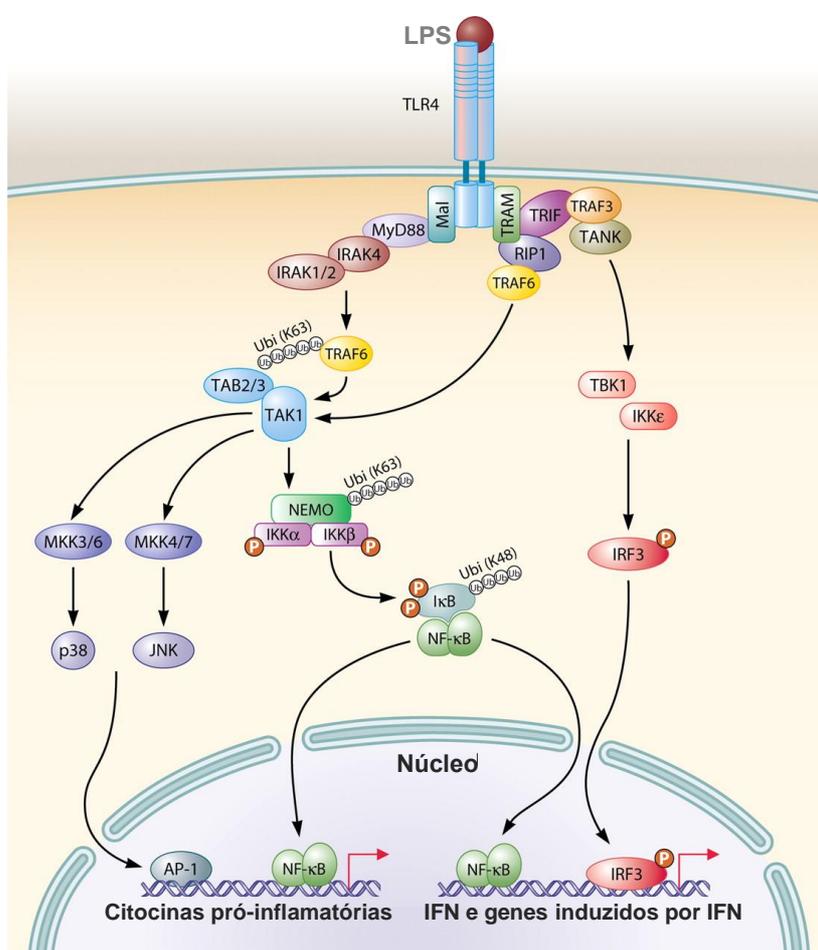
mostraram que a via de sinalização Toll/NF- κ B encontra-se conservada em humanos (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997). Logo após, foi demonstrado que o TLR4 é responsável pelo reconhecimento do maior componente da parede celular de bactérias gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS), estabelecendo a conexão entre os TLRs e o reconhecimento de PAMPs (POLTORAK et al., 1998; QURESHI et al., 1999). Atualmente, sabe-se que o reconhecimento do LPS pelos TLR4 desencadeia cascatas de sinalização que podem envolver: a via MyD88/NF- κ B, ou a via alternativa TRAM/TRIF levando à produção de citocinas, quimiocinas, e à ativação da resposta imune (figura 1) (MOGENSEN, 2009).

Na última década a importância do TLR4 na resposta do hospedeiro aos tumores tornou-se evidente pelo fato de que polimorfismos de TLR4 foram associados não apenas à suscetibilidade a infecções, mas também ao desenvolvimento de tumores (EL-OMAR; NG; HOLD, 2008). Nesse contexto é importante mencionar que já em 1891, William B. Coley, pioneiro da imunoterapia, demonstrou que a injeção de uma mistura de bactérias patogênicas mortas poderia tratar pacientes com sarcomas inoperáveis (MCCARTHY, 2006). Posteriormente, o LPS foi isolado e descrito como o agente ativo da toxina de Coley e vários outros estudos evidenciaram que o LPS, pode ativar a imunidade antitumoral em camundongos e humanos (CHICOINE et al., 2007; DAVIS et al., 2011; IMMUNOTHER, 1996; PAULOS et al., 2007; SHEAR; TURNER, 1943). Ainda, em acordo com esses achados foi observado que a deleção gênica do receptor TLR4 em camundongos estava associada ao desenvolvimento de tumores, aumento do número de metástases e redução da resposta imune antitumoral mediada por

células dendríticas e linfócitos T (AHMED; REDMOND; WANG, 2013; FANG et al., 2014; NASEEMUDDIN et al., 2012; YUSUF et al., 2008).

Em conjunto, esses achados revelam o potencial terapêutico de agonistas de receptores TLR4 como uma estratégia promissora para tratar câncer. Nesse sentido, buscamos investigar o potencial antitumoral da interação PCX/TLR4.

Figura 1. Mecanismos de sinalização dos receptores TLR4



Fonte: Adaptado de MOGENSEN, et al. (2008)

O TLR4 ativa tanto vias dependentes como independentes de MyD88. A via dependente de MyD88 é responsável pela ativação do NF-κB e MAPK que controlam a indução rápida de citocinas pró-inflamatórias. A via TRAM/TRIF, independente de MyD88, ativa o IRF3 necessário para a indução de IFN γ . Além disso, essa via induz a ativação tardia do NF-κB, e de MAPK contribuindo para resposta inflamatória.

1.5 Macrófagos associados ao tumor (TAMs) e seu potencial para o tratamento do câncer

Macrófagos são células imunológicas capazes de adotar diferentes fenótipos funcionais em resposta a citocinas ou sinais patogênicos (STOUT et al., 2005). Os dois principais fenótipos, chamados M1 e M2 representam as extremidades de um amplo espectro de funções contrastantes onde: macrófagos M1 possuem propriedades pró-inflamatórias, imunogênicas e antitumorais, enquanto que os macrófagos M2 apresentam efeitos anti-inflamatórios, tolerogênicos e pró-tumorais (BISWAS; MANTOVANI, 2010; MOSSER; EDWARDS, 2008; MURRAY et al., 2014). Citocinas do tipo Th1 (TNF, IL-12 e IFN γ), PAMPs e DAMPs direcionam a polarização de macrófagos no sentido M1; enquanto que a exposição a citocinas Th2 (IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β), resulta na polarização de macrófagos para o perfil M2 (figura 2) (BISWAS; MANTOVANI, 2010; MOSSER; EDWARDS, 2008).

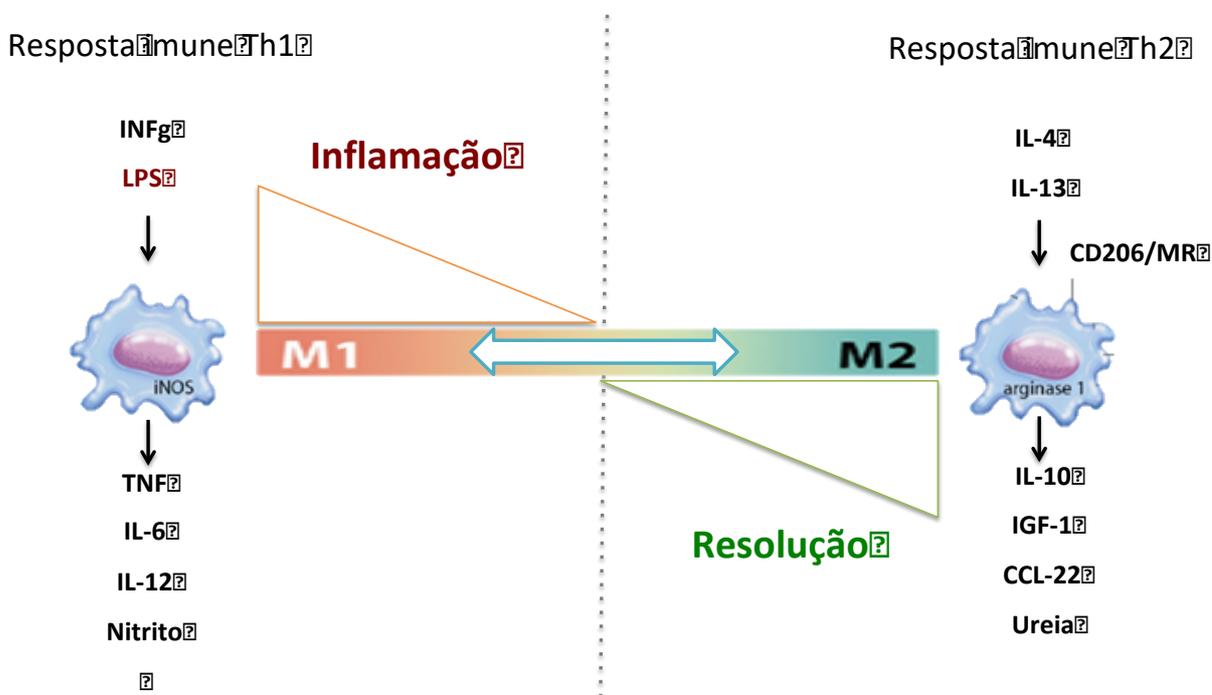
Diferentes células do sistema imunológico estão infiltradas no microambiente tumoral, cada uma das quais tem o potencial para funções pró ou antitumorais (CAVALLO et al., 2011; PAVLOVA; THOMPSON, 2016). Dentre as células mielóides infiltradas no tumor, os macrófagos são o tipo numericamente predominante (CHANMEE et al., 2014; MAJETY et al., 2018). No microambiente tumoral, mediadores locais influenciam os macrófagos associados a tumor (TAMs) a adotar um fenótipo semelhante ao M2, que suporta o escape da imunovigilância, a angiogênese e a remodelação da matriz extracelular, contribuindo para a progressão tumoral (CHANMEE et al., 2014; MAJETY et al., 2018). De fato, uma meta-análise identificou que o aumento da infiltração de macrófagos no tecido tumoral associa-se a piores desfechos clínicos (ZHANG et al., 2012a).

No entanto, diferentemente das outras células do sistema imune, macrófagos possuem a plasticidade para mudar de fenótipo de acordo com o estímulo prevalente no ambiente (BISWAS; MANTOVANI, 2010; MOSSER; EDWARDS, 2008; MURRAY et al., 2014). Trabalhos recentes demonstraram que macrófagos polarizados para o perfil M2 por citocinas do tipo Th2 como IL-4 e IL-13 poderiam ser reprogramados para o perfil M1 quando expostos ao LPS ou outro estímulo inato (AUTHIER et al., 2008; MAJOR; FLETCHER; HAMILTON, 2002; STOUT et al., 2005).

Nesse sentido, têm-se explorado experimentalmente a plasticidade dos macrófagos como uma potencial abordagem terapêutica para o tratamento oncológico. Pyontec et al. (2013) demonstraram que o tratamento com o antagonista do receptor do fator estimulador de colônia 1 (CSF-R1) reduziu o crescimento tumoral via reprogramação fenotípica dos TAMs para o perfil M1 (PYONTECK et al., 2013). Resultados semelhantes foram observados em modelos de câncer de ovário e tumor de pulmão por meio de estímulos com a bactéria *Listeria monocytogenes* ou com agonista de TLR3 (polyI:C), respectivamente (LIZOTTE et al., 2014; SHIME et al., 2012).

Trabalhos prévios demonstraram que o PCX pode ativar o receptor TLR4 de maneira semelhante ao LPS e efetivamente induzir uma resposta imune (CASSIDY et al., 2002; LI et al., 2015; PERERA et al., 2001; RESMAN et al., 2014; TLR et al., 2008; VOLK-DRAPER et al., 2014). No entanto, pouco se sabe sobre como a interação PCX/TLR4 poderia modular a plasticidade dos macrófagos no microambiente tumoral e qual seria a contribuição desse mecanismo para eficácia antineoplásica do PCX.

Figura 2. Espectro de ativação de macrófagos



Macrófagos são polarizados para o perfil M1 quando ativados por LPS, IFN γ ou TNF- α . Em alternativa, os macrófagos podem ser polarizados para o perfil M2 quando estimulados com IL-4 e IL-13. Citocinas como TNF- α , IL-6, IL-12 e a expressão aumentada de iNOS são clássicos marcadores de macrófagos M1. Por outro lado, a produção de IGF-1, CCL22, IL-10, expressão aumentada do receptor de manose (CD206/MR) e da enzima arginase (ARG1) são clássicos marcadores de macrófagos polarizados para o perfil M2.

2. HIPÓTESE

O PCX via ativação dos receptores TLR4 reprograma o perfil funcional de macrófagos associados ao tumor do tipo M2 para o sentido ativo M1 e esse efeito contribui para sua eficácia antitumoral.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito LPS mimético do PCX sobre a plasticidade de macrófagos e o impacto desse mecanismo sobre eficácia antitumoral do PCX.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito do PCX na polarização de macrófagos *naive* M0.
- Investigar o efeito do PCX na polarização de macrófagos M2.
- Analisar o possível envolvimento da via TLR4/NF-kB nesse mecanismo.
- Avaliar o efeito do tratamento com PCX sobre o perfil fenotípico dos TAMs.
- Analisar a papel dos receptores TLR4 no efeito antitumoral do PCX.
- Avaliar clinicamente o efeito imunomodulador do PCX.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas com idade entre 6-7 semanas das linhagens BALB/c do tipo selvagem (WT), C57BL/6 (WT), *knockout* para o receptor Toll-like 4 (TLR4^{-/-}), *knockout* para os receptor Toll-like-2 (TLR2^{-/-}) e camundongos com deleção condicional do receptor TLR4 nas células mielóides (LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl}). Os animais com a deleção condicional foram criados a partir de cruzamentos controlados entre camundongos homocigóticos para a expressão transgênica da enzima Cre-recombinase sob o controle do promotor da Lisozima M mielóide (LysM-Cre^{+/+}) com camundongos homocigotos para mutação *Floxed* flanqueando o exon 3 do gene TLR4 (TLR4^{fl/fl}) adquiridos do laboratório Jackson (USA). Os camundongos da geração F2 com o genótipo heterocigoto (LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/-}) foram cruzados com camundongos TLR4-Flox (TLR4^{fl/fl}) homocigotos para criar os camundongos condicionais com o genótipo desejado LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl}. Os camundongos com genótipo controle (LysM-Cre^{+/-}) foram produzidos cruzando camundongos LysM-Cre^{+/+} homocigotos com camundongos C57BL/6 selvagens. O genótipo de todos os camundongos condicionais e controles utilizados nesse estudo foi confirmado por PCR. Pares de *primers*: LysM-Cre - mutante (5'-CCCAGAAATGCCAGATTACG-3'), comum (5'-CTTGGGCTGCCAGAATTTCTG-3') e selvagem (5'-TTACAGTCGGCCAGGCTGAC-3'); TLR^{fl/fl} - *Foward* (5'-TGACCACCCATATTGCCTATAC-3') e *Reverse* - (5'-TGATGGTGTGAGCAGGAGAG-3'). Todos os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas com ciclo claro/escuro de 12/12 h, temperatura controlada de ± 23°C, com ração e água *ad libitum* no Biotério do Departamento de

Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os protocolos e procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-FMRP (número de protocolo: 56/2016) e estão de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Polarização de Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs)

Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) foram obtidos como previamente descrito por GERSUK; RAZAI; MARR, 2008 . Células totipotentes da medula óssea do fêmur de camundongos foram isoladas e cultivadas em meio RPMI (Sigma) contendo 20% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco, EUA), 20% (v/v) do sobrenadante de cultura de células L929 (rico em fator estimulante de colônia de macrófagos - M-CSF), penicilina (100 U/mL) e anfotericina B (2 µg/mL). As culturas foram realizadas em placa de Petri específicas pouco aderentes (BD OPTILUX) em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 7 dias de cultura, a diferenciação de macrófagos foi confirmada através da expressão de F4/80 avaliada por citometria de fluxo e culturas com mais de 90% de células F4/80+ foram utilizadas. A densidade celular requerida para os experimentos em placas (Costar) de 96 poços foi de 2x10⁵ células/poço (para ensaio de ELISA), 12 poços foi de 1x10⁶ células/poço (para citometria de fluxo, dosagem de nitrito e ureia, e PCR) e de 6 poços foi de 3x10⁶ células/poço (para western blot). Como controle, os macrófagos foram cultivados apenas em meio de cultura RPMI completo (10% de SFB, penicilina 100 UI/mL, e anfotericina B 2 µg/mL) para manter um estado basal de ativação denominado macrófago M0. Para controle de polarização para o perfil M1 macrófagos foram estimulados com LPS (100 ng/mL;

Sigma) e para o perfil M2 com IL-4 (10 ng/mL; R&D). O PCX foi testado em três concentrações (10, 30, 100 μ M, Sigma-Aldrich), após 48 horas foram avaliados marcadores de polarização de macrófagos M1 e M2 (M1 - TNF- α , IL -12p40, IL-6, nitrito, iNOS; M2 - CCL22, IGF-1, CD206 e ureia, respectivamente) e realizados testes de viabilidade celular (Anexina V/PI e MTT).

4.3 Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A quantificação da concentração de TNF- α , IL-12p40, IL-6, IL-1 β , CCL3/MIP-1 α CXCL-1/KC, CCL22 e IGF-1 no sobrenadante da cultura de MDMOs foi realizada por ELISA utilizando anticorpos e reagentes obtidos da R&D Systems de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, o anticorpo de captura foi adicionado em placa de 96 poços de fundo chato previamente sensibilizada e mantida por 16 horas a 4°C. Em seguida foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas do anticorpo primário com PBS-BSA 1% por 2 horas a temperatura ambiente. As amostras foram adicionadas, assim como a citocina padrão que foi diluída de maneira seriada, conforme as recomendações do fabricante. Após duas horas de incubação à temperatura ambiente, foi adicionado o anticorpo de detecção biotilado diluído em PBS-BSA 1% na concentração de trabalho. Após 2 horas, foi adicionada a estreptoavidina-peroxidase diluída 1:200 em PBS-BSA 1% mantida por 20 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado o cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio nas concentrações indicadas pelo fabricante. Após 20 minutos de incubação, a reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1N). A leitura foi realizada imediatamente em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 450 nm (Spectra

Max-250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Os valores das absorvâncias das amostras foram subtraídos do branco e interpolados com a curva padrão. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas por mililitro de sobrenadante (pg/mL) (WONG et al., 2015).

4.4 Ensaio de gene repórter para o NF- κ B

A linhagem de macrófago murino (NF- κ B reporter RAW 264.7 murine macrophage), que expressa estavelmente a luciferase sob o controle do promotor responsivo ao NF- κ B (*pNF- κ B-Luc*) foi cultivada em meio RPMI completo (10% de SFB, penicilina 100 UI/mL, e anfotericina B 2 μ g/mL), em placas de 24 poços na densidade de 3×10^5 células/poço mantidas em estufa de incubação a temperatura de 37°C com 5% de CO₂. As células foram estimuladas com LPS (100 ng/mL) ou PCX (10, 30 ou 100 μ M). Em outro experimento, as células foram tratadas com LPS-RS (antagonista do LPS, 500 ng/mL) 30 minutos antes dos estímulos com LPS ou PCX. Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. Após mais 6 horas de incubação, os conteúdos intracelulares foram extraídos em tampão de lise (TNT) e a atividade da luciferase foi determinada em um luminômetro (FlexStation 3 Microplate Reader, Califórnia, EUA) usando o sistema de ensaio repórter (Promega, Wisconsin, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Especificamente, nesse ensaio a ativação do fator de transcrição NF- κ B leva à transcrição do gene da luciferase que catalisa a reação de oxidação da luciferina, produzindo oxiluciferina e fótons, sendo a atividade dessa enzima quantificada pela emissão de fótons (luminometria). Os resultados foram expressos como atividade da luciferase relativa

ao controle negativo (*fold*) e representam uma medida indireta da atividade do NF- κ B (RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015).

4.5 Ensaio de Western Blotting

As amostras de MDMOs (3×10^6 células/poço) foram lisadas em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS, 0,5% DOC, 1 mM PMSF, 25 mM MgCl₂) suplementado com inibidores de protease (Roche) e fosfatase (Calbiochem). A concentração de proteína foi determinada pelo método de *Bradford protein assay* (Pierce, Rockford, IL USA). Quantidades equivalentes de proteínas foram separadas por electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido por transferência para membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com tampão TBS-T/leite desnatado 5% e em seguida incubada com os seguintes anticorpos primários: anti-iNOS (1:5000; Sigma), anti-STAT6 fosforilado (1:1000; cell signaling), anti-STAT6 (1:1000; cell signaling) ou anti-NF- κ B P65 fosforilado (1:1000; cell signaling), seguido da incubação do anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti- β -actina 1:5000, Sigma ou anti-GAPDH 1:5000, Sigma). A revelação foi realizada utilizando o reagente ECF e o sistema ChemiDoc™ XRS (BioRad, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (LIMA et al., 2012).

4.7 Dosagem de nitrito

A concentração de nitrito (NO₂) no sobrenadante da cultura de MDMOs foi quantificada pelo método colorimétrico de Griess (RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015). Primeiramente, em placa de 96 poços foi adicionado 50 μ L do sobrenadante de

cultura de MDMOs seguido do mesmo volume do reagente de Griess (0,5% de ácido sulfanílico, 0,002% de dihidrocloridrato de N-1-naftil-etilenodiamina e 14% de ácido acético glacial). Para a confecção de uma curva padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200 μ M seguida de diluições seriadas. Após incubação de 10 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz, a leitura foi realizada no espectrofotômetro a 550 nm (Spectra Max-250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A concentração de nitrito nas amostras foi determinada de acordo com a curva padrão.

4.6 Dosagem de Ureia

A atividade enzimática da arginase (ARG) foi indiretamente determinada pela medida da concentração de uréia no sobrenadante das culturas de MDMOs. A quantificação foi realizada através de um ensaio colorimétrico enzimático (CE LABTEST) de acordo com as recomendações do fabricante. A densidade óptica das amostras individuais foi medida a 600 nm (Spectra Max-250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e os valores expressos em miligrama por decilitro (mg/dL).

4.8 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pela redução mitocondrial de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) a formazan como anteriormente descrito por Yang et al. (2010). Resumidamente, os MDMOs foram incubadas com MTT (2 mg/mL) por 2h a 37°C em de 5% de CO₂. Posteriormente os cristais de formazan foram solubilizadas em DMSO. A absorvência das amostras individuais foi

medida a 550 nm (Spectra Max-250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). os resultados são apresentados de forma relativa as células não tratadas normalizadas para 100% (YANG et al., 2010).

4.9 Apoptose e necrose

A morte celular por apoptose ou necrose foi analisada por citometria de fluxo por meio da marcação para anexina V e iodeto de propídeo (PI). Macrófagos diferenciados da medula óssea (2×10^6 células/poço em placas de 12 poços) foram estimulados com LPS (100ng/mL) ou PCX (30 μ M) e, após 48h, as células foram incubadas com anexina V conjugada com FITC por 15 min em temperatura ambiente e protegidas da luz. Após centrifugação (450g, 5min), foram adicionados 10 uL de iodeto de propídeo diluídos em 190 uL de tampão de ligação de anexina V. Após leve agitação, as amostras foram analisada por citometria de fluxo (citômetro BD FACSVerser[™] - BD Bioscience) (ZHANG et al., 2012b).

4.10 Modelos de câncer de mama e melanoma murino

As células de câncer de mama murino 4T1 (ATCC, EUA) ou de melanoma B16 (ATCC, EUA) foram cultivadas em meio RPMI completo (10% de SFB, penicilina 100 UI/mL, e anfotericina B 2 μ g/mL). Para o modelo de câncer de mama, foram injetadas 5×10^4 células da linhagem 4T1 no tecido subcutâneo de camundongos BALB/c (KIM et al., 2010). Após 16 dias, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos e tratados com salina ou PCX (10 mg/kg, i.p., a cada 8 horas). Após 24 horas do início do tratamento, os animais foram eutanasiados e os

tumores foram colhidos para avaliar o fenótipo funcional dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) por citometria de fluxo e RT-PCR. As células de melanoma murino (B16) foram injetadas via subcutânea no flanco direito de camundongos C57BL/6 selvagens (WT), TLR4^{-/-}, LysM-Cre^{+/-} ou LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl} (MOTA et al., 2016). Após 7 dias, os animais foram divididos em dois grupos tratados com solução salina ou PCX. Os volumes tumorais foram calculados de acordo com a fórmula: volume do tumor (mm³) = L × W²/2, onde L representa o eixo maior (maior diâmetro transversal), e W representa o eixo menor do tumor. Após eutanásia os tumores foram colhidos para avaliar o fenótipo funcional dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) por citometria de fluxo.

4.11 Isolamento de macrófagos associados a tumor (TAMs)

As amostras de tumor foram digeridas em colagenase tipo II (1 mg/mL, Sigma) durante 60 min a temperatura de 37°C e sob agitação. Em seguida, as células foram suspensas em Percoll (70%/30%) e centrifugadas (1800 RPM, 23 min, 4°C). A camada correspondente de linfomononucleares foi isolada e cultivada por 40 minutos a 37°C. Após três lavagens, as células aderidas remanescentes na placa foram removidas fisicamente (MOTA et al., 2016). Marcadores de estado de polarização de macrófagos M1 e M2 foram avaliados por citometria de fluxo (CD45+CD11b+/F4/80+/CD206+) e PCR em tempo real (marcadores M1: *Il12*, *Inos* e *Il6* e M2: *cd206*, *Relmα*, *mmp9* e *Arg1*).

4.12 Expressão gênica por PCR em tempo real

Foi realizada uma análise de expressão de genes relacionados com a polarização de macrófagos (M1: *Il12*, *Inos* e *Il6* e M2: *cd206*, *Relma*, *mmp9* e *Arg1*) por qRT-PCR. Brevemente, o RNA total foi extraído usando *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O rendimento e qualidade do RNA total foi verificado por meio de quantificação espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 260 nm e da razão 260/280 nm, respectivamente. Em seguida o RNA total (2 µg) foi transcrito reversamente com o *kit high capacity cDNA RT* (Applied Biosystem) em cDNA utilizando o sistema termociclador C1000 Touch™. O PCR em tempo real foi realizado no equipamento ViiA7 (Applied Biosystems) utilizando o supermix iQ™ SYBR (Bio-Rad), de acordo com as especificações do fabricante. A expressão do mRNA foi determinada após a normalização dos valores com a do gene de referência *Gapdh*. A expressão relativa foi quantificada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIMA-JÚNIOR et al., 2014). A PCR em tempo real foi realizada usando os seguintes *primers*:

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados no qRT-PCR

<i>Primer</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>Il12</i>	5'-CACGGCAGCAGAATAAATA-3'	5'-CTTGAGGGAGAAGTAGGAATG-3'
<i>Inos</i>	5'-TTCACCCAGTTGTGCATCGACCTA-3'	5'-TCCATGGTCACCTCCAACACAAGA-3'
<i>Il6</i>	5'-TTCCTACCCCAATTTCCAAT-3'	5'-CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC-3'
<i>cd206</i>	5'-CTCGTGGATCTCCGTGACAC-3'	5'-GCAAATGGAGCCGTCTGTGC-3'
<i>realm</i>	5'-CCTGAGATTCTGCCCCAGGAT-3'	5'-TTCAGTGGACCATCAGCTGG-3'
<i>mmp9</i>	5'-AACATCTGGCACTCCACACC-3'	5'-GCAGAAGTTCTTTGGCCTGC-3'
<i>Arg1</i>	5'-CCAGAAGAATGGAAGAGTCAGTGT-3'	5'-GCAGATATGCAGGGAGTCACC-3'
<i>Gapdh</i>	5'-GGGTGTGAACACGAGAAAT-3'	5'-CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'

4.13 Contagem de leucócitos do sangue

Os camundongos portadores de melanoma foram levemente sedados por anestesia inalatória com isoflurano 24 horas após o último tratamento com salina ou PCX (10 mg/mL, i.p., diariamente, total de 4 aplicações). A amostra de sangue foi coletada do plexo retro-orbital e diluída em solução de Turk (1:20). A contagem de leucócitos foi então determinada usando a câmara de *Neubauer* e expressa como número de células x 10³/μL de sangue (LIMA-JÚNIOR et al., 2014).

4.14 Imunofenotipagem das populações de macrófagos por citometria de fluxo

Os MDMOs ou a suspensão de células isoladas do tumor foram submetidos à marcação com anticorpos conjugados à fluoróforos para determinação do perfil fenotípico por citometria de fluxo. As células foram incubadas por 20 min com anticorpos de superfície à temperatura ambiente sob proteção da luz. A aquisição das células foi realizada utilizando o citômetro BD FACSVerser™ (BD Bioscience) e os dados foram analisados pelo software FlowJo (V10.0.7). Três experimentos separados foram realizados para cada população de macrófagos analisados. Os resultados foram expressos como porcentagem (análise qualitativa), pelo número total de células (análise quantitativa) ou pela expressão de intensidade média de fluorescência (MFI) (análise quantitativa) dos marcadores.

4.14.1 Anticorpos utilizados para citometria de fluxo:

- Anti-CD45 (conjugado com BV421, eBioscience, 421563890)
- Anti-F4/80 (conjugado com FITC, eBioscience - 11480185)
- Anti-CD11b (conjugado com APC, Immuntools, 22159116S)

- Anti-CD206/MR (conjugado com APC, Bio-Rad, MCA2235A647 ou conjugado com PE, BioLegend, 12206182).
- Anti-MHCII (conjugado com PE, BioLegend, 107607).
- Anti-Ly6C (conjugado com PerCP, BioLegend, 128011).

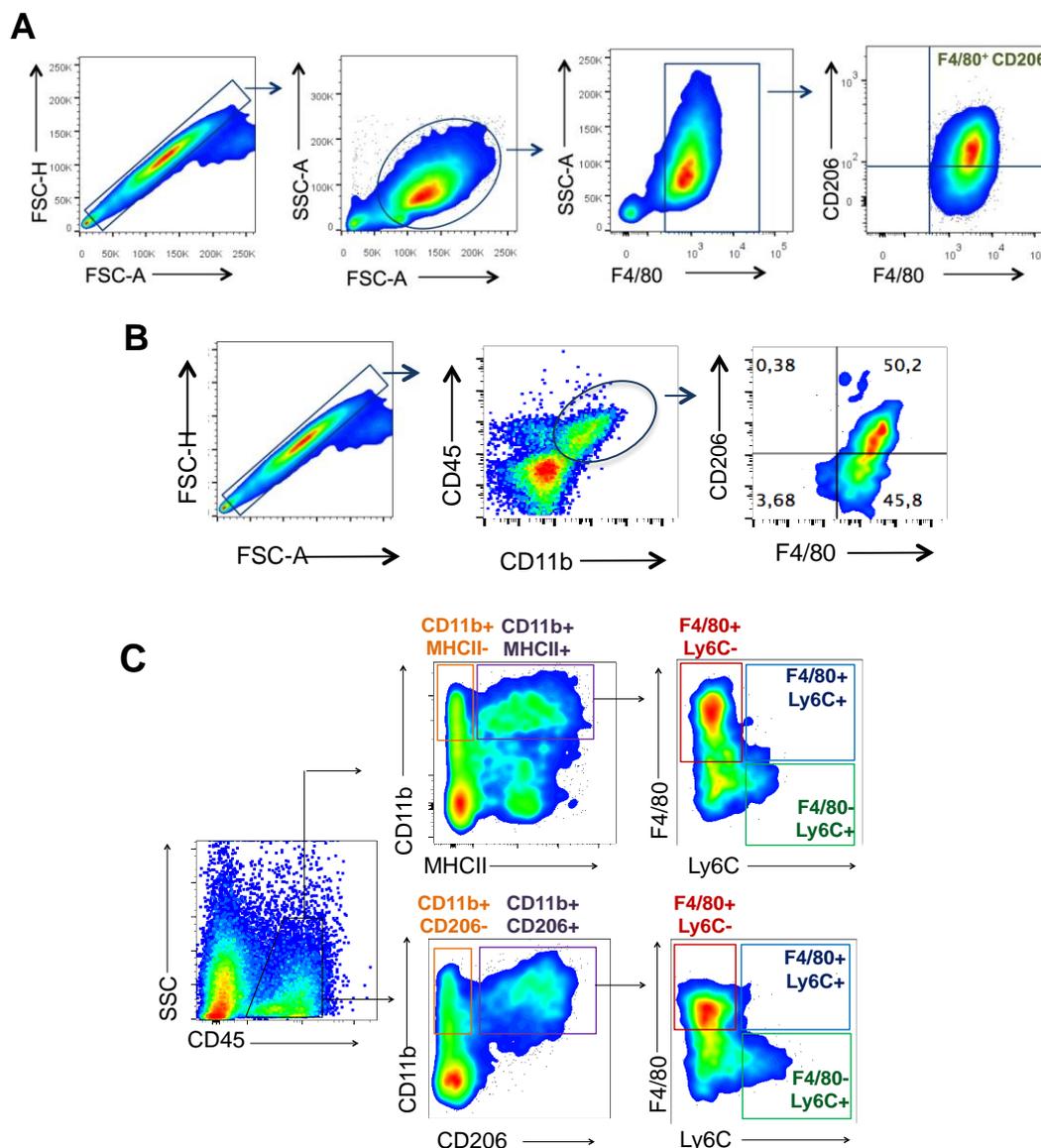
4.14.2 Painéis de marcação

- *Experimentos in vitro*: F4/80-FITC/CD206-APC
- *Experimentos in vivo*: F4/80-FITC/CD206-APC, CD45-BV421/CD11b-APC /F4/80-FITC/CD206-PE, CD45-BV421/CD11b-APC/F4/80-FITC/Ly6C-PERC-P/CD206-PE ou CD45-BV421/CD11b-APC/F4/80-FITC/Ly6C-PerCP/MHCII-PE

4.15 Estratégia de seleção (gate) das subpopulações de macrófagos

Nos experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* a população de macrófagos foi inicialmente selecionada conforme o tamanho (FSC – dispersão frontal) e complexidade interna (SSC – dispersão lateral). Foram selecionadas células com grande tamanho e baixa granulosidade (figura 3 A). Após a seleção a presença de macrófagos foi confirmada por meio da marcação com F4/80 (marcador de macrófagos maduros). Ainda para avaliar o perfil fenotípico dessas células foi analisado a expressão do CD206 (marcador de macrófagos com perfil M2). Ao final da análise as células F4/80⁺CD206⁺ foram consideradas macrófagos com perfil M2 (figura 3 A). Na suspensão de massas tumorais obtidas de animais com melanoma, inicialmente foram selecionadas as células mielóides (CD45⁺CD11b⁺) e em seguida foi avaliada a marcação do CD206 ou MHCII nos macrófagos associados ao tumor (TAMs) positivos para F4/80⁺ (figura 3 B) ou nos diferentes subtipos de células mielóides: macrófagos maduros F4/80⁺/Ly6C⁻, macrófagos imaturos (F4/80⁺/Ly6C⁺) e monócitos (F4/80⁻Ly6C⁺) (figura 3 C).

Figura 3. Estratégia de imunofenotipagem de macrófagos por citometria de fluxo.



(A) Inicialmente foram selecionadas as *singlets* (FSC-H vs. FSC-A). Em seguida, a população de macrófagos de acordo com tamanho e granulosidade (SSC-A vs. FSC-A). Por fim, nas células F4/80⁺ foi avaliada a expressão do CD206. (B) Foram selecionadas as células mielóides (CD45⁺CD11b⁺) e em seguida foi avaliada a percentagem de células F4/80⁺CD206⁺. (B) Foram selecionadas os leucócitos (CD45⁺) e em seguida avaliada a percentagem de células CD11b⁺MHCII⁺ ou CD11b⁺CD206⁺. (C) Por fim, foi analisada a distribuição dos subtipos de células mielóides (CD11b⁺) positivas para MHCII e CD206 em: macrófagos maduros F4/80⁺/Ly6C⁻, macrófagos imaturos (F4/80⁺/Ly6C⁺) e monócitos (F4/80⁻/Ly6C⁺).

4.16 Análise de enriquecimento de conjuntos de genes (AECG)

Todos os dados de *microarray* utilizados nesse estudo foram obtidos do banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO) número de acesso GSE15622. A análise de enriquecimento do conjunto de genes (AECG) foi realizada usando GSEA *software* (<http://www.software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). As análises foram realizadas com foco em banco de assinaturas imunológicas (immuneSigDB) (GODEC et al., 2016). O valor de FDR_q representa a probabilidade estimada de falso positivo (um FDR_q<0,25 foi aceito) e o valor nominal de *P* estima a significância estatística do enriquecimento para um dado conjunto de genes (SUBRAMANIAN et al., 2005).

4.17 Mapas de calor (*heat maps*)

Os mapas de calor foram gerados na plataforma *Morpheus* (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/morpheus/>). Os valores de expressão gênica foram normalizadas e expressos como log 2. O agrupamento hierárquico foi baseado na análise do coeficiente de correlação de Pearson.

4.18 Análise estatística

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste t de Student não-pareado ou ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni quando apropriado. Significância estatística foi aceita para *P*<0,05. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism versão 7.0c (GraphPad Software, USA).

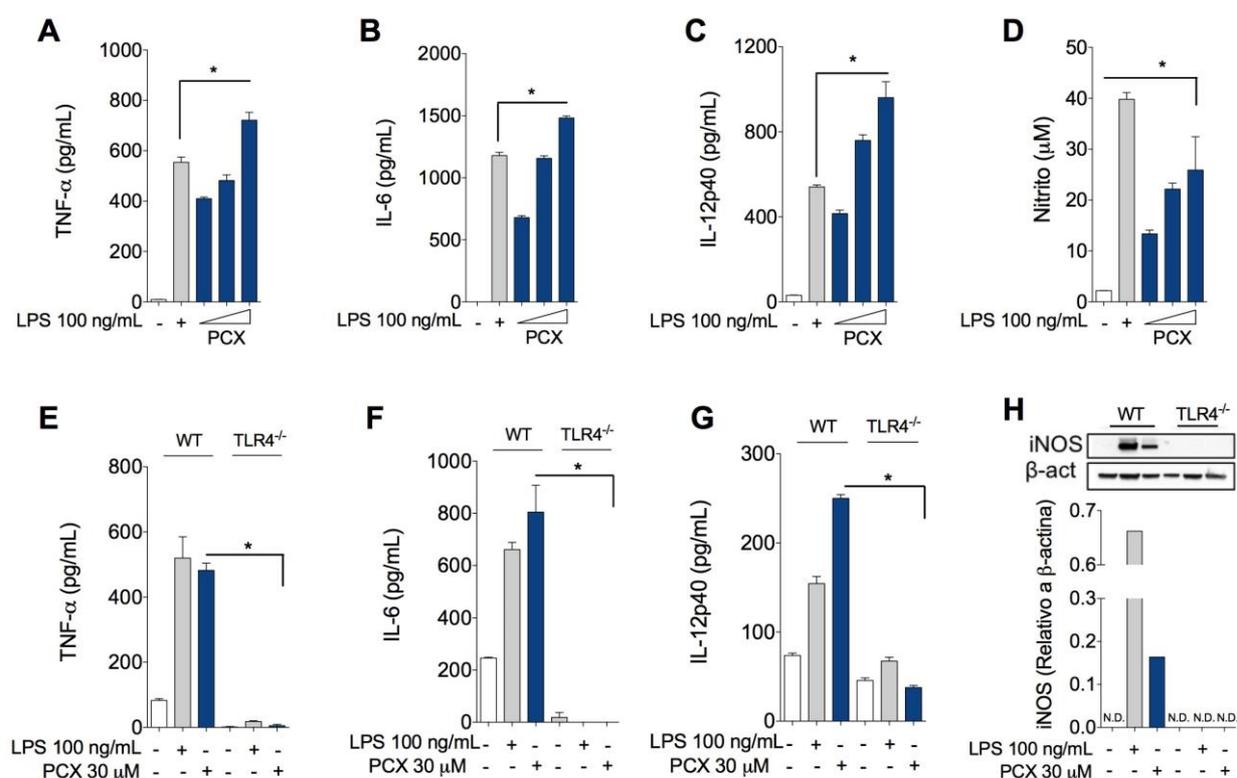
5. RESULTADOS

5.1 Paclitaxel (PCX) induz a polarização de macrófagos para o perfil M1 através da ativação dos receptores TLR4

Para investigar o efeito do PCX na polarização de macrófagos, MDMOs foram estimulados com LPS (100 ng/mL) ou com concentrações crescentes de PCX (10, 30 ou 100 μ M). Similar ao controle positivo, o tratamento com PCX induziu aumento na produção de marcadores característicos de macrófagos M1 (TNF- α , IL-6, IL-12 e nitrito) de maneira concentração dependente (figura 4 A-D). Prévios estudos já haviam demonstrado que o PCX pode ativar diretamente os receptores TLR4 (WANG; LIANG; ZEN, 2014). Desta forma, investigamos se o efeito na polarização de macrófagos, inicialmente observado nesse estudo, depende da ativação desse receptor. Para isso MDMOs de animais TLR4^{-/-} foram estimulados com LPS ou PCX. Foi observado que a indução da produção de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-12) e aumento da expressão da iNOS induzida pelo PCX e LPS é dependente de TLR4 (figura 4 E-H). Para confirmar que esse efeito é especificamente ligado a ativação de TLR4, MDMOs de animais TLR2^{-/-} foram estimulados com LPS ou PCX. Nessa condição, PCX e LPS induziram aumento de marcadores M1 (TNF- α , IL-6 e nitrito) similar ao observado nos MDMOs obtidos de animais WT (figura 5 A-C) sugerindo que o efeito é específico em TLR4. A sinalização canônica do TLR4 envolve a ativação do fator de transcrição NF- κ B (MOGENSEN, 2009). Nesse sentido, macrófagos RAW 264.7 que expressam estavelmente o gene repórter da luciferase na região promotora do NF- κ B foram estimulados com LPS ou PCX. Foi observado que o tratamento com PCX aumentou a atividade do NF- κ B de maneira

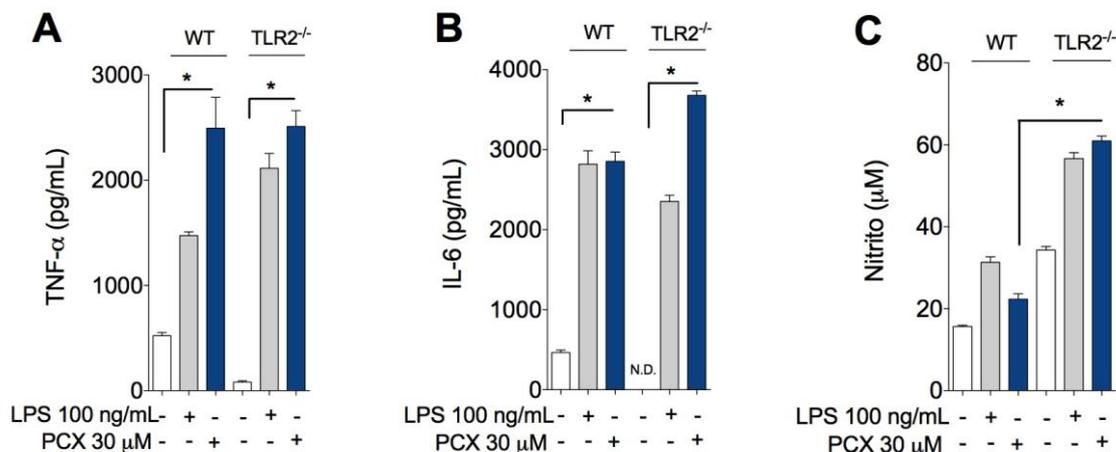
concentração dependente (figura 6 A). Além disso, foi verificado que a associação de PCX com LPS, em concentrações que isoladamente não produzem efeito, induziu a ativação do NF- κ B (figura 6 B). Adicionalmente, o pré-tratamento com LPS-RS (antagonista de TLR4) preveniu a ativação do NF- κ B induzida por LPS e PCX (figura 6 C). Para confirmar que o PCX está guiando os macrófagos para um perfil mais inflamatório M1, MDMOs foram estimulados com PCX por 24 horas em seguida as células foram lavadas e reestimuladas com LPS ou PCX. Nessas condições as células previamente expostas ao PCX produziram quantidades de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e CCL3/MIP-1 α) em nível superior comparado ao efeito do LPS e PCX em células *naive* (figura 7 A-C). É importante mencionar que o PCX nas concentrações utilizadas não induziu significativa apoptose ($\leq 10\%$ de MDMOs marcados com anexina V) ou reduziu a viabilidade celular analisada por MTT (figura 8 A-E). Estes resultados indicam que o PCX promove a polarização de macrófagos para o perfil M1 de maneira dependente da ativação de TLR4.

Figura 4. Paclitaxel (PCX) induz a polarização de macrófagos no sentido M1 via TLR4.



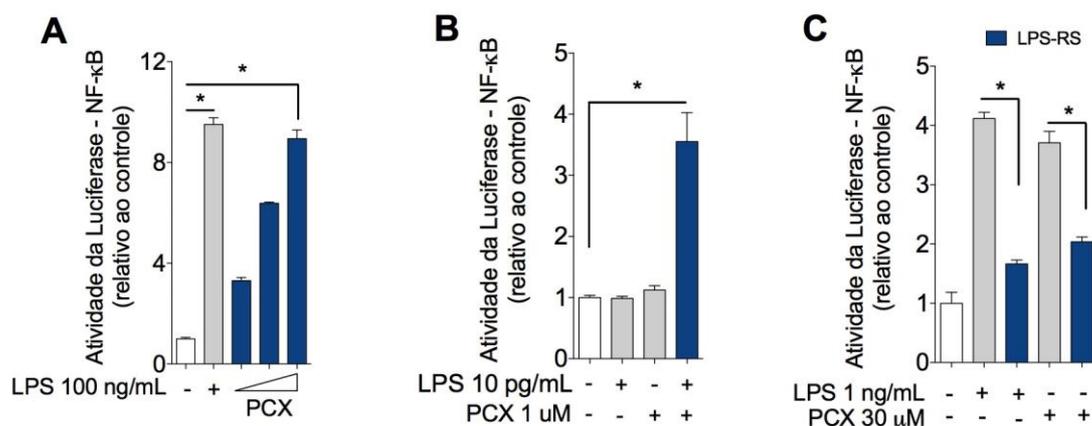
Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) foram estimulados com LPS (100 ng/mL) ou PCX (10, 30 e 100 μ M) por 48 horas, células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo (denominado macrófago M0). No sobrenadante da cultura foi quantificada a concentração de marcadores característicos de macrófagos M1: (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-12p40 e (D) nitrito. Em outro experimento MDMOs de camundongos C57BL/6 WT ou TLR4^{-/-} foram estimulados com LPS (100 ng/mL) ou PCX (30 μ M) por 48 horas e os seguintes marcadores de macrófagos M1 foram quantificados: (E) TNF- α , (F) IL-6, (G) IL-12p40, e (H) expressão de iNOS. Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo (macrófago M0). Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média \pm desvio padrão, * P <0,05.

Figura 5. Paclitaxel (PCX) induz a polarização de macrófagos para o perfil M1 em células deficientes de TLR2.



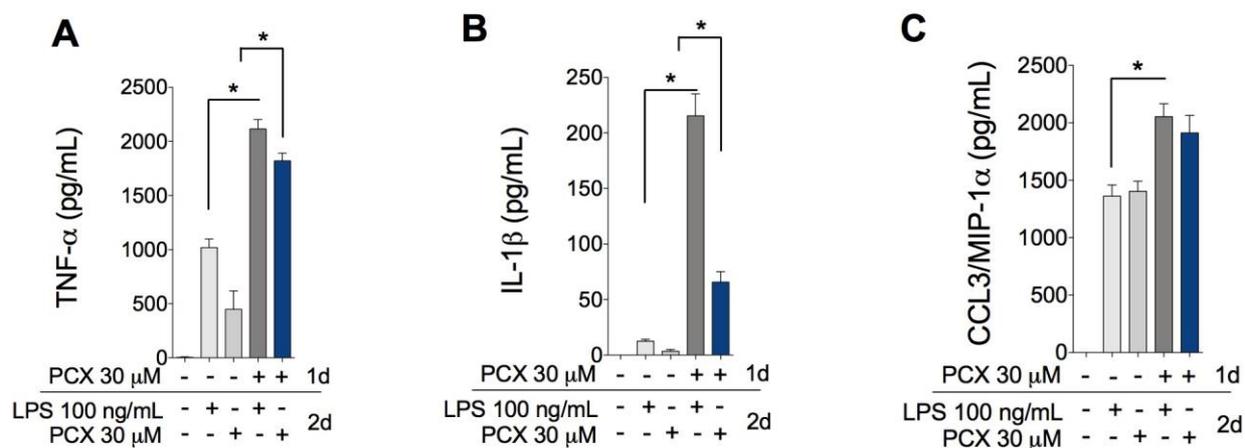
Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) de camundongos WT ou TLR2 *knockout* foram estimulados com LPS (100 ng/mL) ou PCX 30 μ M por 48 horas. No sobrenadante da cultura foi quantificada a concentração de marcadores característicos de macrófagos M1: (A) TNF- α , (B) IL-6 e (C) nitrito. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média \pm desvio padrão, * P <0,05.

Figura 6. Paclitaxel (PCX) induz a ativação do NF- κ B via TLR4.



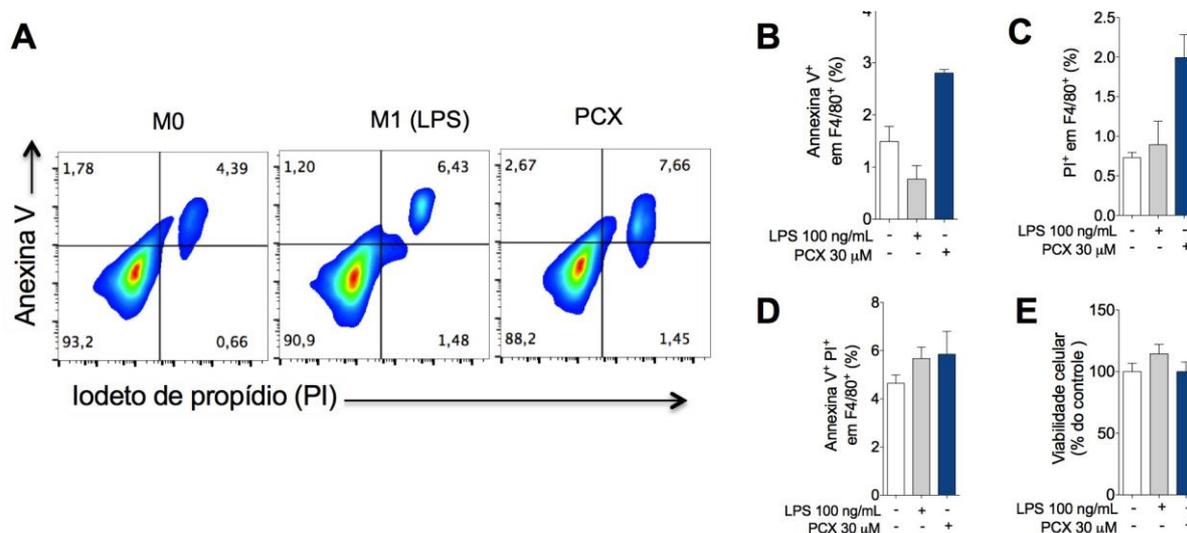
(A) Macrófagos RAW 264.7 que expressam de forma estável o gene da luciferase no sítio promotor responsivo ao NF- κ B (pNF- κ B-Luc) foram estimulados durante 6 horas com LPS (100 ng/mL) ou PCX (10, 30, 100 μ M). (B) Os macrófagos RAW 264.7 foram estimuladas com baixas concentrações de LPS (10 pg/mL), PCX (1 μ M) ou LPS (10 pg/mL) associado ao PCX (1 μ M). (C) Macrófagos RAW 264.7 foram incubados com LPS-RS (antagonista de TLR4 na concentração de 500 ng/mL) durante 30 min e depois estimulados com LPS (1 ng/mL) ou PCX (30 mM) por mais 6 horas; Macrófagos RAW 264.7 não estimulados foram utilizados como controle negativo. Os resultados são expressos como atividade da luciferase relativa ao controle negativo (*fold*) e representam uma medida indireta da atividade do NF- κ B. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média \pm desvio padrão, * P <0,05.

Figura 7. Paclitaxel (PCX) potencializa a resposta a um segundo estímulo inflamatório.



Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) foram estimulados com PCX por 24 horas, as células foram então lavadas e reestimuladas com LPS ou PCX por mais 24 horas, MDMOs não estimulados foram utilizados como controle negativo (macrófagos M0). No sobrenadante da cultura foi quantificada a concentração de citocinas pró-inflamatórias: (A) TNF- α , (B) IL-1 β e (C) CCL3/MIP-1 α . Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média \pm desvio padrão, * P <0,05.

Figura 8. Macrófagos são resistentes ao efeito citotóxico do paclitaxel (PCX).

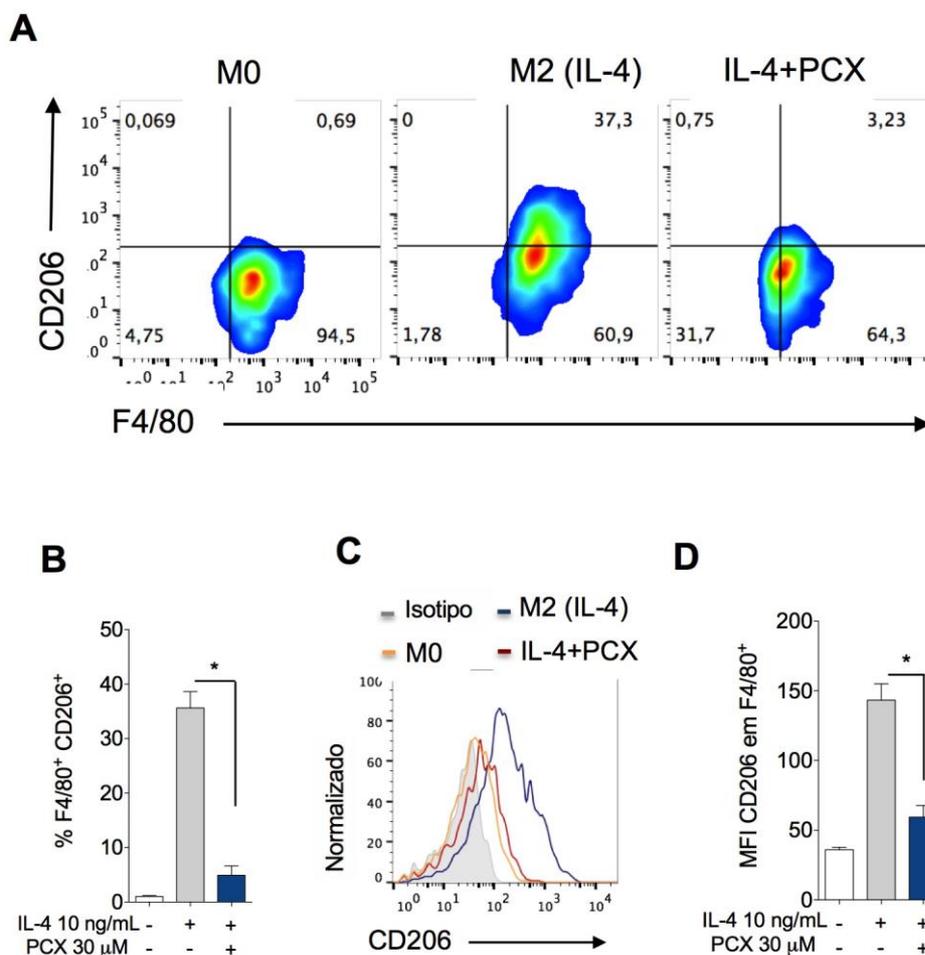


Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) foram incubados com meio RPMI (M0, não estimulado), LPS (100 ng/mL – macrófago M1) ou PCX (30 μM). Após 48 h as células foram coletadas e submetidas à dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio (PI) em seguida a viabilidade celular foi analisada por citometria de fluxo. (A) Painéis representativos demonstram às mudanças no percentual de células viáveis nos diferentes grupos analisados por citometria de fluxo. A quantificação dos resultados do painel A são apresentados em: (B) referente as células Anexina V⁺/PI⁻ (quadrante superior esquerdo) que indica células em estágio inicial de apoptose; (C) referente as células Anexina V⁻/PI⁺ (quadrante inferior direito) que indica morte celular por necrose; (D) referente as células Anexina V⁺/PI⁺ (ao quadrante superior direito) indica a presença de células em estágio avançado de apoptose. (E) Teste MTT para comparação da viabilidade celular (os resultados são apresentados de forma relativa as células não tratadas normalizadas para 100%). Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média ± desvio padrão, **P*<0,05.

5.2 Paclitaxel (PCX) impede a polarização de macrófagos para o sentido M2 induzida por IL-4

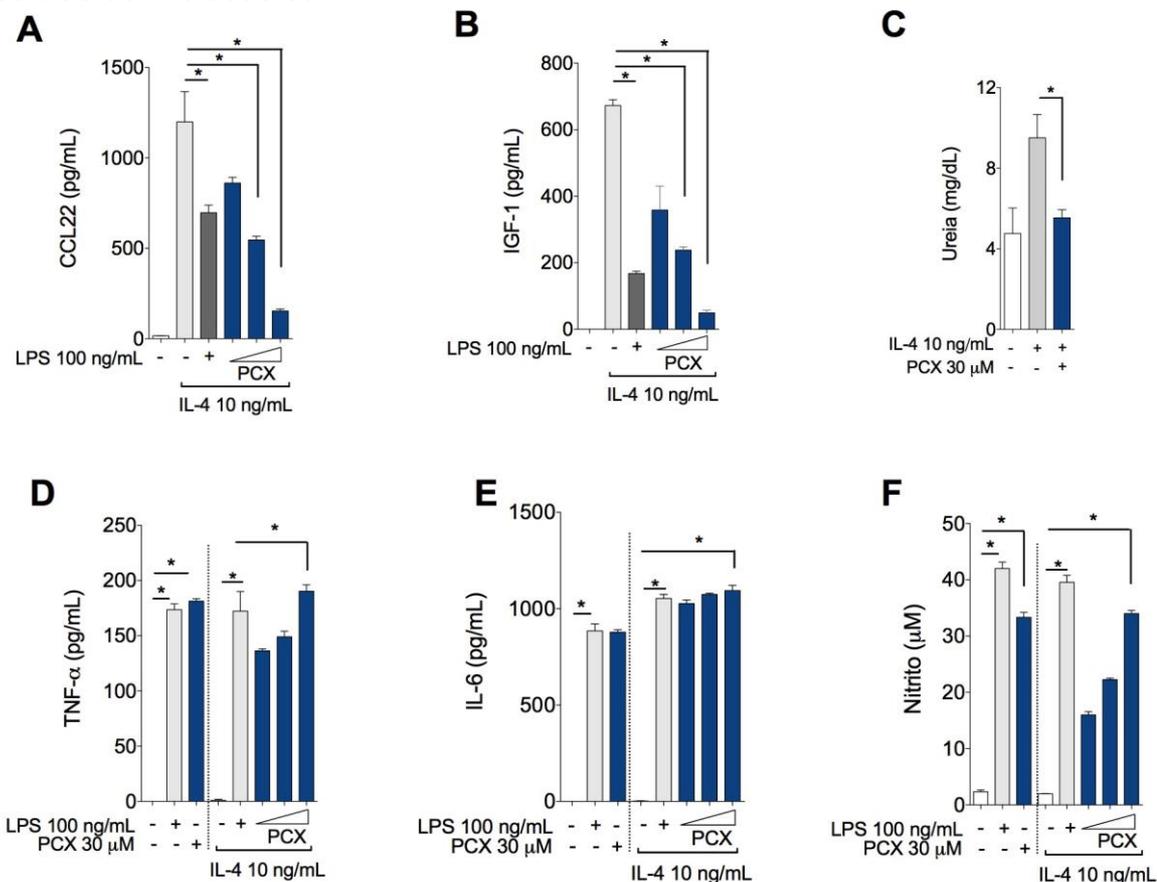
Considerando que o PCX efetivamente polarizou macrófagos para o perfil M1, foi avaliado se o tratamento com PCX poderia redirecionar a polarização de macrófagos M2 no sentido M1. Para isso, a resposta de macrófagos M2 polarizados com IL-4 foi comparada com a de macrófagos concomitantemente estimulados com IL-4 e PCX. O tratamento com PCX, na presença da IL-4, bloqueou a expressão e produção de marcadores M2 (CD206, IGF-1, CCL-22 e Uréia) (figura 9 A-D e figura 10 A-C) e aumentou a produção de marcadores M1 (TNF- α , IL-6 e Nitrito) em níveis semelhantes ao controle LPS (figura 10 D-F). Notadamente, constatou-se que os macrófagos estimulados apenas com PCX apresentaram produção de citocinas inflamatórias em níveis similares as células tratadas com IL-4 e PCX concomitantemente (figura 10 D-F). Em conjunto esses achados sugerem que o PCX pode bloquear a polarização de macrófagos no sentido M2 induzida por IL-4.

Figura 9. Paclitaxel (PCX) bloqueia a polarização de macrófagos M2 induzida por IL-4.



Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) foram estimulados apenas com IL-4 (10 ng/mL) para induzir a polarização de macrófagos para o perfil M2 ou foram concomitantemente estimulados com IL-4 (10 ng/mL) mais PCX (30 μM), células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo (macrófago M0). (A) Painéis representativos demonstram às mudanças no percentual de células F4/80⁺CD206⁺ analisado por citometria de fluxo. (B) Quantificação dos resultados apresentadas no painel A. (C) Histograma representativo comparando o MFI do CD206 em células F4/80⁺ estimuladas com IL-4 (linha azul) ou IL-4 mais PCX (linha vermelha). (D) Quantificação dos resultados apresentados no painel C. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média ± desvio padrão, * $P < 0,05$.

Figura 10. Paclitaxel (PCX) induz polarização de macrófagos para o perfil M1 em células estimuladas com IL-4.

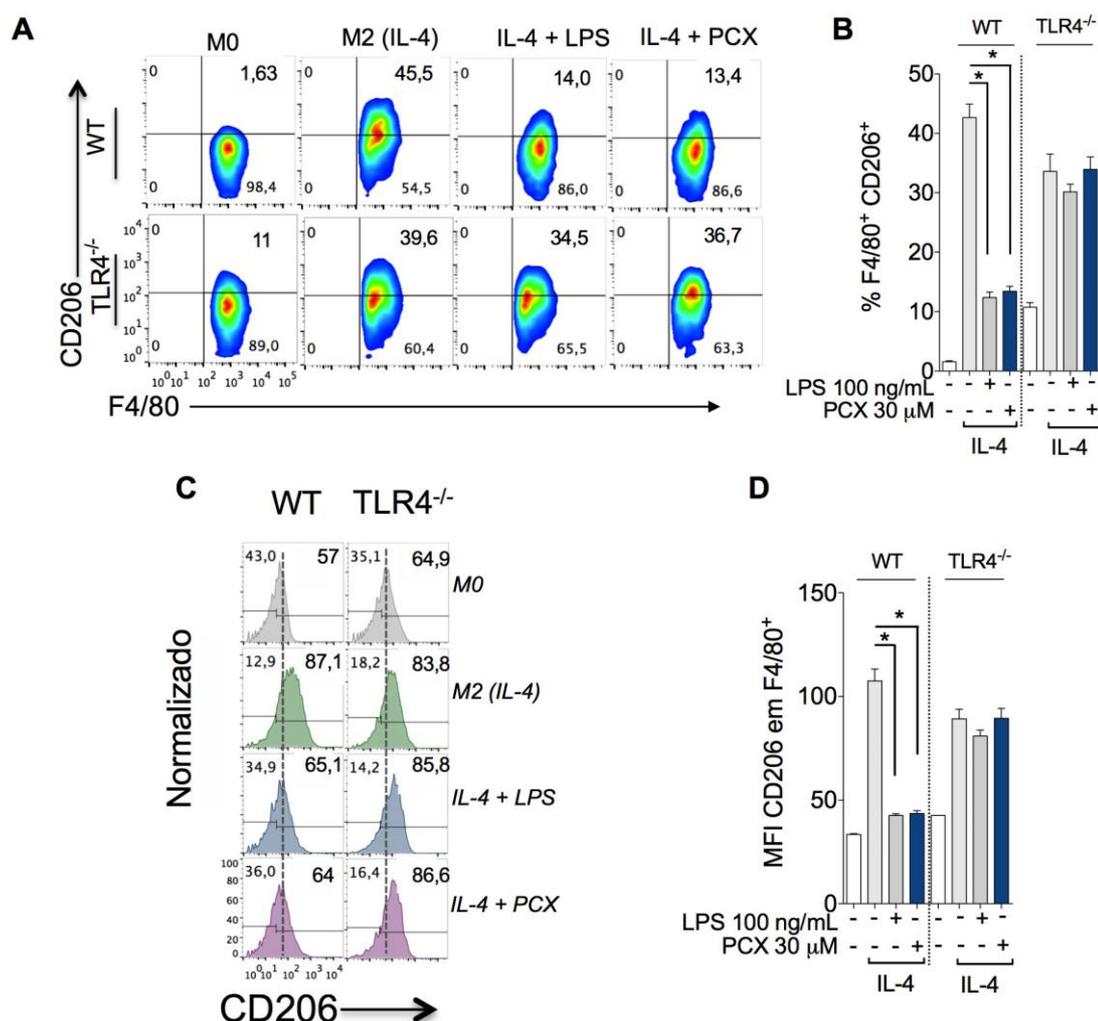


Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) foram estimuladas com IL-4 (10 ng/mL) para induzir polarização de macrófagos para o perfil M2 ou foram concomitantemente estimulados com IL-4 (10 ng/mL) mais LPS (100 ng/mL) ou PCX (10, 30, 100 µM). Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo (macrófago M0). No sobrenadante da cultura foi quantificado a concentração de marcadores característicos de macrófagos M2: (A) CCL22, (B) IGF-1, (C) Ureia. Em seguida MDMOs foram estimulados apenas com LPS (100 ng/mL), PCX (30 µM) ou com IL-4 (10 ng/mL) ou foram concomitantemente estimulados com IL-4 (10 ng/mL) mais LPS (100 ng/mL) ou PCX (10, 30, 100 µM). Células não estimuladas atuaram como controle negativo (macrófago M0). No sobrenadante da cultura foi quantificado a concentração de marcadores característicos de macrófagos M1: (D) TNF-α, (E) IL-6, (C) Nitrito. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média ± desvio padrão, * $P < 0,05$.

5.3 Paclitaxel (PCX) via TLR4/NF- κ B bloqueia a polarização de macrófagos para o sentido M2

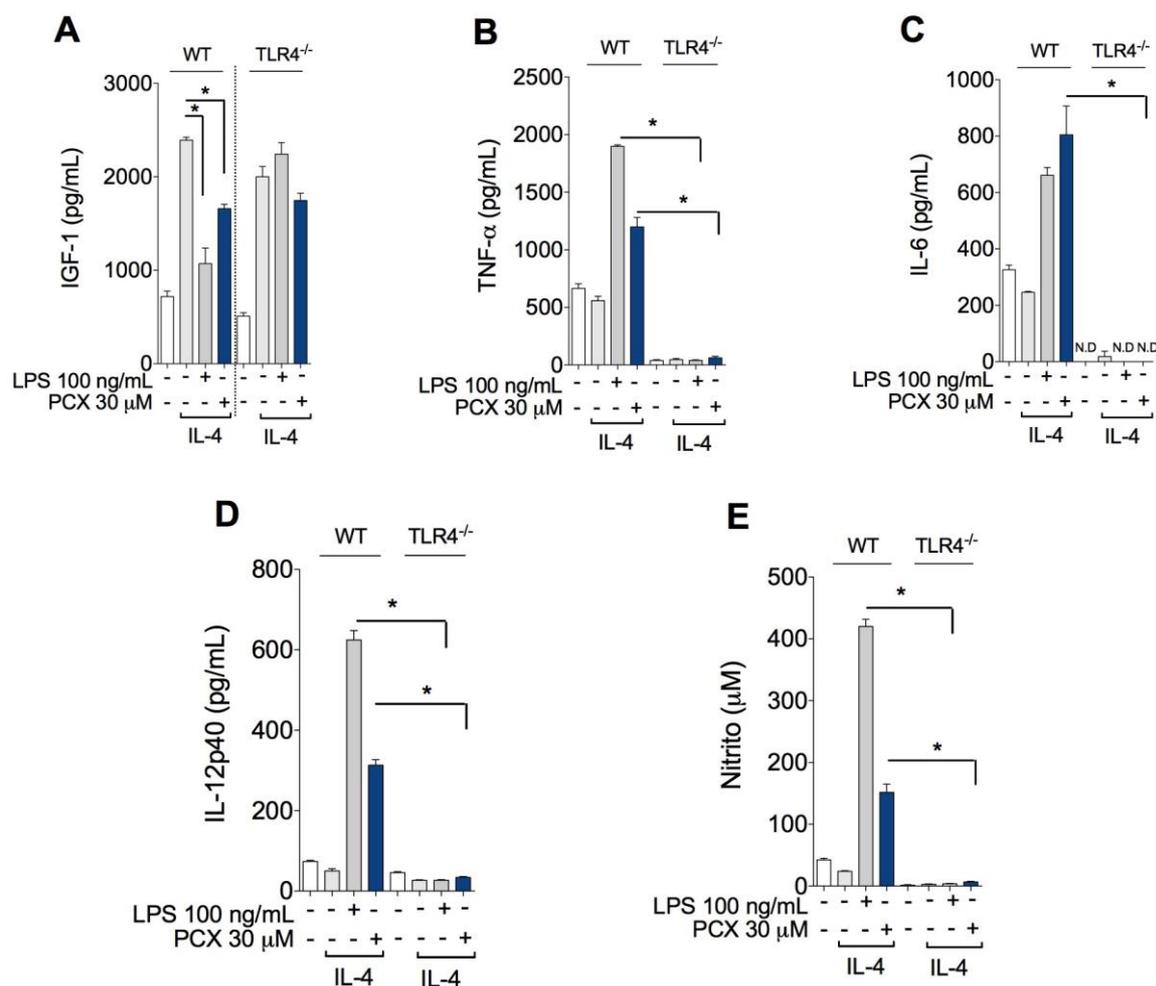
Em seguida, foi avaliado se o bloqueio da polarização de macrófagos M2 induzida pelo PCX seria dependente da ativação de receptores TLR4. De acordo com os dados anteriormente apresentados, foi constatado que macrófagos *knockout* para o receptor TLR4 estimulados com IL-4 mais PCX concomitantemente, preservam a expressão de marcadores M2 (CD206 e IGF-1) e não apresentam aumento na produção de marcadores M1 (TNF- α , IL-6, IL-12 e Nitrito), diferente do observado nos controles realizados em MDMOs provenientes de animais WT (figura 11 A-D e figura 12 A-E). Sabe-se que a ativação da STAT6 é essencial para a IL-4 induzir a polarização de macrófagos no sentido M2, enquanto que a ativação do fator de transcrição NF- κ B, induzida por agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs), está associada à polarização de macrófagos no sentido M1 (WANG; LIANG; ZEN, 2014). Em vista do efeito do PCX sobre os receptores TLR4 buscou-se investigar as mudanças dinâmicas que ocorrem nos fatores de transcrição STAT6 e NF- κ B durante o estímulo concomitante de IL-4 e PCX. Inicialmente, foi observado que a IL-4 induz a fosforilação de STAT6 de maneira tempo dependente (figura 13). Contudo, o tratamento com PCX reduziu a fosforilação do STAT6 induzida por IL-4, enquanto paralelamente aumentou os níveis de expressão de P65 (unidade do NF- κ B) fosforilado (figura 13). Estes dados indicam que o PCX via TLR4/NF- κ B pode bloquear a polarização para M2 mediada pela sinalização IL-4/STAT6.

Figura 11. Paclitaxel (PCX) bloqueia a polarização de macrófagos M2 induzida por IL-4 de maneira dependente de TLR4



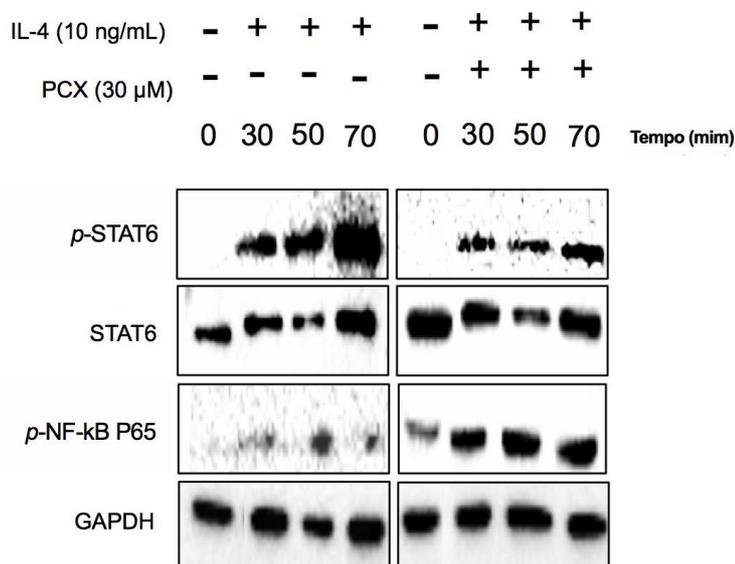
Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) de camundongos WT ou TLR4^{-/-} foram estimulados apenas com IL-4 (10 ng/mL, macrófago M2) ou foram concomitantemente estimuladas com IL-4 (10 ng/mL) mais LPS (100 ng/mL) ou PCX (30 μM). Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo (macrófago M0). (A) Painéis representativos demonstram às mudanças no percentual de células F4/80⁺CD206⁺ analisados por citometria de fluxo. (B) Quantificação dos resultados apresentados no painel A. (C) Histograma representativo comparando o MFI do CD206 em células F4/80⁺ incubadas com meio (cinza), IL-4 (verde), IL-4 mais LPS (azul) ou IL-4 mais PCX (rosa). (D) Quantificação dos resultados apresentados no painel C. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média ± desvio padrão, **P*<0,05.

Figura 12. TLR4 é essencial para o paclitaxel (PCX) bloquear a polarização de macrófagos para o sentido M2 e guiar as células no sentido M1.



Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) de camundongos WT ou TLR4 *knockout* foram estimulados apenas com IL-4 (10 ng/mL, macrófago M2) ou foram concomitantemente estimuladas com IL-4 (10 ng/mL) mais LPS (100 ng/mL) ou PCX (30 μM). Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo (macrófago M0). No sobrenadante da cultura foi quantificado a concentração de marcadores característicos de macrófagos M2 e M1: Marcadores M2 - (A) IGF-1; Marcadores M1 - (B) TNF-α, (C) IL-6, (D) IL-12p40 e (E) nitrito. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média ± desvio padrão, * $P < 0,05$.

Figura 13. Paclitaxel (PCX) bloqueia a polarização para M2 induzida por IL-4/STAT6.

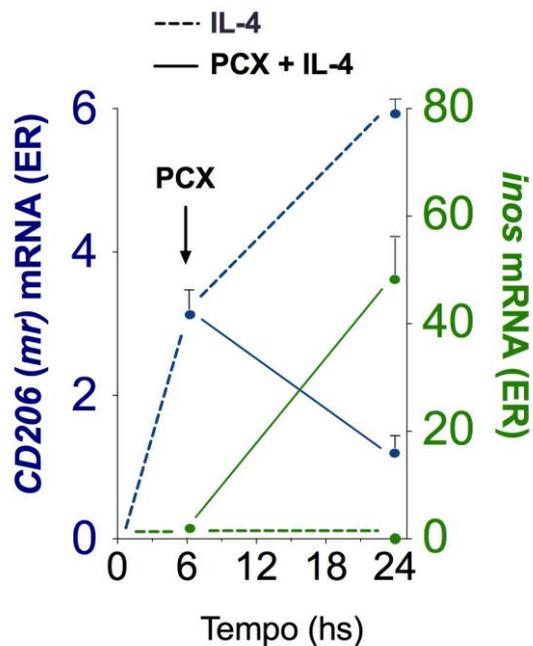


Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) foram estimulados apenas com IL-4 (10 ng/mL) para induzir polarização de macrófagos no sentido M2 ou foram estimulados com IL-4 (10 ng/mL) e após 10 min com PCX (30 μ M). Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo (macrófago M0). As amostras foram coletadas 0, 30, 50 e 70 min após o estímulo inicial e os seguintes marcadores foram medidos por western blot: STAT6 fosforilado (*p*-STAT6), STAT6 total e o NF-kB P65 fosforilado (*p*-NF-kB P65).

5.4 Paclitaxel (PCX) reprograma macrófagos M2 para o sentido M1

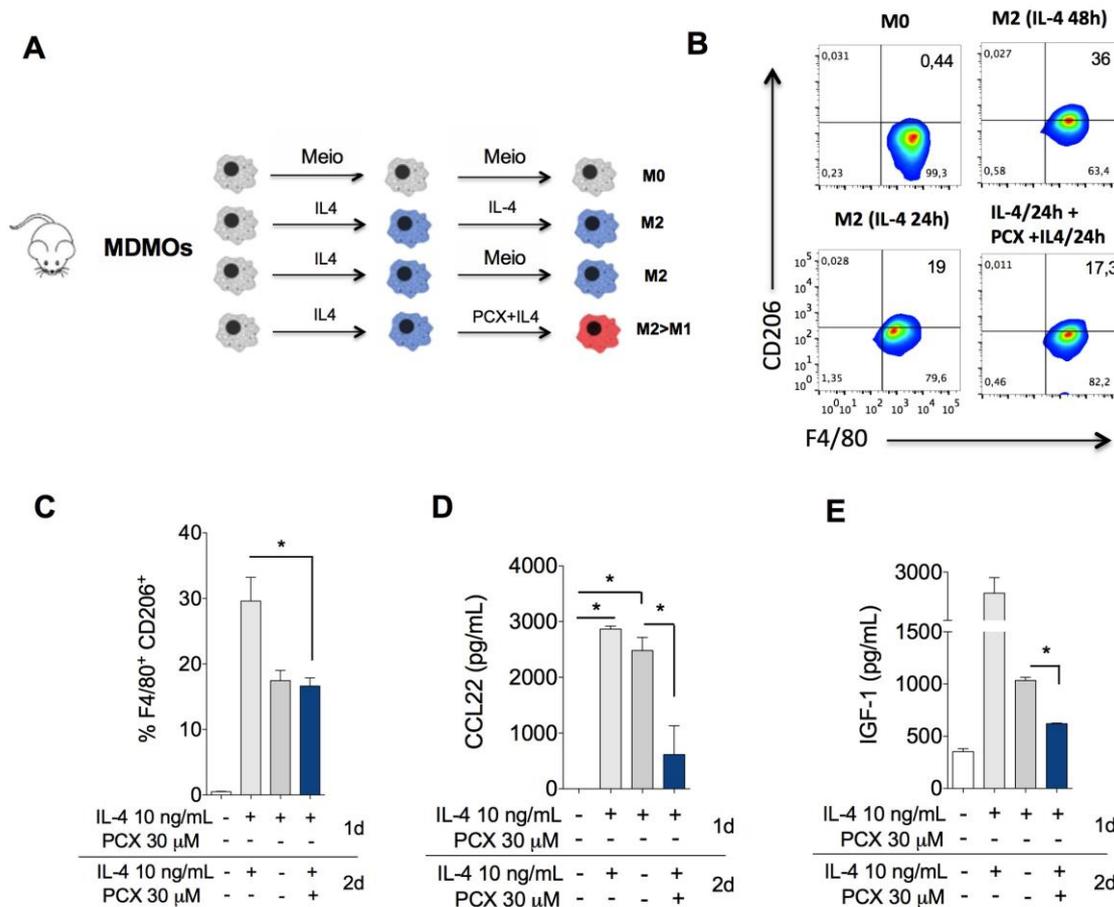
Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que o LPS pode reprogramar macrófagos M2 para o perfil M1 (AUTHIER et al., 2008; MAJOR; FLETCHER; HAMILTON, 2002; STOUT et al., 2005). Nesse sentido, buscou-se avaliar se o PCX poderia “reprogramar” macrófagos M2 para o fenótipo ativo M1. Para isso MDMOs foram polarizados para o perfil M2 com IL-4 e então estimulados com PCX. Nos macrófagos estimulados com IL-4 foi detectado aumento progressivo na expressão de *cd206* (marcador M2) às 6 e 24 horas após o estímulo. Nenhuma diferença foi detectada na expressão de *inos* (marcador M1) nesse grupo (figura 14, linha tracejada). Contudo, quando o PCX foi adicionado 6 horas após o estímulo com IL-4 (figura 14, seta) a expressão de *cd206* foi reduzida enquanto a expressão da *inos* foi estimulada (figura 14, linha compacta). Em seguida, foi testado o efeito do PCX em macrófagos completamente diferenciados para o perfil M2. Para isso, MDMOs foram estimulados com IL-4 por 24 horas, as células foram então lavadas e reestimuladas apenas com IL-4 (como controle) ou com IL-4 mais PCX por mais 24 horas (figura 15 A). Nessas condições pode-se observar que macrófagos M2 subsequentemente estimulados com PCX apresentam uma redução na expressão de marcadores M2 (CD206, CCL22 e IGF-1) e exibem aumentada produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-12, CXCL1/KC) e de óxido nítrico mediada pela iNOS mensurado indiretamente na forma de nitrito (figura 15 B-E e figura 16 A-E). Estes achados demonstram que o PCX efetivamente pode reprogramar macrófagos M2 para o perfil M1.

Figura 14. Paclitaxel (PCX) reprograma macrófagos M2 para o perfil M1.



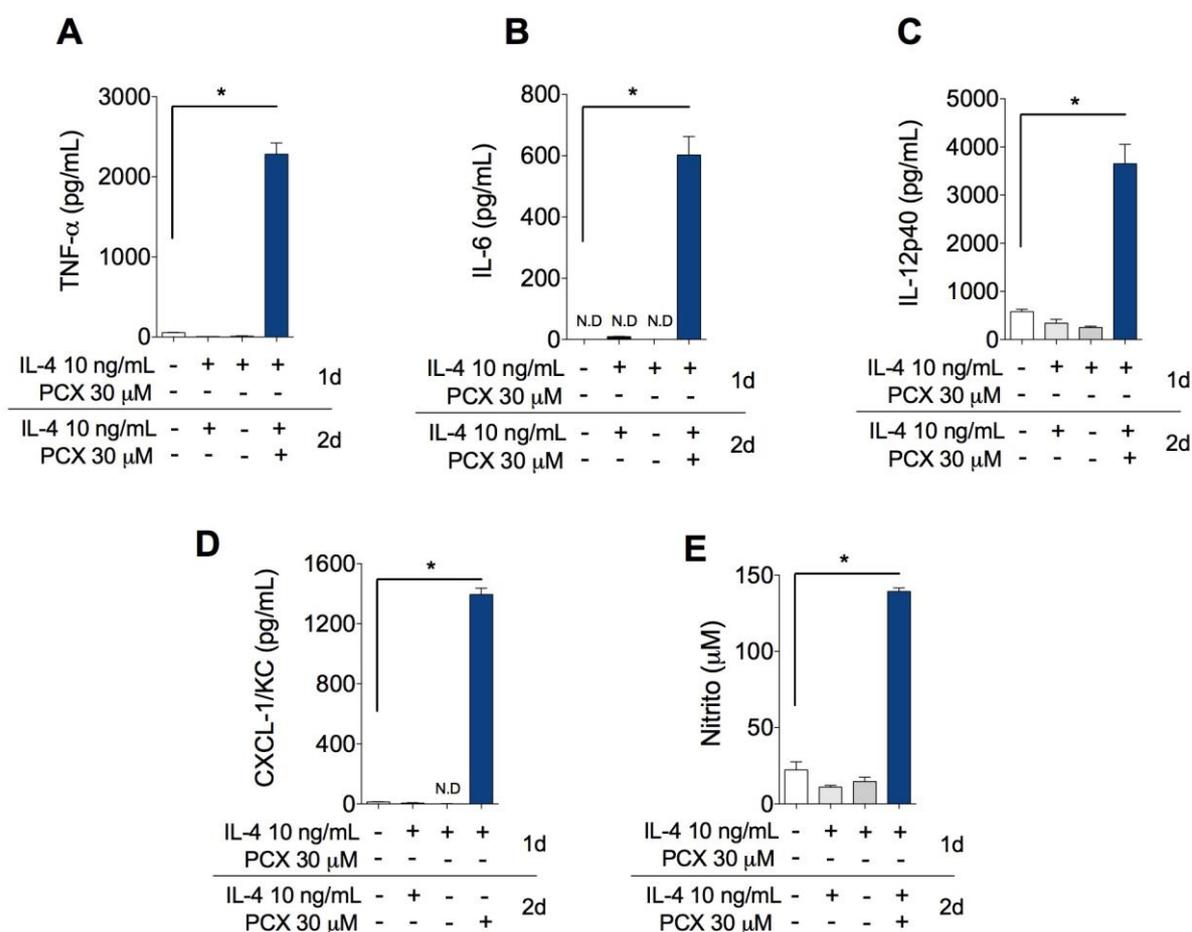
Para estudar o efeito do PCX na plasticidade dos macrófagos, macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) foram polarizados para um perfil M2 com IL-4 (10 ng/mL) por 24 horas (linha tracejada). Em outro grupo, após 6 horas de incubação com IL-4 (10 ng/mL), o PCX (30uM) foi adicionado à cultura (seta) que foi mantida por mais 18 horas (linha compacta). Os níveis de mRNA *cd206* (marcador M2) e *inos* (marcador M1) foram quantificados por RT-PCR às 6 e 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média \pm desvio padrão, * $P < 0,05$.

Figura 15. Paclitaxel (PCX) reduz a expressão de marcadores M2 em macrófagos previamente polarizados para perfil M2 com IL-4.



(A) Representação esquemática do desenho experimental: Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) foram polarizados para o perfil M2 com IL-4 (10 ng/mL) por 24 horas. As células foram então lavadas e cultivadas com apenas com IL-4 (10 ng/mL) ou meio (controle) ou foram concomitantemente estimuladas com PCX mais IL-4 por mais 24 horas. Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. (B) Painéis representativos demonstram às mudanças no percentual de células F4/80⁺CD206⁺ analisados por citometria de fluxo. (C) Quantificação dos resultados apresentados no painel B. No sobrenadante da cultura foi quantificado a concentração de marcadores característicos de macrófagos M2: (D) CCL22 e (E) IGF-1. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média \pm desvio padrão, * $P < 0,05$.

Figura 16. Paclitaxel (PCX) aumenta a produção de marcadores M1 em macrófagos previamente polarizados para o fenótipo M2 com IL-4.

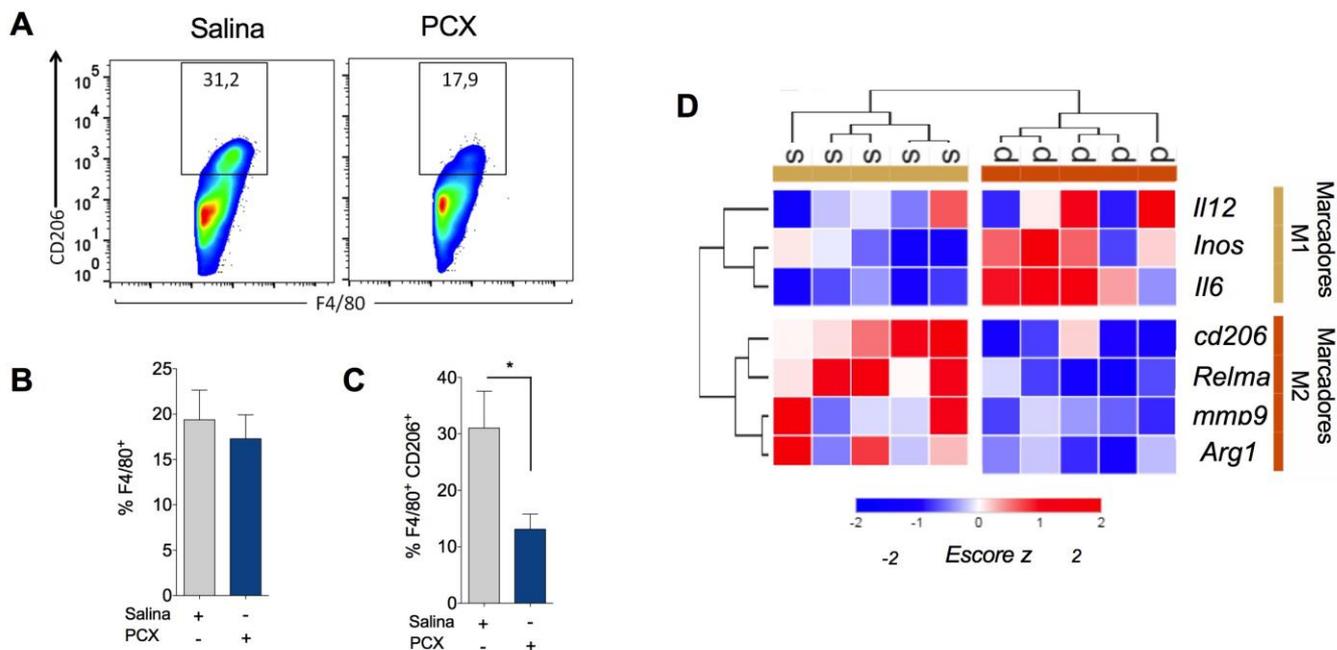


Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) foram polarizados para o perfil M2 com IL-4 (10 ng/mL) por 24 horas. As células foram então lavadas e cultivadas com apenas com IL-4 (10 ng/mL) ou meio (controle) ou foram concomitantemente estimuladas com PCX mais IL-4 por mais 24 horas. Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. No sobrenadante da cultura foi quantificada a concentração de marcadores característicos de macrófagos M1: (A) TNF- α , (B) IL -6, (C) IL-12p40, (E) CXCL1/KC e nitrito. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média \pm desvio padrão, * P <0,05.

5.5 Paclitaxel (PCX) reprograma o perfil dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) para o perfil M1

Em seguida, foi investigado se os efeitos do PCX sobre a plasticidade dos macrófagos obtidos *in vitro* eram reproduzíveis em condições *in vivo* no microambiente tumoral. Nesse sentido, camundongos portadores de câncer de mama (4T1) foram tratados com PCX ou salina e as populações de macrófagos M1 e M2 infiltradas no tumor foram analisadas. Pode-se constatar que o tratamento com PCX reduziu a percentagem de TAMs com perfil M2 (F4/80+CD206+) sem afetar a proporção de macrófagos no tumor (F4/80+) (figura 17 A-C). Além disso, a análise de expressão gênica de TAMs purificados do tumor revelou que o tratamento com PCX altera a assinatura do perfil M2 (*cd206*, *relmα*, *mmp9* and *arg1*) para o perfil antitumoral M1 (*Il12*, *inos* and *Il6*) (figura 17 D). Esses dados sugerem que o tratamento com PCX pode reverter o fenótipo supressor M2 de macrófagos infiltrados no tumor para o perfil M1.

Figura 17. Paclitaxel (PCX) reprograma macrófagos associados ao tumor (TAMs) do tipo M2 para o perfil M1.



Camundongos BALB/c portadores de tumor mama (4T1) foram tratados com salina ou PCX (10 mg/kg, i.p., a cada 8 h, foram realizadas o total de 3 aplicações). Os tumores foram processados e o perfil fenotípico dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) foi analisado por citometria de fluxo e qRT-PCR. (A) Painéis representativos demonstram às mudanças no percentual de TAMs F4/80⁺CD206⁺ no microambiente tumoral de acordo com o tratamento. (B) Porcentagem de TAMs (células F4/80⁺) na suspensão de células tumorais. (C) Quantificação dos resultados de apresentados no painel A. (D) O mapa de calor apresenta os resultados da análise de expressão gênica de marcadores M1 (*Il12*, *inos* e *IL6*) e M2 (*cd2016*, *Relma*, *mmp9* e *Arg1*) em TAMs isolados de tumores de camundongos tratados com salina (S) ou PCX (P) analisados por qRT-PCR, o vermelho escuro representa maior expressão, enquanto o azul menor expressão. Os genes apresentados foram hierarquicamente agrupados através da correlação de Pearson. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão, * $P < 0,05$.

5.6 Paclitaxel (PCX) promove regressão tumoral através da polarização de TAMs para perfil M1 via TLR4

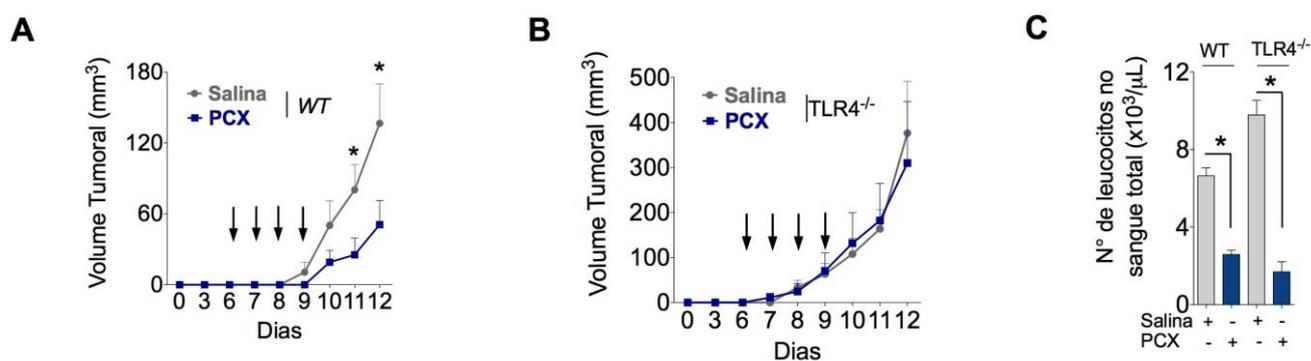
As evidências até aqui apresentadas suscitaram se o efeito imunomodulador do PCX sobre o fenótipo dos TAMs contribuiria para a sua eficácia terapêutica. O melanoma cutâneo é um tumor agressivo que apresenta usualmente resistência a quimioterapia antiproliferativa. No entanto, tem-se evidenciado que esse tumor seria mais sensível à imunoterapia (DAVAR; TARHINI; KIRKWOOD, 2013). Nesse sentido, para avaliar o potencial terapêutico do efeito imunomodulador do PCX, camundongos WT e TLR4 *knockout* portadores de melanoma (B16) foram tratados com PCX ou salina. O tratamento com PCX reduziu o crescimento tumoral nos animais WT, todavia seu efeito nos animais TLR4 *knockout* foi menos efetivo (figura 18 A-B). É importante destacar, que o efeito antiproliferativo do PCX nos animais TLR4 *knockout* e WT foi similar, uma vez que, a redução na contagem total de leucócitos após o tratamento com PCX foi igual em ambos os grupos (figura 18 C). Além disso, confirmando os achados anteriores, foi observado uma redução na percentagem de TAMs (CD45+CD11b+F4/80+) que expressão CD206 (marcador M2). No entanto, esse efeito não foi observado nos animais TLR4 *knockout* (figura 19 A-D) sugerindo que o mecanismo de ação imune do PCX envolve a polarização de TAMs via TLR4. Macrófagos infiltrados no tumor são principalmente oriundos de monócitos circulantes (CD45+CD11b+Ly6C+) que diferenciam-se a macrófagos no microambiente tumoral e passam a expressar F4/80 e MHCII (BRONTE; MURRAY, 2015). Assim sendo, nós investigamos o efeito do PCX nos subtipos imaturos/maduros de macrófagos infiltrados no tumor. Inicialmente, foi observado que o tratamento com PCX aumentou a percentagem de leucócitos (CD45+) e

células mielóides no tumor (CD45+CD11b+) (figura 20 A-B). O infiltrado de células mielóides foi primariamente composto de TAMs maduros (MHCII+F4/80+Ly6C⁻), com uma pequena quantidade de TAMs imaturos (MHCII+F4/80+Ly6C⁺) e monócitos inflamatórios (MHC+F4/80+Ly6C⁺). Embora o tratamento tenha aumentado a porcentagem de monócitos, no tempo avaliado, essas células não expressaram marcadores de diferenciação como MHCII ou F4/80 (figura 20 C-G). Em seguida, para caracterizar o estado de polarização dessas células foi avaliada a expressão do CD206 (marcador M2). Foi constatado que a maior parte das células mielóides (CD45+CD11b+) que expressam CD206 são TAMs maduros (CD11b+F4/80+Ly6C⁻) (figura 21 A-C). Ressalta-se, que o tratamento com PCX reduziu a expressão de CD206 e aumentou MHCII principalmente nos TAMs maduros (CD11b+F4/80+Ly6C⁻) comparado ao controle (figura 21 D).

Os resultados apresentados até aqui sugerem que parte do efeito terapêutico do PCX deve-se à reprogramação do fenótipo supressor de TAMs maduros infiltrados no tumor via TLR4. Para confirmar essa hipótese foi criado um animal com a deleção condicional do gene *Tlr4* especificamente nas células mielóides (ex. Macrófagos; LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl}) (figura 22 A-B). Inicialmente, buscou-se comprovar a deleção do TLR4 nas células mielóides. Para isso, MDMOs de camundongos LysM-Cre^{+/-} e LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl} foram estimulados com LPS ou PCX e os níveis de citocinas inflamatórias foram dosadas no sobrenadante. De fato, os MDMOs dos camundongos LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl} exibiram níveis reduzidos de TNF- α e IL-6 no sobrenadante da cultura em comparação com LysM-Cre^{+/-} (figura 22 C-D). Em seguida, corroborando com a hipótese inicial do presente estudo, constatamos que nos animais LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl} portadores de melanoma o efeito do PCX foi significativamente menor quando comparado ao controle (figura 23 A-B). Em

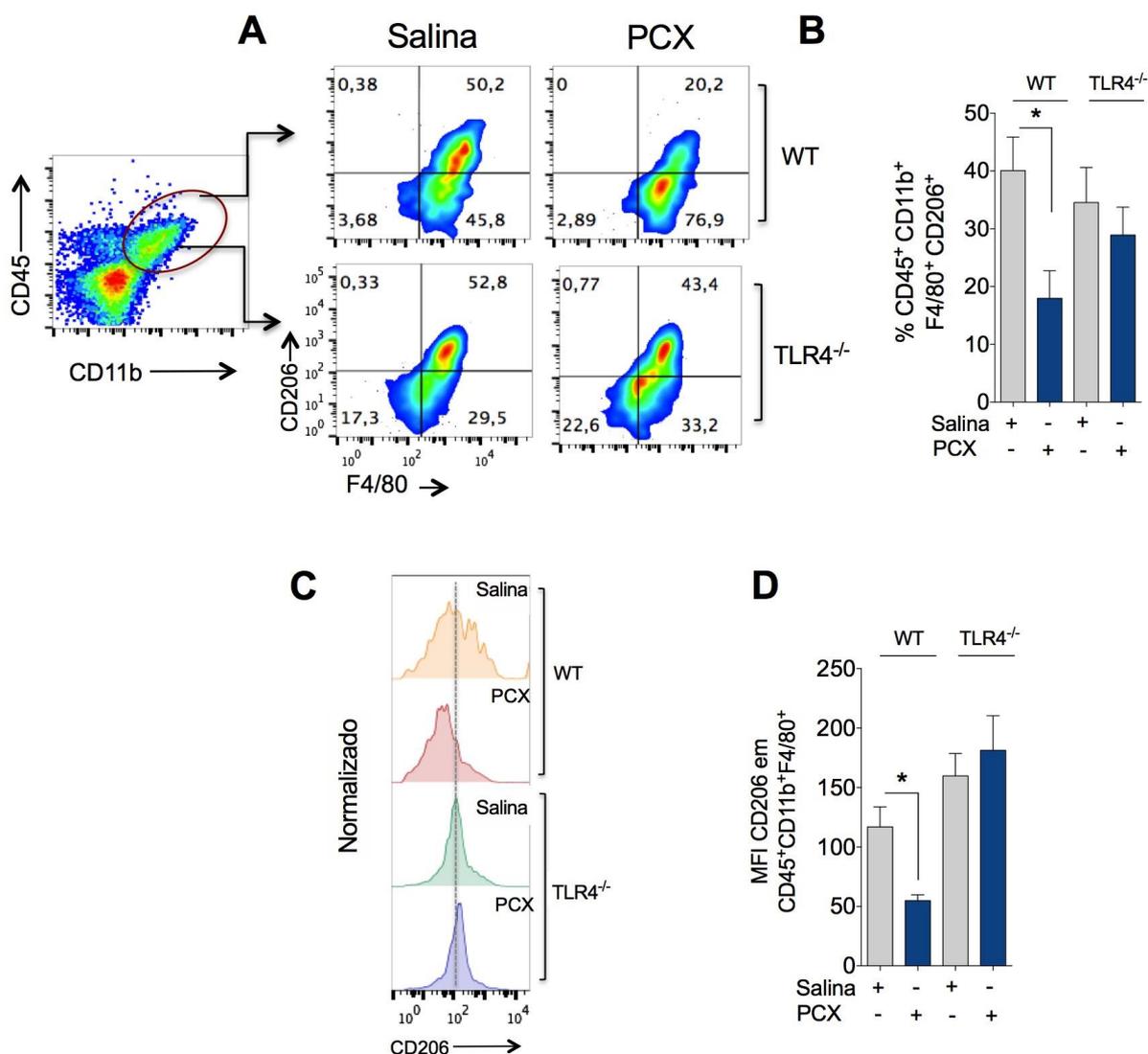
conjunto, esses dados sugerem que o PCX modula a resposta imune no microambiente tumoral via ativação de TLR4 guiando diretamente TAMs para um perfil menos imunotolerante, e esse efeito pode contribuir para a eficácia terapêutica do PCX.

Figura 18. TLR4 contribui para o efeito antitumoral do paclitaxel (PCX) através de um mecanismo independente de sua ação antiproliferativa.



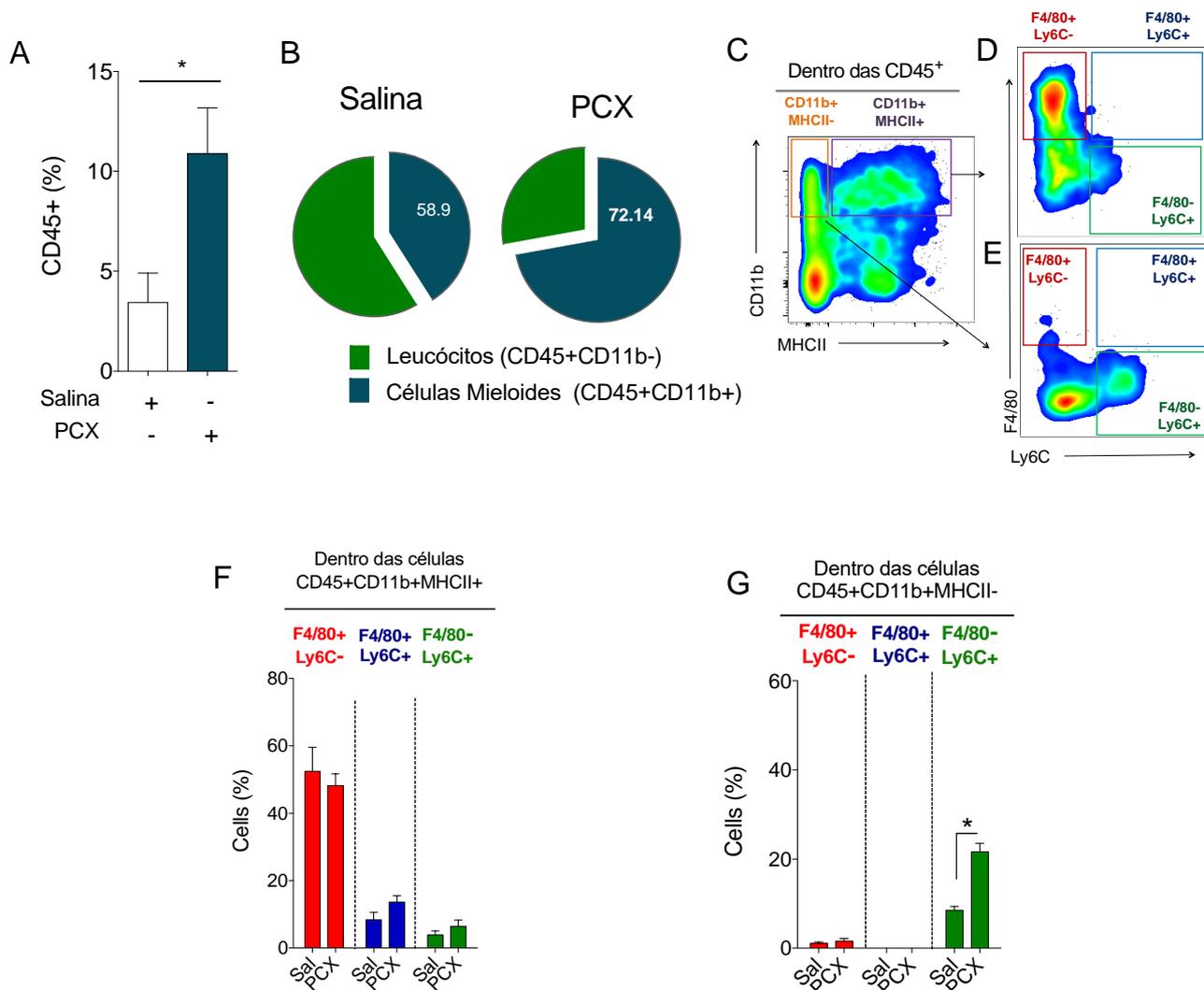
Camundongos C57BL/6 (WT e TLR4^{-/-}) portando melanoma (B16) foram submetidos aos tratamentos com salina ou PCX (10 mg/kg, i.p.). (A-B) Curvas de crescimento tumoral, as setas indicam os dias em que foram administrados o PCX ou salina. (C) contagem de total de leucócitos no sangue de camundongos WT e TLR4^{-/-} tratados com salina ou PCX. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão, * $P < 0,05$.

Figura 19. TLR4 é essencial para o paclitaxel (PCX) polarizar macrófagos associados ao tumor (TAMs) com perfil M2 para o perfil M1.



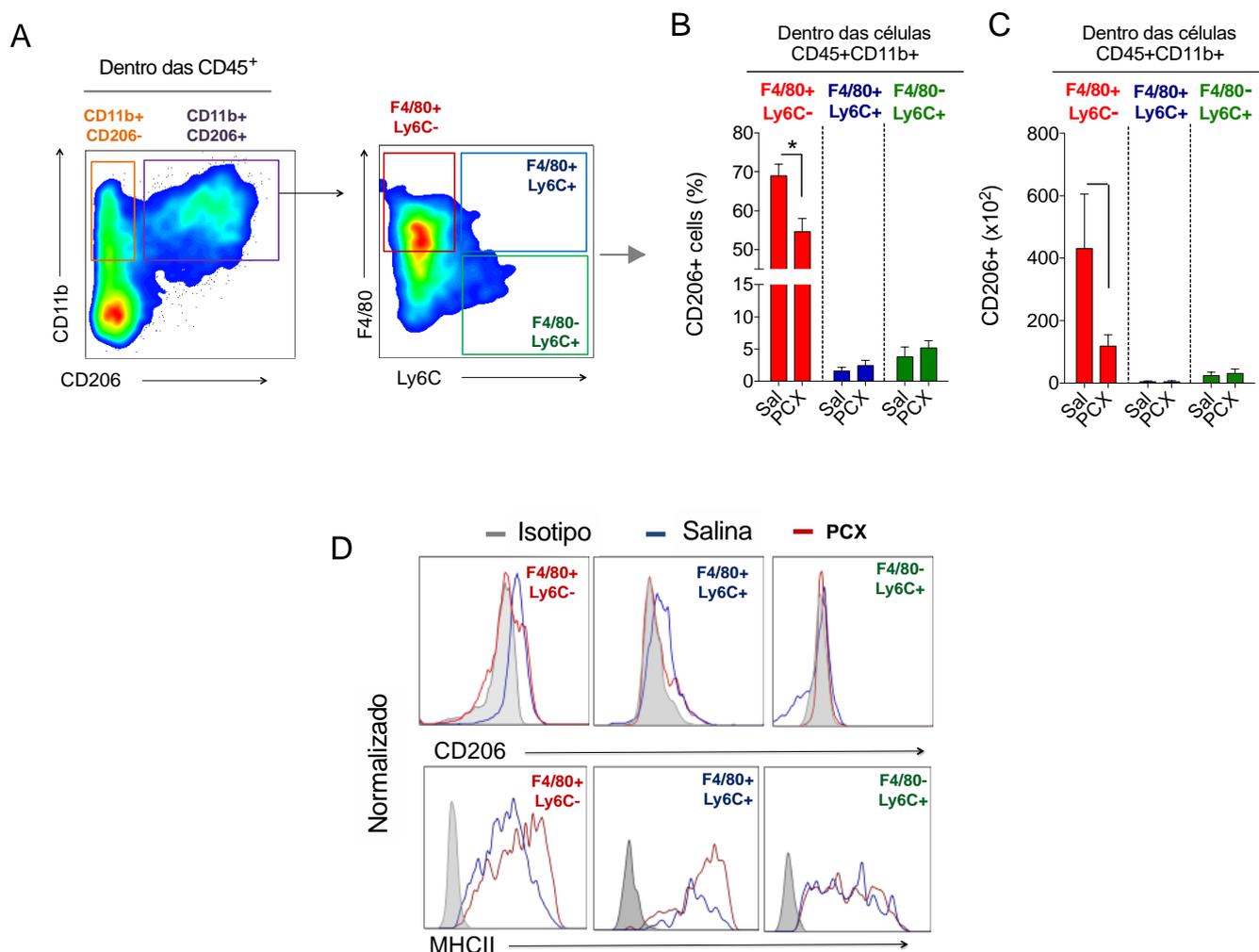
Camundongos C57BL/6 (WT e TLR4^{-/-}) portadores de melanoma (B16) foram tratados com salina ou PCX (10mg/kg, i.p. 3x). Os tumores foram processados e o perfil fenotípico dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) foi analisado por citometria de fluxo: (A) Painéis representativos demonstram às mudanças no porcentual de TAMs CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺CD206⁺ de acordo com o tratamento. (B) Quantificação dos resultados apresentados no painel A. (C) Histograma representativo comparando o MFI do CD206 em TAMs (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺) dos tumores de camundongos WT e TLR4^{-/-} tratados com salina ou PCX. (D) Quantificação dos resultados apresentados no painel C. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão, * $P < 0,05$.

Figura 20. Paclitaxel (PCX) aumenta o infiltrado de células mielóides no tumor (PCX).



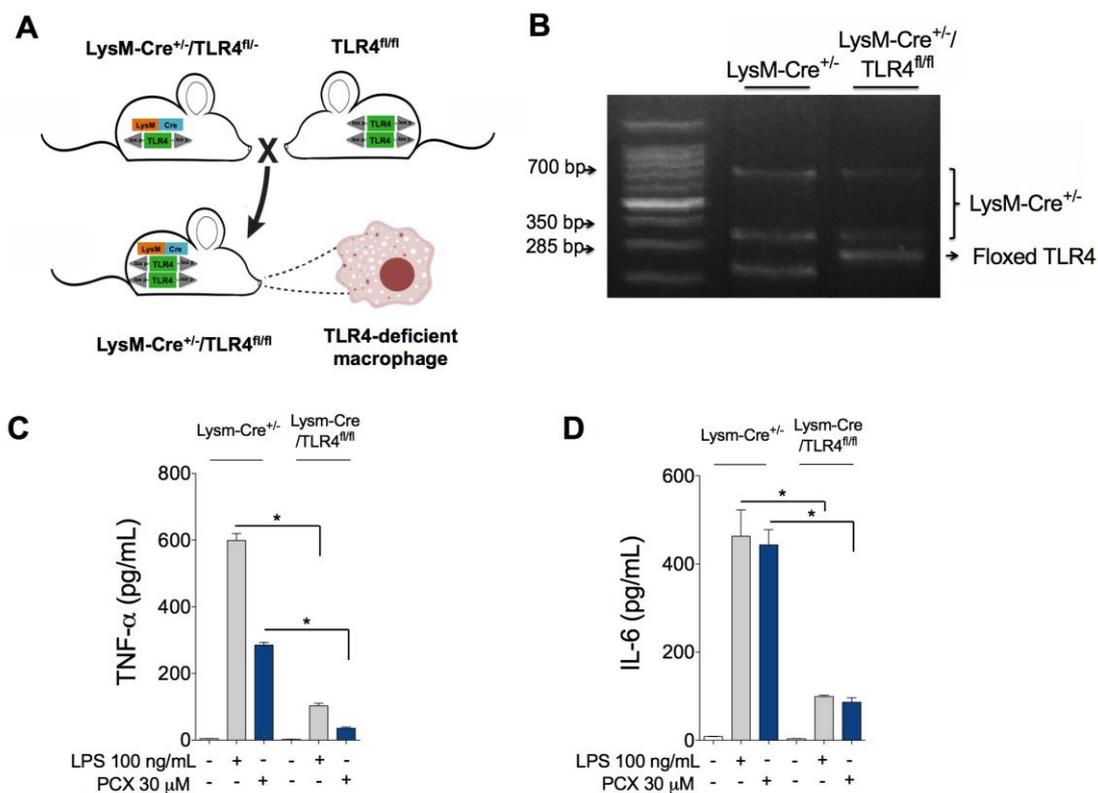
Camundongos com melanoma (B16) foram tratados com solução salina ou PCX (10 mg/kg, i.p., 3x). Os tumores inteiros foram processados para posterior análise das subpopulações de células mielóides por citometria de fluxo. (A-B) Análise de linfócitos infiltrados no tumor (CD45⁺) e células mielóides (CD11b⁺). (C-E) Estratégia para identificação dos seguintes subtipos de células mielóides: TAMs maduros (CD11b⁺MHCII⁺F4/80⁺Ly6C⁻), TAMs imaturos (CD11b⁺MHCII⁺F4/80⁺Ly6C⁺), monócitos inflamatórios (CD11b⁺MHCII⁺F4/80⁻Ly6C⁺) e monócitos (CD11b⁺MHCII⁻F4/80⁻Ly6C⁺). (F) Quantificação dos resultados de acordo com a estratégia apresentada no painel D. (G) Quantificação dos resultados de acordo com a estratégia apresentada no painel E. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão, * $P < 0,05$.

Figura 21. Paclitaxel (PCX) reduz a expressão do CD206 especificamente em TAMs maduros.



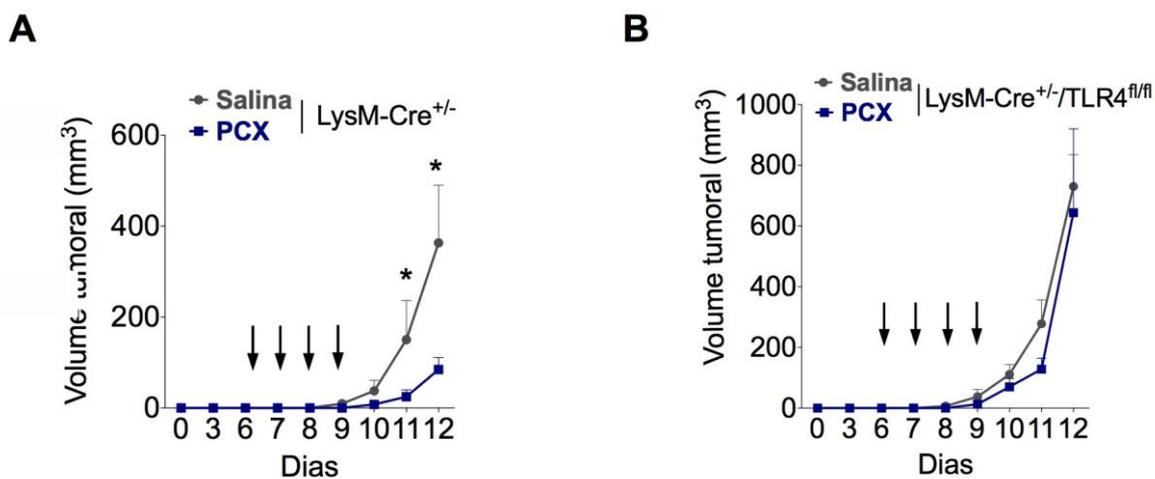
Camundongos com melanoma (B16) foram tratados com solução salina ou PCX (10 mg/kg, i.p., 3x). Os tumores inteiros foram processados para posterior análise das subpopulações de células mielóides por citometria de fluxo. (A) Estratégia para identificar o perfil de células mielóides que expressão CD206. (B) Quantificação dos resultados de acordo com a estratégia apresentada no painel A. (C) Números totais de macrófagos maduros/imaturos que expressam CD206. (E) Gráficos de histograma comparando a expressão de CD206 e MHCII nos diferentes subtipos de células mielóides: TAMs maduros (F4/80⁺Ly6C⁻), macrófagos imaturos (F4/80⁺Ly6C⁺) e monócitos (F4/80⁻Ly6C⁺). Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão, * $P < 0,05$.

Figura 22. Geração de camundongos condicionais deficientes de TLR4 em células mielóides.



(A) Esquema de criação de camundongos condicionais: Camundongos LysM-Cre^{+/+}/TLR4^{fl/-} heterozigotos da geração F2 foram cruzados com camundongos TLR4-floxed homozigotos (TLR4^{fl/fl}) para criar os camundongos com o genótipo desejado (LysM-Cre^{+/+}/TLR4^{fl/fl}). Os camundongos controle LysM-Cre^{+/+} foram produzidos cruzando animais LysM-Cre^{+/+} homozigotos com camundongos C57BL/6 WT. (B) Resultados representativos da genotipagem realizada por PCR: 1. Os camundongos LysM-Cre^{+/+} foram identificados por PCR que originou duas bandas a 700 bp e 350 bp; 2. Os camundongos homozigotos para TLR4-floxed foram reconhecidos por PCR, apresentando uma única banda a 285 bp. Para confirmar a deleção de TLR4 em macrófagos, MDMOs de camundongos LysM-Cre^{+/+} e LysM-Cre^{+/+}/TLR4^{fl/fl} foram estimulados com LPS (100 ng/mL) ou PCX (30 μM) e após 24h a produção de marcadores M1 no sobrenadante foi quantificada por ELISA: (C) TNF-α e (D) IL-6. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores são apresentados como média ± desvio padrão, **P*<0,05.

Figura 23. Ativação dos receptores TLR4 nos macrófagos associados ao tumor contribui para o efeito antitumoral do paclitaxel (PCX).

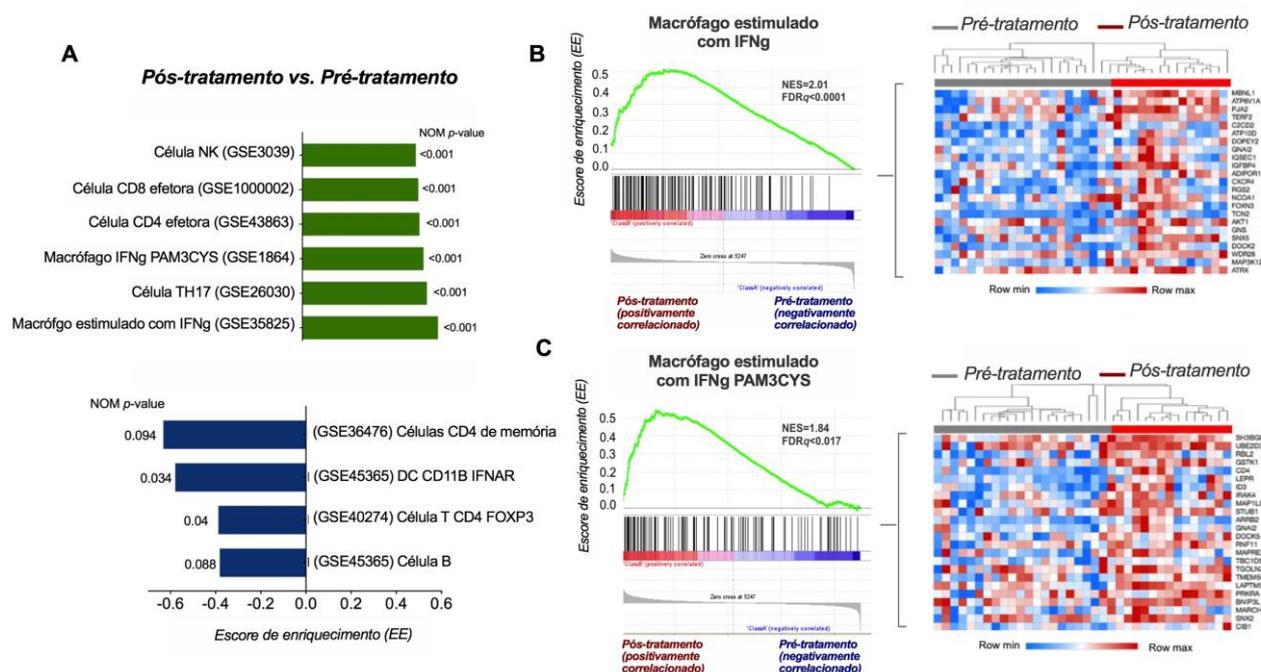


Camundongos condicionais com deficiente expressão de TLR4 em macrófagos (LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl}) e o respectivo controle (LysM-Cre^{+/-}) foram submetidos a injeção por via subcutânea de células de melanoma murinho (B16) após 6 dias foram tratados com salina ou PCX (10mg/kg, i.p.). (A-B) São apresentadas as curvas de crescimento tumoral, as setas indicam os dias em que foram realizadas a administração de salina ou PCX. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão, * $P < 0,05$.

5.7 Paclitaxel (PCX) altera a assinatura imunológica de genes no microambiente tumoral

Em seguida, foi avaliado se os dados pré-clínicos aqui apresentados poderiam ser estendidos para pacientes. Essa translação foi baseada nos seguintes critérios: 1. Obter dados de pacientes com câncer tratados com PCX como monoterapia; e 2. Obter dados de tumores sensíveis a imunoterapia. No câncer de ovário o PCX é utilizado como primeira linha de tratamento e, de acordo com achados recentes, seria potencialmente sensível a imunoterapia (GONZALEZ-MARTÍN et al., 2014; ZHU, 2017). Portanto, foi realizada uma análise de bioinformática de uma base de dados contendo o transcriptoma de biópsias de tumor de ovário realizadas antes e 3 ciclos após o tratamento com PCX (GSE15622). A análise de enriquecimento gênico (GSEA) com foco numa coleção de assinaturas imunológicas (*immuneSigDB*), mostrou que tratamento com PCX infrarregulou grupos de genes ligados a “células T CD4+ de memória”, “células dendríticas CD11b+” e “células CD4+FOXP3+” (figura 24 A). É importante destacar, que foi observado um aumento significativo no enriquecimento de genes ligados a macrófagos com fenótipo M1 “macrófago estimulado com INFg” e “macrófago estimulado com INFg mais PAM3Cys” após o tratamento com PCX (figura 24 B-C). Estas assinaturas mostraram padrões similares aos observados nos tumores dos animais tratados com PCX e demonstram a potencial relevância clínica dos achados experimentais aqui apresentados.

Figura 24. Análise de enriquecimento de conjunto de genes (AECG) da resposta ao paclitaxel (PCX) em pacientes com câncer de ovário.



O perfil de expressão gênica de biopsias de câncer do ovário humanas obtidas antes e após 3 ciclos de quimioterapia com PCX (GSE15622) foi explorado através de uma análise de enriquecimento de conjunto de genes (AECG) com foco na coleção de assinaturas imunológicas (immuneSigDB) composta de um conjunto de genes que representam tipos celulares, estados e perturbações dentro do sistema imunológico. (A) Apresenta o conjunto de genes enriquecidos no grupo pós-tratamento com PCX vs. pré-tratamento, o escore de enriquecimento (EE) é indicado no eixo x. (B) Apresenta o EE para conjunto de genes disponibilizado pelo GEO dataset sob o no. GSE35825 - UNTREATED_VS_IFNG_STIM_MACROPHAGE_DN e (C) GSE11064 - UNTREATED_VS_IFNG_PAM3CYS_STIM_MAC_UP comparando os grupos pós-tratamento com PCX vs. pré-tratamento; a curva verde mostra o EE para o conjunto de genes classificados. Os mapas de calor de cada GEO dataset foram construídos a partir da expressão dos 23 genes mais significativamente classificados com base na razão de ruído no sinal (do inglês *signal noise ration*), o vermelho representa maior expressão, enquanto o azul menor expressão.

6. DISCUSSÃO

O PCX é uma droga extensivamente utilizada no tratamento de vários tipos de tumores sólidos devido a sua reconhecida ação antiproliferativa (WEAVER, 2014). No entanto, no presente estudo apresentamos um conjunto de evidências que indicam que o efeito antitumoral do PCX, ao menos em parte, ocorre através da modulação da resposta imune. Nesse sentido, foi demonstrado que o PCX reprograma macrófagos com perfil imunotolerante M2 para um fenótipo ativo M1 por meio da ativação dos receptores TLR4. Esse efeito, foi reproduzido *in vivo* e a reprogramação dos TAMs do perfil M2 para M1 foi associada à eficácia da resposta antitumoral do PCX. Além disso, apresentamos evidências de que esses achados podem ser estendidos aos humanos, uma vez que, amostras de tumores de pacientes tratados com PCX mostraram enriquecimento de genes ligados a macrófagos do tipo M1. Essencialmente, nossos dados demonstraram um mecanismo de ação ainda não apreciado do PCX.

Um conjunto de novas evidências tem indicado que a eficácia terapêutica de várias drogas antineoplásicas classicamente utilizadas na prática oncológica, está associada também à capacidade de seus princípios ativos modularem a resposta imune no microambiente tumoral (GHIRINGHELLI et al., 2004; GOEL et al., 2017; LADOIRE et al., 2011; ZITVOGEL et al., 2013). Por exemplo, o tratamento com ciclofosfamida subverte diretamente as funções imunossupressoras das células Treg (GHIRINGHELLI et al., 2004). A quimioterapia neoadjuvante com antraciclinas aumenta a relação CD8/Treg no tecido tumoral (LADOIRE et al., 2011). Ainda, o tratamento com ciclofosfamida, gemcitabina ou oxaliplatina efetivamente aumenta a antigenicidade das células tumorais via expressão do MHC-I (LIU et al., 2010).

Nesse contexto, o PCX destaca-se como uma importante droga antineoplásica, à qual tem sido atribuída propriedades imunoestimulatórias, via ativação do TLR4 (LI et al., 2015; PERERA et al., 2001; RESMAN et al., 2014; TLR et al., 2008). No entanto, como a ativação do TLR4 pelo PCX poderia influenciar a resposta imune no microambiente tumoral ainda era desconhecida. Dessa forma, no presente estudo, investigamos o efeito LPS-mimético do PCX sobre a plasticidade dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) e o impacto desse mecanismo sobre a eficácia antitumoral dessa droga.

Foi identificado que o PCX induz a polarização de macrófagos para o perfil M1, via sinalização TLR4/NF- κ B. De fato, macrófagos expostos ao PCX exibiram aumento de marcadores M1 e esse efeito não foi reproduzido em células com expressão deficiente para TLR4. Ainda, foi observado que o estímulo com PCX aumentou a atividade do NF- κ B em macrófagos, um efeito que foi inibido pelo antagonista de TLR4 (LPS-RS), corroborando com a descrita atividade LPS-mimética do PCX. A ação do PCX em células apresentadoras de antígenos (APCs) já havia sido previamente explorada. Pfannenstiel et al. demonstraram que o PCX via TLR4 aumenta a maturação de células dendríticas *in vitro*. Ainda, de acordo com esses autores o PCX aumentou, nessas células, a expressão de molécula co-estimuladoras, produção de IL-12 e a capacidade de induzir ativação de linfócitos T CD8 (PFANNENSTIEL et al., 2010). Estes achados reforçam o potencial imunoestimulador do PCX.

O complexo equilíbrio entre inflamação e resolução está fortemente ligado a plasticidade funcional dos macrófagos (MURRAY et al., 2014). A fim de reestabelecer a homeostasia tecidual, macrófagos podem progressivamente mudar seus fenótipos e adquirir inclusive funções opostas, nos chamados macrófago pró-

inflamatório M1 ou anti-inflamatório M2 (STOUT et al., 2005; WANG; LIANG; ZEN, 2014). Uma versão estendida do estado de ativação dessas células descreve os perfis M1 e M2 como extremos de um espectro funcional composto por M1 e ao menos três subtipos de M2: M2a (relativo à exposição a IL-4 ou IL-13), M2b (relativo a exposição a complexos imunes mais IL-1 ou LPS), e M2c (relativo a exposição a IL-10, TGF- β ou glicocorticoides) (MANTOVANI et al., 2004; MOSSER; EDWARDS, 2008; MURRAY et al., 2014). A diversidade de subtipos é resultado de uma intrincada rede de sinalização que produz assinaturas gênicas distintas. No presente estudo, a polarização de macrófagos com IL-4 produziu o subtipo M2a.

Para indução desse fenótipo, a sinalização do fator de transcrição STAT6 é essencial, por outro lado, a polarização de macrófagos para o sentido M1 induzida por agonistas de TLRs envolve principalmente o NF-kB (WANG; LIANG; ZEN, 2014). De fato, pode-se constatar que o tratamento com PCX reduziu os níveis de STAT6 fosforilado, e assim, bloqueou a polarização de macrófagos no sentido M2 induzida por IL-4, ao passo que guiou essas mesmas células para o perfil M1 via sinalização mediada pelo NF-kB. De maneira semelhante, a fosforilação do STAT6 foi inibida em linfócitos B quando expostos concomitantemente a IL-4 e LPS (SCHRODER et al., 2002). Estes achados sugerem que o PCX via TLR4/NF-kB pode exercer um efeito antagonista à polarização de macrófagos no sentido M2 mediada pela sinalização IL-4/STAT6.

Diferentemente dos linfócitos, cuja ativação resulta na diferenciação final das células aos fenótipos Th1, Th2 ou Th17, por exemplo, os macrófagos são células plásticas capazes de ajustar seu fenótipo de acordo com os estímulos prevalentes em determinado ambiente (BISWAS; MANTOVANI, 2010). Prévios estudos, já haviam demonstrado que macrófagos M2 estimulados com LPS podem ser

reprogramados para o perfil M1 (AUTHIER et al., 2008; MAJOR; FLETCHER; HAMILTON, 2002; STOUT et al., 2005). Esse fato suscitou o interesse em investigar se o PCX também poderia reprogramar macrófagos com fenótipo M2 para o perfil M1. Notadamente, o tratamento com PCX direcionou a polarização de macrófagos M2 para o sentido M1. Esses dados indicam que o PCX, de maneira similar ao LPS, pode reprogramar macrófagos guiando células com fenótipo M2 para o perfil M1 via TLR4.

No microambiente tumoral, os TAMs adotam fenótipo imunossupressor do tipo M2 e contribuem para a progressão tumoral (BISWAS; MANTOVANI, 2010; WANG; LIANG; ZEN, 2014). Dessa forma, decidimos investigar o efeito do tratamento com PCX sobre o fenótipo dos TAMs. Foi observado que os TAMs isolados de tumores de camundongos tratados com PCX mostraram uma redução de marcadores M2 e esse fato foi associado à diminuição do crescimento tumoral. No entanto, esse efeito não foi reproduzido nos animais TLR4 *knockout* total ou com deleção condicional do TLR4 nas células mielóides (ex. Macrófagos). Vários estudos demonstraram que os TAMs podem influenciar na resposta à quimioterapia antineoplásica (DE PALMA; LEWIS, 2013; MANTOVANI et al., 1979; NOY; POLLARD, 2014). Mantovani e colaboradores demonstraram que a depleção de macrófagos reduz a eficácia do tratamento com doxorubicina em animais com leucemia ou linfoma (MANTOVANI et al., 1979). Mais recentemente, foi demonstrado que a ativação de macrófagos pelo tratamento com inibidores da histona deacetilase de classe IIa melhora a eficácia da quimioterapia e da imunoterapia com os inibidores de *checkpoint* em camundongos com câncer de mama (GUERRIERO et al., 2017).

De fato, a reprogramação de macrófagos pode efetivamente produzir uma resposta antitumoral por meio da: 1. secreção de citocinas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico que medeiam a apoptose de células tumorais; 2. produção de quimiocinas para atrair linfócitos T citotóxicos; e 3. por meio da fagocitose de células neoplásicas (MAJETY et al., 2018). Entretanto, vale ressaltar que, no microambiente tumoral, componentes da resposta imune podem apresentar efeitos pleiotrópicos e algumas vezes contraditórios. Por exemplo, embora a IL-6 seja produzida por macrófagos com fenótipo M1, a expressão dessa citocina tem sido associada com pior prognóstico clínico em pacientes com câncer (CHOUDHARY et al., 2016). O presente estudo, não focou em investigar o papel da IL-6 no efeito antitumoral do PCX, sua produção foi usada apenas como um marcador de diferenciação entre macrófagos M1 e M2. Contudo, considerando que TAMs polarizados para o perfil M1 produzem uma significativa resposta anti-tumoral (GUO et al., 2016; LIZOTTE et al., 2014; PYONTECK et al., 2013), acreditamos que na presente condição experimental a IL-6 derivada de macrófagos M1 não exerce um efeito pró-tumorigênico relevante.

Sabe-se que os receptores TLRs desempenham um papel crítico na orquestração da imunidade antitumoral (APETOH et al., 2007; DAVIS et al., 2011; FANG et al., 2014). Em conformidade com essa afirmação observamos que os animais TLR4 *knockout* total e os animais com a deleção condicional do TLR4 nas células mielóides apresentaram similar aumento no crescimento tumoral quando comparados aos controles, respectivamente. Vale ressaltar, que o resultado observado no animal condicional é uma demonstração que a ativação do TLR4 nos macrófagos é importante para controlar o crescimento tumoral. A função inata dos receptores TLR é reconhecer “sinais de perigo”, como componentes da parede

bacteriana (padrões moleculares associados a patógenos – PAMPs) ou ligantes endógenos liberados após dano ou morte celular (padrões moleculares associados a danos - DAMPs) e montar uma resposta imune (APETOH et al., 2007; DAVIS et al., 2011; FANG et al., 2014; MCCARTHY et al., 2014).

William B Coley demonstrou, no início do século XIX, que a injeção de uma mistura de bactérias patogênicas mortas poderia reduzir o crescimento de tumores de pacientes com sarcomas inoperáveis (MCCARTHY, 2006). Posteriormente, o LPS foi isolado e descrito como agente ativo da toxina de Coley (SHEAR; TURNER, 1943). Nas décadas seguintes, vários trabalhos demonstraram que LPS como monoterapia ou em combinação com outras terapias poderia ativar a imunidade antitumoral (CHICOINE et al., 2007; DAVIS et al., 2011; GOTO, 1996). Goto e colaboradores, demonstraram que o tratamento de pacientes com câncer com injeção local de LPS e ciclofosfamida induziu uma contínua liberação de citocinas (TNF- α e IL-6) e estimulou uma resposta antitumoral com menor toxicidade (GOTO, 1996). Notadamente, em pacientes com câncer de mama tratados com PCX foi observado um aumento nos níveis séricos de IL-6 e IL-8, indicando o efeito pró-inflamatório do PCX em humanos (PUSZTAI et al., 2004). De acordo com esses achados, no presente estudo demonstramos que pacientes tratados com PCX apresentam um enriquecimento de genes ligados a macrófagos com fenótipo M1 no microambiente tumoral. Esses dados sugerem que o PCX, de forma similar ao LPS, produz uma resposta antitumoral através da estimulação da resposta imune. No entanto, embora as evidências produzidas *in vitro* nesse estudo indiquem uma ação direta do PCX no receptor TLR4, não excluimos, *in vivo*, um possível envolvimento indireto de DAMPs e PAMPs na ativação dos receptores TLR4.

Em resposta ao tratamento quimioterápico, células tumorais podem liberar DAMPs, tais como a proteína de alta mobilidade B1 (HMGB1) que pode interagir

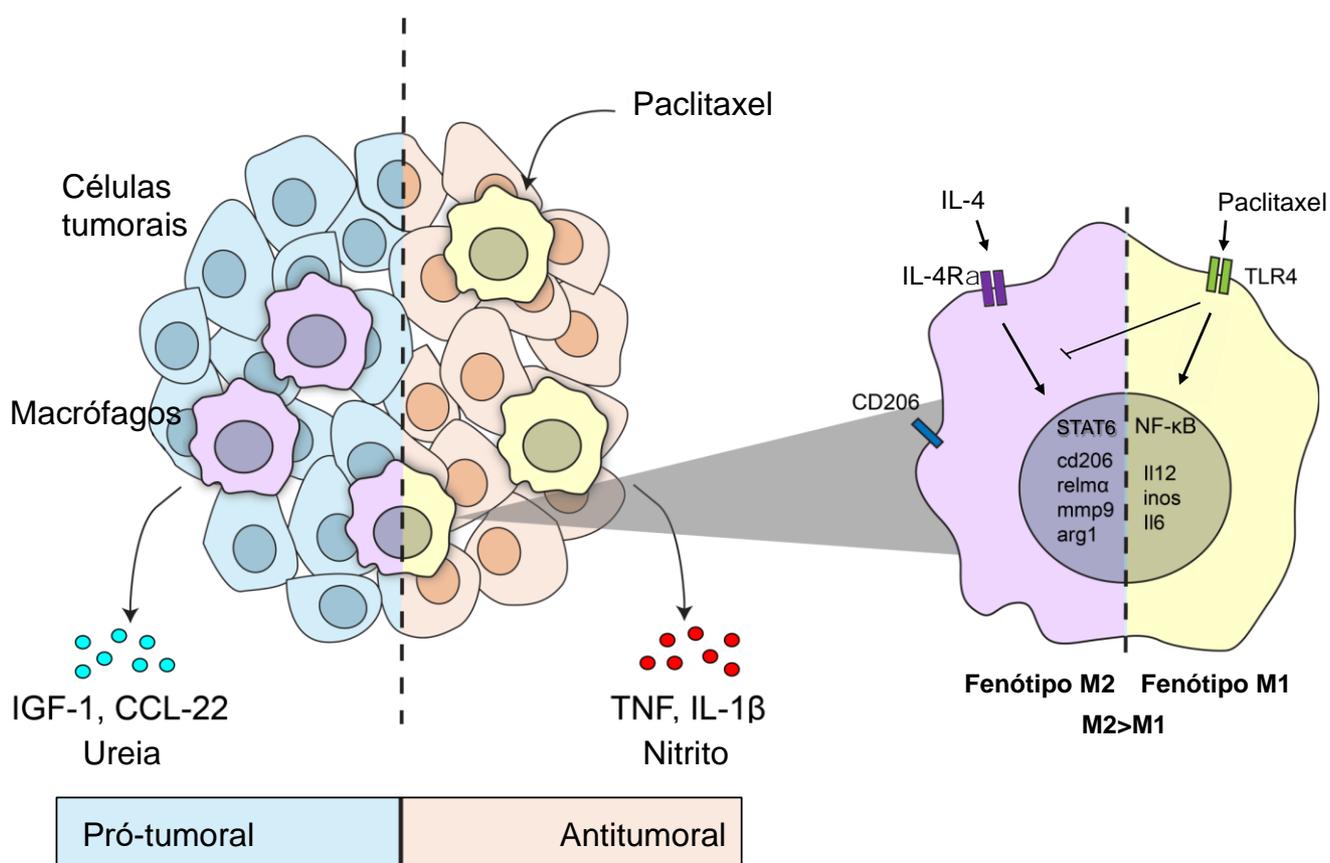
com o TLR4 e induzir potente efeito adjuvante (APETOH et al., 2007; ZITVOGEL et al., 2013). Outras evidências indicam que PAMPs oriundos da microbiota podem modular a resposta imune antitumoral e a eficácia do tratamento antineoplásico (ROY; TRINCHIERI, 2017; VIAUD et al., 2013). Por exemplo, o tratamento com ciclofosfamida induziu a ruptura da barreira epitelial intestinal e a translocação bacteriana para órgãos linfoides secundários, resultando na geração de uma resposta imune antitumoral mediada por linfócitos Th17 (VIAUD et al., 2013). Sabe-se que o efeito antiproliferativo do PCX também está associado à toxicidade gastrointestinal (BOUSSIOS et al., 2012). Logo, não descartamos a possibilidade de que DAMPs ou PAMPs derivados da microbiota possam contribuir para os efeitos imunomoduladores do PCX.

Vale ressaltar, que a ativação do TLR4 pelo PCX pode ser uma faca de dois gumes, uma vez que, essa sinalização parece estar envolvida nos efeitos colaterais do PCX, incluindo o desenvolvimento da dor neuropática (LI et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que a exposição de macrófagos humanos e outras células à PCX leva a um aumento das citocinas inflamatórias via TLR4 (CASSIDY et al., 2002; LI et al., 2015; RAJPUT; VOLK-DRAPER; RAN, 2013; WHITE et al., 1998), mas outros estudos mostram o oposto (KAWASAKI et al., 2001; ZIMMER et al., 2008).

Coletivamente, nossos dados indicam que o efeito antitumoral do PCX, pelo menos em parte, está ligado à reprogramação de TAMs para um perfil menos imunotolerante através da ativação dos receptores TLR4. Ainda existe a necessidade de compreender os potenciais efeitos imunológicos do PCX no contexto clínico. Portanto, sugerimos que a conversão de TAMs com fenótipo M2 para o sentido pró-inflamatório M1 com PCX poderia ser explorado como uma estratégia para aumentar a eficácia das imunoterapias usadas atualmente, e assim melhorar os desfechos clínicos para pacientes com câncer.

7. CONCLUSÃO

O PCX também reduz o crescimento tumoral através da reprogramação de macrófagos com fenótipo M2 para o perfil antitumoral M1 via ativação dos receptores TLR4.



O PCX via TLR4 bloqueia a polarização de macrófagos induzida por IL-4/STAT6, aumenta a ativação do NF- κ B e a produção de marcadores pró-inflamatórios em TAMs, revertendo o fenótipo de TAMs do tipo M2 para o perfil M1 e essa atividade imunomoduladora contribuiu para eficácia antitumoral do PCX.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. **Immunotherapy**, v. 1, n. Dc, p. 949–964, 2009.
- AHMED, A.; REDMOND, H. P.; WANG, J. H. Links between Toll-like receptor 4 and breast cancer. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 2, p. e22945, 2013.
- APETOH, L. et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nature Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1050–1059, 2007.
- AUTHIER, H. et al. IL-13 pre-treatment of murine peritoneal macrophages increases their anti-Toxoplasma gondii activity induced by lipopolysaccharides. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 3–4, p. 341–352, 2008.
- 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, 2010.
- BOUSSIOS, S. et al. Systemic treatment-induced gastrointestinal toxicity: incidence, clinical presentation and management. **Annals of Gastroenterology Ann Gastroenterol**, v. 25, n. 252, p. 106–118, 2012.
- BRONTE, V.; MURRAY, P. J. Understanding Local Macrophage Phenotypes In Disease: Modulating macrophage function to treat cancer. **Nature Medicine**, v. 21, n. 2, p. 117–119, 2015.
- CASSIDY, P. B. et al. Cyclooxygenase-2 Induction by Paclitaxel, Docetaxel, and Taxane Analogues in Human Monocytes and Murine Macrophages: Structure-Activity Relationships and Their Implications. **Clin Cancer Res.** 1. v. 8, n. March, p. 846–855, 2002.
- CAVALLO, F. et al. 2011: The immune hallmarks of cancer. **Cancer Immunol Immunother.** v. 60, p. 319–360, 2011.
- CHANMEE, T. et al. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1670–1690, 2014.
- CHICOINE, M. R. et al. The in vivo antitumoral effects of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme are mediated in part by toll-like receptor 4. **Neurosurgery**, v. 60, n. 2, p. 372–380, 2007.
- CHOUDHARY, M. M. et al. Interleukin-6 role in head and neck squamous cell carcinoma progression. **World Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 2, n. 2, p. 90–97, 2016.
- COFFELT, S. B.; DE VISSER, K. E. Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapies. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 4, p. 198–216, 2015.
- DAVAR, D.; TARHINI, A. A.; KIRKWOOD, J. M. Adjuvant immunotherapy of melanoma and development of new approaches using the neoadjuvant approach. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 3, p. 237–250, 2013.
- DAVIS, M. et al. Effect of pemetrexed on innate immune killer cells and adaptive immune T cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. **Journal of Immunotherapy**, v. 35, n. 8, p. 629–640, 2012.
- DAVIS, M. B. et al. Intratumoral administration of TLR4 agonist absorbed into a cellular vector improves antitumor responses. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 12, p. 3984–3992, 2011.
- DE PALMA, M.; LEWIS, C. E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. **Cancer Cell**, v. 23, n. 3, p. 277–286, 2013.

- EL-OMAR, E. M.; NG, M. T.; HOLD, G. L. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 2, p. 244–252, 2008.
- FANG, H. et al. TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 11, n. 2, p. 150–159, 2014.
- GALLUZZI, L. et al. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. **Cancer Cell**, v. 28, n. 6, p. 690–714, 2015.
- GERSUK, G. M.; RAZAI, L. W.; MARR, K. A. Methods of in vitro macrophage maturation confer variable inflammatory responses in association with altered expression of cell surface dectin-1. **Journal of Immunological Methods**, v. 329, n. 1–2, p. 157–166, 2008.
- GHIRINGHELLI, F. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 2, p. 336–344, 2004.
- GODEC, J. et al. Compendium of Immune Signatures Identifies Conserved and Species-Specific Biology in Response to Inflammation. **Immunity**, v. 44, n. 1, p. 194–206, 2016.
- GOEL, S. et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. **Nature**, 2017.
- GONZALEZ-MARTÍN, A. et al. SEOM guideline in ovarian cancer 2014. **Clinical and Translational Oncology**, v. 16, n. 12, p. 1067–1071, 2014.
- GUERRIERO, J. L. et al. Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. **Nature**, v. 543, n. 7645, p. 428–432, 2017.
- GUO, H. et al. Endostatin inhibits the growth and migration of 4T1 mouse breast cancer cells by skewing macrophage polarity toward the M1 phenotype. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 65, n. 6, p. 677–688, 2016.
- GOTO, S. et al. Intradermal administration of lipopolysaccharide in treatment of human cancer. **Immunother. C.**, v. 42, n. 4, p. 255–261, 1996.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- KAWASAKI, K. et al. Involvement of TLR4/MD-2 complex in species-specific lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. **J.Endotoxin.Res.**, v. 7, n. 3, p. 232–236, 2001.
- KIM, J. B. et al. Non-invasive detection of a small number of bioluminescent cancer cells in vivo. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9364, 2010.
- KOMLODI-PASZTOR, E. et al. Mitosis is not a key target of microtubule agents in patient tumors. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 4, p. 244–250, 2011.
- LADOIRE, S. et al. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. **Journal of Pathology**, v. 224, n. 3, p. 389–400, 2011.
- LI, Y. et al. The Cancer Chemotherapeutic Paclitaxel Increases Human and Rodent Sensory Neuron Responses to TRPV1 by Activation of TLR4. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 39, p. 13487–13500, 2015.
- LIMA-JÚNIOR, R. C. P. C. P. et al. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 9, p. 2335–2350, maio 2014.
- LIMA, R. C. P. et al. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-

- induced intestinal mucositis: Role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 931–942, abr. 2012.
- LIU, W. M. et al. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. **British journal of cancer**, v. 102, n. 1, p. 115–23, 2010.
- LIZOTTE, P. H. et al. Attenuated *Listeria monocytogenes* reprograms M2-polarized tumor-associated macrophages in ovarian cancer leading to iNOS-mediated tumor cell lysis. **Oncolmunology**, v. 3, n. 5, p. e28926, 2014.
- MAJETY, M. et al. A drug development perspective on targeting tumor-associated myeloid cells. **FEBS Journal**, v. 285, n. 4, p. 763–776, 2018.
- MAJOR, J.; FLETCHER, J. E.; HAMILTON, T. A. IL-4 Pretreatment Selectively Enhances Cytokine and Chemokine Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Mouse Peritoneal Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 5, p. 2456–2463, 2002.
- MANTOVANI, A. et al. Role of host defense mechanisms in the antitumor activity of adriamycin and daunomycin in mice. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 63, n. 1, p. 61–6, 1979.
- MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.
- MCCARTHY, C. G. et al. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 306, n. 2, p. H184–H196, 2014.
- MCCARTHY, E. F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. **The Iowa orthopaedic journal**, v. 26, p. 154–8, 2006.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. J. A human homologue of the Drosophila activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. July, p. 394–397, 1997.
- MEKHAIL, T. M.; MARKMAN, M. Paclitaxel in cancer therapy. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 3, n. 6, p. 755–766, 2002.
- MILROSS, C. G. et al. Relationship of Mitotic Arrest and Apoptosis to Antitumor Effect of Paclitaxel organoids with functions that include. **Cancer**, v. 88, n. 18, 1996.
- MITCHISON, T. J. The proliferation rate paradox in antimetabolic chemotherapy. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 2012.
- MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 240–273, 2009.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.
- MOTA, J. M. et al. Post-Sepsis State Induces Tumor-Associated Macrophage Accumulation through CXCR4/CXCL12 and Favors Tumor Progression in Mice. **Cancer Immunology Research**, v. 4, n. 4, p. 312–322, 2016.
- MURRAY, P. J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.
- NASEEMUDDIN, M. et al. Cell mediated immune responses through TLR4 prevents DMBA-induced mammary carcinogenesis in mice. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 4, p. 765–774, 2012.
- NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 49–61, 2014.
- PAULOS, C. M. et al. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8+ T cells via TLR signaling. **The Journal of**

- clinical investigation**, v. 117, n. 8, p. 2197–2204, 2007.
- PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27–47, 2016.
- PERERA, P. Y. et al. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 1, p. 574–581, 2001.
- PFANNENSTIEL, L. W. et al. Paclitaxel enhances early dendritic cell maturation and function through TLR4 signaling in mice. **Cellular Immunology**, v. 263, n. 1, p. 79–87, 2010.
- POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in *Tlr4* gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 1998.
- PUSZTAI, L. et al. Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy. **Cytokine**, v. 25, n. 3, p. 94–102, 2004.
- PYONTECK, S. M. et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. **Nature medicine**, v. 19, n. 10, p. 1264–72, 2013.
- QURESHI, S. T. et al. Endotoxin-tolerant Mice Have Mutations in Toll-like Receptor 4 (*Tlr4*). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 4, p. 615–625, 1999.
- RAJPUT, S.; VOLK-DRAPER, L. D.; RAN, S. TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 8, p. 1676–87, 2013.
- RESMAN, N. et al. Tetraacylated Lipid A and Paclitaxel-Selective Activation of TLR4/MD-2 Conferred through Hydrophobic Interactions. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 192, n. 4, p. 1887–95, 2014.
- ROY, S.; TRINCHIERI, G. Microbiota: A key orchestrator of cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 5, p. 271–285, 2017.
- RUIZ-MIYAZAWA, K. W. et al. Vinpocetine reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by targeting oxidative stress, cytokines and NF- κ B. **Chemico-Biological Interactions**, v. 237, p. 9–17, 2015.
- SCHRODER, A. J. et al. Cutting Edge: STAT6 Serves as a Positive and Negative Regulator of Gene Expression in IL-4-Stimulated B Lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 3, p. 996–1000, 2002.
- SHEAR, M. J.; TURNER, F. C. Chemical treatment of tumors. V. Isolation of the hemorrhagic-producing fraction from *Serratia marcescens* (bacillus prodigious) culture filtrate. **J Natl Cancer Inst**, v. 4, n. 8, p. 81–97, 1943.
- SHIME, H. et al. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 6, p. 2066–2071, 2012.
- STOUT, R. D. et al. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 1, p. 342–349, 2005.
- SUBRAMANIAN, A. et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 2005.
- TLR, O. F. et al. Role of TLR4 for paclitaxel chemotherapy in human epithelial ovarian cancer cells. v. 39, p. 157–164, 2008.
- TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: a cancer journal of clinicians.**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.
- VIAUD, S. et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. **Science**, v. 342, n. 6161, p. 971–976, 2013.
- VOLK-DRAPER, L. et al. Paclitaxel therapy promotes breast cancer metastasis in a

- TLR4-dependent manner. **Cancer Research**, v. 74, n. 19, p. 5421–5434, 2014.
- WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, p. 1–9, 2014.
- WANI, M. C. et al. Plant Antitumor Agents.VI.The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325–2327, 1971.
- WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 18, p. 2677–2681, 2014.
- WHITE, C. M. et al. Effects of paclitaxel on cytokine synthesis by unprimed human monocytes , T lymphocytes , and breast cancer cells. **Cancer Immunol Immunother.** .v 46, n. 2. p. 104–112, 1998.
- WONG, D. V. T. D. V. T. et al. The adaptor protein Myd88 is a key signaling molecule in the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.
- World Health Organization - WHO. Health topics: Cancer, 2018. <http://www.who.int/topics/cancer/en/> acesso em: 22/06/2018.
- YANG, H. et al. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 29, n. II, p. 92, 2010.
- YUSUF, N. et al. Protective role of TLR4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 68, n. 2, p. 615–622, 2008.
- ZHANG, Q. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. **PLoS one**, v. 7, n. 12, p. e50946, 2012a.
- ZHANG, Y. et al. Toll-like receptor 4 ligation confers chemoresistance to docetaxel on PC-3 human prostate cancer cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 28, n. 4, p. 269–277, 2012b.
- ZHU, X. Programmed death-1 pathway blockade produces a synergistic antitumor effect : combined application in ovarian cancer. **J Gynecol Oncol**, v. 28, n. 5, p. 1–19, 2017.
- ZIMMER, S. M. et al. Paclitaxel binding to human and murine MD-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 41, p. 27916–27926, 2008.
- ZITVOGEL, L. et al. Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 74–88, 2013.

ANEXO A – ARTIGO ACEITO NA CANCER RESEARCH (IF 9.13)

1

Tumor Biology and Immunology

Cancer
Research

2 Q1 **Paclitaxel Reduces Tumor Growth by**
 3 Q2 **Reprogramming Tumor-Associated Macrophages**
 4 Q3 **to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner**



6 AU Carlos W. Wanderley^{1,2}, David F. Colón¹, João Paulo M. Luiz¹, Francisco F. Oliveira¹,
 7 Paula R. Viacava¹, Caio A. Leite¹, Janaina A. Pereira¹, Camila M. Silva^{1,2}, Cassia R. Silva¹,
 8 Rangel L. Silva¹, Cesar A. Speck-Hernandez¹, José M. Mota³, José C. Alves-Filho¹,
 9 Q4 Roberto C. Lima-Junior², Thiago M. Cunha¹, and Fernando Q. Cunha¹

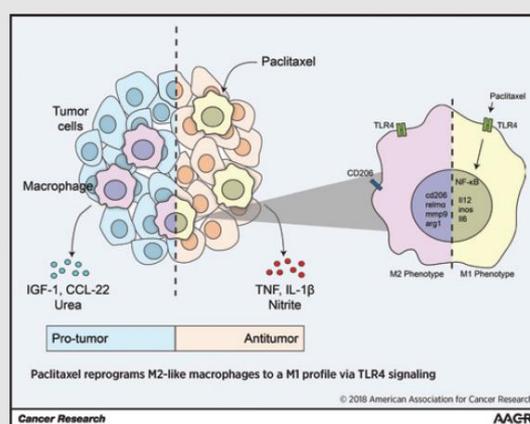
10 **Abstract**

12 Paclitaxel is an antineoplastic agent widely used to
 13 treat several solid tumor types. The primary mechanism
 14 of action of paclitaxel is based on microtubule
 15 stabilization inducing cell-cycle arrest. Here, we use
 16 several tumor models to show that paclitaxel not only
 17 induces tumor cell-cycle arrest, but also promotes
 18 antitumor immunity. *In vitro*, paclitaxel reprogrammed
 19 M2-polarized macrophages to the M1-like phenotype
 20 in a TLR4-dependent manner, similarly to LPS. Paclitaxel
 21 also modulated the tumor-associated macrophage (TAM)
 22 profile in mouse models of breast and melanoma tumors;
 23 gene expression analysis showed that paclitaxel altered
 24 the M2-like signature of TAMs toward an M1-like profile.
 25 In mice selectively lacking TLR4 on myeloid cells, for
 26 example, macrophages (LysM-Cre^{+/-}/TLR4^{fl/fl}), the
 27 antitumor effect of paclitaxel was attenuated. Gene
 28 expression analysis of tumor samples from patients with
 29 ovarian cancer before and after treatment with paclitaxel
 30 detected an enrichment of genes linked to the M1
 31 macrophage activation profile (IFN γ -stimulated
 32 macrophages).

33 These findings indicate that paclitaxel skews TAMs
 34 toward an immunocompetent profile via TLR4, which
 35 might contribute to the antitumor effect of paclitaxel
 36 and provide a rationale for new combination regimens
 37 comprising paclitaxel and immunotherapies as an
 38 anticancer treatment.

39 **Significance:** This study provides new evidence that
 40 the antitumor effect of paclitaxel occurs in part via
 41 reactivation of the immune response against cancer,
 42 guiding tumor-associated macrophages toward the
 43 M1-like antitumor phenotype.

44 **Graphical Abstract:** <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/00/00/0000/F1.large.jpg>. *Cancer Res*; 1–12. ©2018 AACR.

40 **Introduction**

41 Recent advances in understanding the mechanisms of action of
 42 classical anticancer drugs have unraveled the notion that in
 43 addition to antiproliferative effects, they might also interfere
 44 in the immune response in the tumor microenvironment (1). For

instance, low doses of cyclophosphamide have induced T regu-
 46 latory cell (Treg) inhibition (2). Anthracycline-based neoadjuvant
 47 chemotherapy increases the CD8⁺/Treg ratio (3), and the inhibi-
 48 tors of cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6) increase the
 49 tumor immunogenicity and reduce Treg populations in the tumor
 50

1 Center for Research in Inflammatory Diseases (CRID), Department of Pharma-
 2 cology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto,
 3 Brazil. 2 Department Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal
 4 University of Ceara, Fortaleza, Brazil. 3 Sao Paulo State Cancer Institute, Uni-
 5 versity of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research
 Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Current address for C.R. Silva: Biotechnology Institute, Federal University of
 Uberlandia, Uberlandia, Brazil.

Corresponding Authors: Fernando Q. Cunha, Department of Pharmacology,
 Center for Research in Inflammatory Diseases (CRID), Ribeirao Preto
 Medical School, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Monte
 Alegre 14049-900, Ribeirao Preto SP, Brazil. Phone: 5516-3602-3287;
 E-mail: fdqcunha@fmrp.usp.br, Thiago M. Cunha, thicunha@fmrp.usp.br,
 Carlos W. Wanderley, cwwanderley@gmail.com, and Roberto C. Lima-
 Junior, robertocesarpjr@gmail.com

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3480

©2018 American Association for Cancer Research.