

Universidade de São Paulo
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

Carolina Adriane Bento

**A influência de diferentes polarizações de macrófagos e
do receptor P2X7 na invasividade e resistência de
neuroblastoma**

Versão corrigida

Orientadora: Professora Doutora Claudiana Lameu

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
17/12/2020

Carolina Adriane Bento

A influência de diferentes polarizações de macrófagos e do receptor P2X7 na invasividade e resistência de neuroblastoma

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Professora Doutora Claudiana Lameu

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

478 Bento, Carolina Adriane
A influência de diferentes polarizações de macrófagos e do receptor P2X7 na invasividade e resistência de neuroblastoma / Carolina Adriane Bento. - São Paulo, 2020.
74 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Lameu, Claudiana

1. Neuroblastoma. 2. Macrófagos M1. 3. Macrófagos M2. 4. Macrófagos associados ao tumor. 5. Receptor P2X7. I. T. II. Lameu, Claudiana, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"A influência de macrófagos M1, M2 e TAM, e do receptor P2X7 na invasividade e resistência de neuroblastoma"

CAROLINA ADRIANE BENTO

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

Profa. Dra. Claudiana Lameu Gomes
(Orientadora e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Profa. Dra. Daniela Ramos Truzzi
IQ - USP

Profa. Dra. Denise Moraes da Fonseca
ICB - USP

Prof. Dr. Luiz Eduardo Baggio Savio
UFRJ

SÃO PAULO
16 de dezembro de 2020

Agradecimentos

Primeiramente eu gostaria de agradecer a minha mãe, Miriam, mulher guerreira que me ensinou a ser quem sou hoje, e toda a força que eu tenho, aprendi com ela. Também agradeço ao meu pai, Luiz, que também sempre esteve ao meu lado e me apoiou em todas as etapas.

Agradeço também a minha irmã, Giulia, que me ajudou em todas as crises, sempre confiando no meu potencial e me fortalecendo. Agradeço muito também aos meus avós, Ana e Eduardo, que sempre me incentivaram e me amaram incondicionalmente.

Agradeço também, imensamente, as minhas amigas Gina, Talita e Vanessa, que me iluminaram nas horas que eu estava perdida, e também nas horas em que eu não estava.

Agradeço muito a minha orientadora, Claudiana. Sem sua instrução, conselhos e muita paciência, esse trabalho não teria sido realizado e eu não seria a cientista que sou hoje. Também agradeço aos meus outros – e muitos - colegas de laboratório, e as técnicas Denise e Sirlei, que sempre me ajudaram e ensinaram muitas coisas.

Agradeço também ao Professor Henning Ulrich (Universidade de São Paulo), a Professora Denise Morais Fonseca (Universidade de São Paulo), o Professor Robson Coutinho (Universidade Federal do Rio de Janeiro), assim como a professora Elena Adinolfi (Universidade de Ferrara), colaboradora da Itália. Tais colaborações foram essenciais para esse trabalho.

Agradeço também a criadora do site Sci-Hub, Alexandra Elbakyan. Sem esse projeto, pouco do conhecimento atual estaria disponível, o que me impossibilitaria enormes aprendizados.

Por fim, agradeço à FAPESP pelo financiamento ao meu projeto e por acreditar no meu projeto (2018/14993-5.); ao Instituto de Química da USP, por possibilitar a oportunidade desse projeto acontecer; e também ao Clube Brasileiro de Purinas, que vêm proporcionando oportunidades maravilhosas de aprendizagem.

“Irmão, você não percebeu
Que você é o único representante
Do seu sonho na face da terra
Se isso não fizer você correr, chapa
Eu não sei o que vai”
- Emicida e Rael da Rima

Resumo

Bento, C. A. **A influência de diferentes polarizações de macrófagos e do receptor P2X7 na invasividade e resistência de neuroblastoma.** 2020, 72p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

O neuroblastoma é um tumor sólido muito comum em crianças. O estágio mais avançado da doença é altamente agressivo e invasivo, além de pouco responsivo à terapia, que é limitada por mecanismos de resistência e reincidência relacionados à metástase. Muitos estudos tem sido feitos para identificar mecanismos de invasão e quimiorresistência de células tumorais, afim de aumentar a sobrevida dos pacientes com câncer. Nesse trabalho, nós estudamos o efeito dos macrófagos, as células imunes mais abundantes no microambiente tumoral, os TAMs (do inglês *tumor-associated macrophage*) e do receptor P2X7, um purinoreceptor acionado por ATP, nesses processos. Os TAMs respondem e atuam de acordo com a miríade de fatores que encontram, podendo gerar populações heterogêneas e com funções distintas, tanto anti-tumorais, como pró-tumorais. Altos níveis de ATP extracelular são encontrados no microambiente tumoral, podendo então ativar o receptor P2X7. Este receptor tem sido relacionado tanto a funções inflamatórias como funções na resolução da inflamação de macrófagos. Além disso, o receptor P2X7 está envolvido em uma variedade de eventos celulares, incluindo a secreção de mediadores pró-inflamatórios, a proliferação celular e a apoptose de células tumorais. Primeiramente, foi avaliado o papel do receptor P2X7 na polarização de macrófagos da derivados medula óssea de camundongos *wild-type* e nocaute para o P2X7 na presença e ausência de fatores secretados por células de neuroblastoma, e então foi estudada a influência desses diferentes macrófagos polarizados em eventos celulares de grande relevância clínica para o neuroblastoma: a invasividade e quimiorresistência. Os resultados demonstraram que, apesar do reconhecido envolvimento do receptor P2X7 na inflamação, a ausência deste receptor não atenua a expressão de marcadores característicos do fenótipo inflamatório, M1. O aumento da expressão do receptor P2Y2, também envolvido na inflamação, nessas células, sugere um mecanismo genético de compensação para não atenuação da inflamação em macrófagos que não expressam o receptor P2X7. Contudo, a ausência do receptor P2X7 levou a alterações no fenótipo alternativo, M2, de modo que a expressão de Tnf, marcador de M2, não foi reprimido. TAMs nocautes para P2X7 tiveram a expressão de arg1, marcador de M2, suprimida, reforçando a importância do receptor P2X7 no estabelecimento de fenótipos ativados alternativamente. Nossos dados também sugerem que ausência do receptor P2X7 em TAMs permite a aquisição de um fenótipo capaz de tornar as células de neuroblastoma que expressam P2X7 mais invasivas e mais quimiorresistentes à vincristina. Por outro lado, TAMs, independentemente da presença ou ausência do receptor P2X7, induziram a proliferação e quimiorresistência das células de neuroblastoma silenciadas para o receptor P2X7, o que nos leva a concluir que o receptor P2X7 em TAMs é desfavorável à progressão de tumores expressando P2X7.

Palavras-chave: Neuroblastoma, macrófagos M1, macrófagos M2, TAM, receptor P2X7

Abstract

Bento, C. A. **The influence of different macrophages' phenotypes, and of the P2X7 receptor, on the invasiveness and chemoresistance of neuroblastoma.** 2020, 75p. Dissertation (Master's Degree) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Neuroblastoma is a highly common childhood solid tumor. The most advanced stage of the disease is highly aggressive and invasive, besides from being poorly responsive to therapies, which are limited by resistance and recurrence mechanisms related to metastasis. Several studies attempt to identify invasion and resistance mechanisms of the tumor cells in order to increase overall survival of the patients. On the present work, we investigated the effect of macrophages, the most abundant immune cells on the tumor microenvironment, called TAMs (tumor-associated macrophages), and of the P2X7 receptor, an ATP-gated purinoceptor, on these processes. TAMs and cancer cells crosstalk, and behave accordingly to a myriad of factors present at the TME, generating heterogeneous populations with distinct functionalities, either pro- or anti-tumor. High extracellular levels of ATP are found in the TME, being able to activate the P2X7 receptor. This receptor mediates both pro- and anti-inflammatory functions in macrophages. In addition, it is involved in several cellular events, including the secretion of pro-inflammatory mediators, cell proliferation and tumor cell apoptosis. At first, we evaluated the role of the P2X7 receptor on the polarization of bone marrow-derived macrophages (BMDM), either wild-type or knockout for the P2X7 receptor, in presence or absence of factors secreted by neuroblastoma cells. Next, we investigated the influence of the polarized macrophages in highly relevant cellular events for neuroblastoma, such as invasiveness and chemoresistance. Our results showed that, despite the known involvement of P2X7 receptor on inflammation, its absence did not decrease the expression of inflammatory markers of M1 macrophage populations. An increase in the expression of the P2Y2 receptor, also involved in inflammation, on these cells suggest a genetic compensation mechanism for preventing attenuation of inflammation when P2X7 is lacking. However, P2X7 receptor absence did compromise the M2 phenotype, driving the expression of Tnf. TAMs knockout for the P2X7 receptor were not able to express arg1, also an M2 marker, reinforcing a role of the P2X7 receptor on establishing alternative macrophage phenotypes. Our data also suggest that TAMs lacking the P2X7 receptor acquire a phenotype capable of turning P2X7R-expressing neuroblastoma cells more invasive and chemoresistant to vincristine. On the other hand, TAMs, independently on the presence of the P2X7 receptor, induced proliferation and resistance of neuroblastoma cells silenced for P2X7 receptor expression, leading us to the conclusion that the P2X7 receptor in TAMs is unfavorable for the progression of P2X7R-expressing tumors.

Keywords: Neuroblastoma, M1 macrophages, M2 macrophages, TAM, P2X7 receptor

Lista de Tabelas

Tabela 1. Primers utilizados para análise da expressão gênica por RT-qPCR	42
--	----

Lista de Figuras

Figura 1. Desenvolvimento do neuroblastoma.....	17
Figura 2. A diversidade do microambiente tumoral	20
Figura 3. Os fenótipos M1 e M2 de macrófagos.	24
Figura 4. A importância de TAM no desenvolvimento tumoral	25
Figura 5. A sinalização purinérgica.....	28
Figura 6. Esquema do ensaio de invasão tumoral em co-cultura indireta com macrófagos wild-type e P2rx7 ^{-/-}	43
Figura 7. Esquema com tratamentos utilizados nos ensaios de quimiorresistência tumoral com células ACN P2X7 ⁺ e ACN P2X7 ⁻	46
Figura 8. Análise da viabilidade de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos wild-type e P2rx7 ^{-/-}	46
Figura 9. Análise da viabilidade de macrófagos tratados com ATP e cafeína	47
Figura 10. Análise da viabilidade de células de neuroblastoma (ACN)na presença dos tratamentos, ATP e/ou cafeína	48
Figura 11. Avaliação da expressão de marcadores de polarização em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos <i>wild-type</i> e de camundongos P2rx7 ^{-/-}	49
Figura 12. Avaliação da expressão dos receptores adenosinérgicos Adora2a e Adora2b em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos <i>wild-type</i> e P2rx7 ^{-/-}	51
Figura 13. Avaliação da expressão dos receptores P2rx4 e P2ry2 em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos <i>wild-type</i> e P2rx7 ^{-/-}	51
Figura 14. Avaliação da expressão das ectonucleotidases Entpd1 (CD39) e Nt5e (CD73) em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos <i>wild-type</i> e P2rx7 ^{-/-}	52
Figura 15. A invasividade tumoral promovida por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos wild-type e P2rx7 ^{-/-}	54
Figura 16. Quimiorresistência de células tumorais P2X7 ⁺ e P2X7 ⁻	57

Lista de abreviaturas e siglas

- AMP - Adenosina monofosfato
- APC - Células apresentadoras de antígeno
- Arg-1 – Arginase-1
- ATP - Adenosina trifosfato
- cAMP - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- CCLs - do inglês, C-C motif chemokine ligand 18; quimiocinas CCLs
- CDs - do inglês, cluster of differentiation; cluster de diferenciação (ex: CD163, CD206, CD69)
- Células NK – do inglês, *natural killers*; células exterminadoras naturais
- COX-2 - Ciclo-oxigenase-2
- CREB – do inglês cAMP-response element binding protein; proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP
- CSCs - células-tronco cancerosas
- CSF-1 - do inglês, macrophage colony-stimulating fator 1; fator estimulador de colônias de macrófagos 1
- CXCL12 – do inglês, *C-X-C motif chemokine ligand 12*; quimiocina CXCL12
- DAMP - Padrões Moleculares Associados a Danos
- DNA – do inglês, *deoxyribonucleic acid*; ácido desoxirribonucleico
- EGF –do inglês epidermal growth fator; fator de crescimento epidérmico
- EMT – do inglês, epithelial–mesenchymal transition; transição epitelial-mesenquimal
- FGF – Fator de crescimento de fibroblastos
- Fizz-1 – do inglês, found in inflammatory zone protein
- GM-CSF – do inglês, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos
- HGF – Fator de crescimento de hepatócito
- IFNs - Interferons
- IL-10R - do inglês, interleukin-10 receptor; receptor de interleucina 10
- IL-4R α – do inglês, interleukin-4 receptor alpha; receptor alpha de interleucina 4
- ILs – Interleucinas
- iNOS - Óxido nítrico sintase
- IRFs – do inglês, interferon regulatory fator; fatores reguladores de interferon
- LPS - Lipopolissacarídeo

M1 – Macrófago clássico ou inflamatório

M2 – Macrófago alternativo ou anti-inflamatório

M-CSFR – do inglês, macrophage colony-stimulating factor receptor; receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos

MEC – Matrix extracelular

MHC II – Classe II do complexo Principal de histocompatibilidade

MIP-1 β – do inglês, macrophage inflammatory protein 1 β ; proteína inflamatória de macrófagos 1 β

MMPs – do inglês, matrix metalloproteinase; metaloproteinases de matriz

MT – Microambiente tumoral

MyD88 – do inglês, myeloid differentiation protein 88; proteína de diferenciação mieloide 88

NADPH – do inglês, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; nicotinamidaadenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NLRP3 –do inglês, NLR family pyrin domain containing 3

NO – Óxido nítrico

PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos

PD-L1 –do inglês, programmed death-ligand 1; ligante de morte celular programada 1

pH – Potencial hidrogeniônico

PRR - Receptores de Reconhecimento de Padrões

ROS -Espécies reativas de oxigênio

S100A8 - Proteína ligadora de cálcio S100 A8

S100A9- Proteína ligadora de cálcio S100 A9

STATs–do inglês, signal transducer and activator of transcription ; sinal transdutor e ativador de transcrição

TAM – do inglês, *tumor-associated macrophages*; macrófagos associados a tumores.

TGF- β – do inglês,*transforming growth factor beta*; fator de crescimento transformante β

Th1 - Linfócito T *helper* 2

Th17- Linfócito T *helper* 17

Th2 – Linfócito T *helper* 2

TLRs – do inglês, Toll-like receptors; receptores do tipo Toll

TNF- α – do inglês, tumor necrosis factor α ; fator de necrose tumoral α

Treg – Linfócito T regulatório

Ym-1 – também conhecida como Chil3 (chitinase-like 3)

ZEB1 – do inglês, Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

ZEB2 - do inglês, Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2

Sumário

Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract	8
Lista de Tabelas	9
Lista de Figuras	10
Lista de abreviaturas e siglas	11
Sumário	14
1. Introdução	16
1.1 Neuroblastoma	16
1.2 Microambiente tumoral	19
1.3 Macrófagos	20
1.3.1 Origem	20
1.3.2 Funções, heterogeneidade e polarização	21
1.3.3 Macrófagos M1 e macrófagos M2	22
1.3.4 Macrófagos associados a tumores	24
1.4 Sinalização Purinérgica	27
1.4.1 O ATP extracelular como DAMP	29
1.4.2 Receptores purinérgicos	30
1.4.2.1 O receptor P2X7	32
1.4.3 A metabolização de ATP em adenosina	33
1.4.4 Influência na invasão e quimiorresistência	35
2. Objetivos	37
3. Materiais e Métodos	38
3.1 Cultura de células	38
3.2 Ensaios de viabilidade celular	40
3.3 RT-qPCR	41
3.4 Ensaios de invasão tumoral em co-cultura indireta com macrófagos	42
3.5 Ensaios de quimiorresistência tumoral	43
3.6 Análise estatística dos dados	44
4. Resultados	46
4.2 P2X7 influencia na polarização de macrófagos M2 e TAM, mas não de M1	48
4.3 Análise da invasividade tumoral em co-cultura indireta	53
4.4 Análise da quimiorresistência tumoral	55
5. Discussão	58

6. Conclusão	66
7. Referências Bibliográficas	67
Anexos	74

1.Introdução

1.1 Neuroblastoma

O câncer é a segunda causa principal causa de morte no mundo, sendo então um problema de saúde pública mundial (MURRAY et al., 2016; MURRAY; LOPEZ, 1997). Em 2018, apresentou cerca de 18 milhões de novos casos e, com relação aos novos casos de tumores infantis (0-14 anos), foram 200 mil crianças em um ano (BRAY et al., 2018).

O neuroblastoma é o segundo tumor sólido mais comum entre bebês e crianças, representando de 6% a até 10% de todos os tumores infantis, ficando atrás apenas dos tumores cerebrais(COLON; CHUNG, 2011). Neuroblastoma é responsável por aproximadamente 15% de todas as mortes relacionadas aos cânceres pediátricos, sendo então o tumor extracraniano mais mortal da infância(JOHNSEN; DYBERG; WICKSTRÖM, 2019; PARK; EGGERT; CARON, 2010). A idade média de diagnóstico é de 17 a 18 meses, ou seja, bebês de até 1 ano e meio. Aproximadamente 40% dos pacientes têm menos de 1 ano, enquanto menos de 5% dos pacientes têm mais de 10 anos, no momento do diagnóstico (JOHNSEN; DYBERG; WICKSTRÖM, 2019; MATTHAY et al., 2016).

A maior parte dos casos apresenta sítios primários localizados no abdômen, associados geralmente a glândula adrenal ou aos gânglios simpáticos. Essas localizações comuns, e outras características celulares e neuroquímicas do neuroblastoma, são consequências da origem desse tumor, a linhagem simpático-adrenal da crista neural(MATTHAY et al., 2016)(Figura 1).

A crista neural é uma população de células embrionárias transitórias, que surge durante a gastrulação e a neurulação. Através de modificações via transição epitélio-mesênquima (processo pelo qual as células perdem a polaridade e têm suas propriedades adesivas reduzidas), essas células são capazes de migrar extensivamente por todo o embrião em desenvolvimento, e de se diferenciar em diversos tecidos, incluindo a maior parte do esqueleto craniofacial, o sistema nervoso simpático e periférico, as células cromafins da medula adrenal e também os melanócitos(ACHILLEOS; TRAINOR, 2012; LALLIER, 1991).

Tal migração e diferenciação são reguladas por vários programas epigenéticos e transcricionais, envolvendo a modificação de histonas, a expressão de proteínas morfogenéticas ósseas e de fatores de transcrição, e a metilação do DNA(HU; STROBL-

MAZZULLA; BRONNER, 2014). Parte da população de células da crista neural migram para a aorta dorsal, onde se diferenciam em células progenitoras simpático-adrenais, que então dão origem a células do sistema nervoso periférico, incluindo os gânglios simpáticos e a glândula adrenal - os principais locais em que o neuroblastoma surge (MATTHAY et al., 2016; NAKAGAWARA et al., 2018).

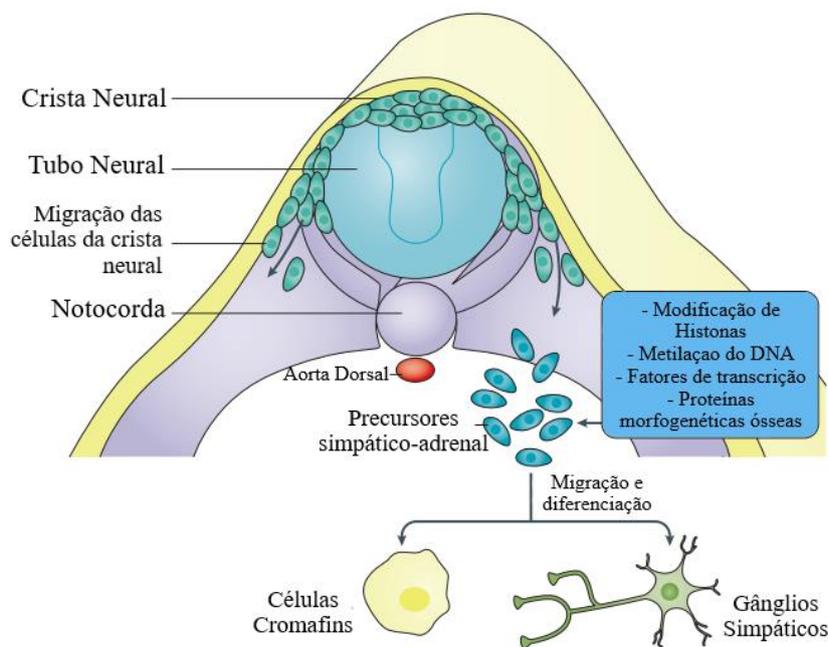


Figura 1. Desenvolvimento do neuroblastoma (adaptado): o neuroblastoma se desenvolve a partir de uma população de células embrionárias transitórias, da crista neural, que surge durante a gastrulação e neurulação (CHEN et al., 2019)

O neuroblastoma pode apresentar diferentes quadros clínicos, sendo uma doença extremamente heterogênea. Os tumores podem regredir espontaneamente, mesmo sem terapia (nos estágios iniciais da doença), ou exibir um fenótipo maligno muito agressivo e invasivo, além de pouco responsivo à terapia intensiva multimodal (estágio final da doença) (HAMNER; DAVIDOFF; SHOCHAT, 2008). Mais de 70% dos casos, no momento do diagnóstico, já apresentam metástase (ZHI et al., 2014).

Já o neuroblastoma de alto risco (estágio IV, que geralmente se desenvolve em crianças mais velhas) apresenta metástase e estima-se que 50-60% dos desses tenham recidiva. Tal característica afeta as taxas de sobrevivência dos pacientes, que são, de aproximadamente, 20% em 5 anos, mesmo com terapias mais agressivas, como radioterapia e quimioterapia, a eficácia dos tratamentos é limitada por mecanismos de resistência e reincidência relacionados à metástase (COLON; CHUNG, 2011).

Metástase é a expansão do câncer de um local primário, onde o câncer se originou, para um local secundário, e esta é responsável pela maior parte da mortalidade relacionada a tumores. Em um estudo realizado com os dados populacionais da Noruega entre 2005 e 2015, foi observado que 66,7% das mortes consequentes de tumores sólidos foram causadas por metástases (DILLEKÅS; ROGERS; STRAUME, 2019). O processo metastático é uma cascata de eventos sequenciais e interrelacionados, e todas as etapas são limitantes, o que torna esse processo extremamente ineficiente: apenas 0,01% das células que deixam o tumor primário são capazes de desenvolverem tumores secundários (BIELENBERG; ZETTER, 2015).

A cascata invasão-metástase pode ser dividida em 5 etapas: (i) *Angiogênese*, primeiramente as células tumorais precisam desenvolver uma rede vascular, o que, além de suprir as demandas de oxigênio e nutrientes, também fornece uma rota de escape para essas células à circulação; (ii) *Intravasação*, as células tumorais devem se separar da matriz extracelular e de células vizinhas, invadindo a membrana basal e migrando até a circulação; (iii) *Sobrevivência*, as células tumorais tem que sobreviver na circulação onde a maioria morre nas primeiras 24h, um ambiente adverso devido ao atrito da tensão tangencial exercida pelo fluxo de sangue e a alta concentração de soro ou devido a imunovigilância exercida por células NK; (iv) *Extravasamento*, as células transmigram da circulação para o tecido, uma etapa similar, mas em sentido oposto, a intravasação. Essa etapa ainda não resulta em uma metástase bem sucedida, e a maioria das células tumorais que passam pela etapa de extravasamento, entram em apoptose, são eliminadas pelo sistema imunológico ou se mantêm dormente; (v) *Desenvolvimento do tumor secundário*, para desenvolver macrometástases, as células tumorais precisam ter capacidade proliferativa e angiogênica para sustentar o crescimento do tumor secundário (BIELENBERG; ZETTER, 2015).

O estadiamento da doença é a primeira avaliação a ser feita, pois é necessária para a escolha da melhor terapia. Assim como outros tumores, o diagnóstico do neuroblastoma é feito através de exames laboratoriais, imagens radiográficas e patologia. Dessa forma os pacientes são estratificados em: muito baixo risco, baixo risco, risco intermediário, e alto risco ou ultra alto risco (DAVIDOFF, 2012). O estadiamento de alto risco, compreende tumores invasivos, que já formaram sítios metastáticos e tumores resistentes ao tratamento, e que possibilita então a reincidência da doença (DAVIDOFF, 2012).

1.2 Microambiente tumoral

Tumores não consistem apenas de células neoplásicas (Figura 2), apresentando também matriz extracelular (MEC), rede vascular e estroma circundantes, que compreende diversos tipos celulares e componentes extracelulares (citocinas, fatores de crescimento, hormônios e etc.). Esse conjunto complexo de fatores é denominado de microambiente tumoral (MT) (HUI; CHEN, 2015).

A matriz extracelular (MEC) é um importante componente no MT. Composta por uma gama de componentes, incluindo proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e polissacarídeos com diferentes propriedades físicas e bioquímicas, fornece suporte físico e também os principais fatores de crescimento necessários para as células (LU et al., 2011). Tais componentes são fornecidos pelas diferentes células encontradas no microambiente. A MEC desempenha então um papel crítico no decorrer do desenvolvimento tumoral, e este geralmente é desregulado e desorganizado. A MEC anormal também pode desregular o comportamento de células estromais no MT, o que pode auxiliar no processo de angiogênese e na inflamação (BRASSART-PASCO et al., 2020; HUI; CHEN, 2015).

A vasculatura do tumor é anormal em quase todos os aspectos, estruturais e funcionais, não atendendo a demanda tumoral. Isso resulta em regiões de hipóxia e com baixo pH no MT. Os sinais angiogênicos derivados da hipóxia estimula a formação de novos vasos, e esses também serão anormais. Além disso, os vasos sanguíneos tumorais exibem um lúmen desigual e geralmente vazado, o que faz com que a pressão do fluido intersticial aumente, resultando na irregularidade do fluxo sanguíneo. Essa irregularidade afeta a distribuição de nutrientes e também de medicamentos no MT, além de contribuir para a hipóxia (HUI; CHEN, 2015; WU; DAI, 2017).

Tal conjunto de características únicas do MT, os diferenciam dos microambientes de tecidos saudáveis, o que é essencial na modulação da iniciação, progressão e metástase tumoral, como também na eficácia de terapias. A resistência à medicamentos, mediada pelo MT, é resultado da dinâmica contínua entre as células tumorais e o estroma circundante alterado (LI et al., 2019b; POH; ERNST, 2018).

Os diferentes tipos celulares observados no MT incluem células estromais, como fibroblastos, pericitos e adipócitos; e células imunes (linfócitos T, linfócitos B, células NK (do inglês, natural killer) e macrófagos). Células estromais secretam moléculas como o fator de crescimento do hepatócito (HGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF)

e a quimiocina CXCL12, que são capazes de induzir o crescimento e a sobrevivência das células tumorais além de poderem atuar como quimioatratores, estimulando a migração de células imunes para o MT (HUI; CHEN, 2015).

Dentre as células imunes encontradas no MT, os macrófagos são as mais abundantes na maioria dos tumores humanos e murinos, e suas atividades podem ser anti ou pró-tumorigênicas (HUI; CHEN, 2015). Tais células podem constituir até 50% da massa tumoral (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

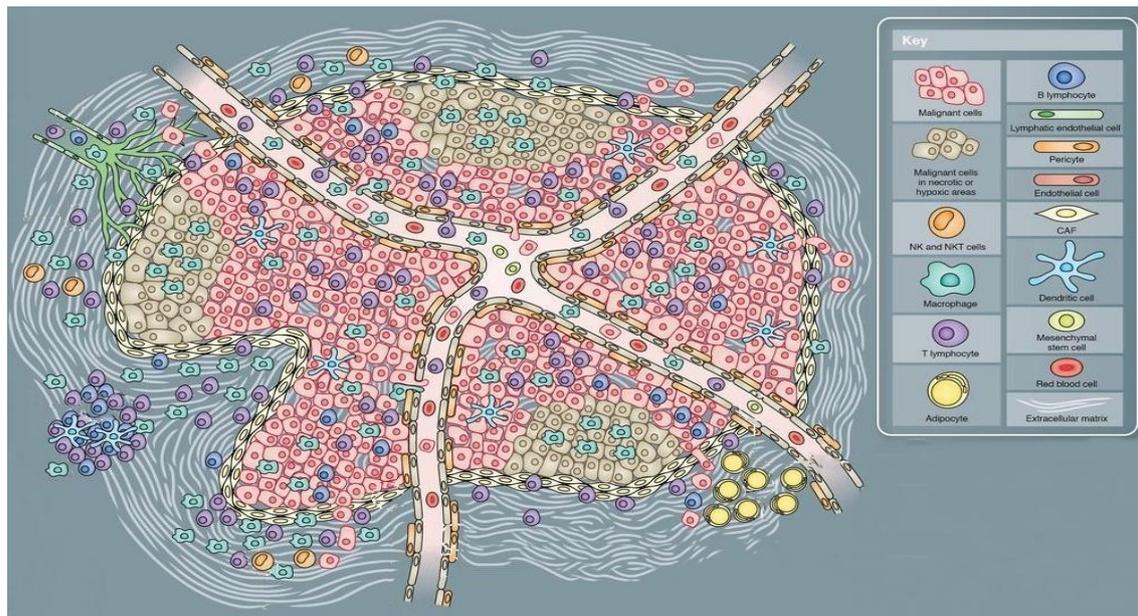


Figura 2. A diversidade do microambiente tumoral: Tumores consistem não apenas de células tumorais, mas também compreende diversos tipos celulares, componentes extracelulares, além da MEC e da rede vascular circundante (MENZIES et al., 2017)

1.3 Macrófagos

1.3.1 Origem

Os macrófagos são células imunes mieloides, que possuem duas origens diferentes. A primeira, que abrange a maioria dos macrófagos, é estabelecida antes do nascimento, durante o desenvolvimento embrionário, a partir de células do saco vitelino. As populações de macrófagos resultantes dessas células são residentes de diferentes tecidos no indivíduo adulto, e possuem capacidade de autorrenovação, se mantendo localmente, independentemente de outros tecidos (VAROL; MILDNER; JUNG, 2015). Já a segunda origem, se desenvolve após o nascimento, a partir de monócitos que circulam constantemente no organismo, e se infiltram nos tecidos onde então se diferenciam em

macrófagos. Tal via é associada a contextos inflamatórios (VAN FURTH; COHN, 1968). Dessa forma cada tecido exhibe uma combinação própria de macrófagos embrionários e de macrófagos derivados de monócitos, e sua respectiva abundância provavelmente reflete a história e natureza do tecido de residência (VAROL; MILDNER; JUNG, 2015).

Os monócitos se formam na medula óssea e são continuamente enviados a circulação, onde constituem cerca de 4% da população total de leucócitos no sangue de camundongos, e por volta de 10% no sangue de humanos (SPRANGERS; VRIES; EVERTS, 2016; VAN FURTH; SLUITER, 1986) . Em situações fisiológicas, não há necessidade de influxo de monócitos para manutenção da população de macrófagos residentes de tecidos. Contudo, em situação patológica de dano tecidual e/ou infecção, é necessário o recrutamento dessas células para tal microambiente, para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Seu contínuo transporte pela circulação e sua excepcional plasticidade funcional tornam os monócitos capazes de serem rapidamente recrutados para desempenhar uma série de funções efetoras no desenvolvimento de uma resposta inflamatória e sua posterior resolução. Dessa forma, a maturação e consequentes funções dos monócitos são contexto dependente, e variam de acordo com o microambiente encontrado após o extravasamento (VAROL; MILDNER; JUNG, 2015).

Os macrófagos encontrados em microambientes tumorais promovem a iniciação e o desenvolvimento de tumores, incluindo a formação de metástases. Tais macrófagos são chamados de macrófagos associados a tumores, ou TAMs (do inglês, tumor-associated macrophages). Devido aos proeminentes infiltrados de monócitos, em diferentes tumores, é provável que a maioria dos TAMs seja derivada de monócitos. A diferenciação dos monócitos para macrófagos, e suas posteriores respostas, também vão depender dos estímulos recebidos nesse microambiente tumoral (RHEE, 2016). Tais respostas serão melhor detalhadas nas próximas seções.

1.3.2 Funções, heterogeneidade e polarização

Os macrófagos exibem várias funções na resposta imune inata, sendo a primeira linha de defesa do organismo contra danos e patógenos. Além das funções na resposta imunes inata, é provável que os macrófagos induzam a resposta adaptativa, da mesma forma que as células dendríticas (HIRAYAMA; IIDA; NAKASE, 2018). Tais respostas se baseiam no reconhecimento de estruturas microbianas conservadas, chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os PAMPs são reconhecidos

pelos receptores de reconhecimento de padrões APC (PRR) (MOGENSEN, 2009; TAYLOR et al., 2005).

Além dos PRRs, os macrófagos apresentam uma ampla variedade de receptores de membrana que quando acionados por seus ligantes irão desencadear diferentes respostas. Entre esses receptores estão: a superfamília da imunoglobulina (Ig - Fc, TREM2, SIRPa, M-CSFR, Siglec, receptores CD200R), receptores “scavenger” (SR-A, MARCO, CD163, CD36, CD14), receptores de complemento (CR3, CR4), receptores do tipo Toll (TLRs), receptores de citocinas e quimiocinas, e lectinas do tipo C (receptor de manose, DC-SIGN, CD69). Os receptores “scavenger” e lectinas do tipo C estão envolvidas no reconhecimento de bactérias, na adesão, fagocitose e endocitose. A superfamília da imunoglobulina assim como os receptores de complemento atuam na fagocitose e endocitose de partículas opsonizadas. Já os TLRs detectam e amplificam a cascata de sinalização contra bactérias, além de reconhecerem uma ampla gama de ligantes endógenos e exógenos fundamentais na manutenção da homeostase, na defesa e na inflamação (LEY et al., 2016; TAYLOR et al., 2005).

Devido então ao papel exercido por essas células no organismo, e sua capacidade de reconhecer diferentes ligantes faz com que os macrófagos respondam a estímulos endógenos após uma lesão ou infecção, e a sinais liberados por outras células e liberados pelos próprios macrófagos. Essa alta plasticidade leva a formação de populações heterogêneas, com respostas efetoras diferentes, de acordo com os estímulos do microambiente em que se encontram. Foi proposto um sistema de classificação dessas diferentes polarizações (ou ativações), que é formado por dois fenótipos extremos: um fenótipo pró-inflamatório ou clássico, chamado de M1, e um anti-inflamatório ou alternativo, chamado de M2 (MILLS, 2015; MILLS; LEY, 2014).

1.3.3 Macrófagos M1 e macrófagos M2

Relacionada a funções inflamatórias e imunoestimulatórias, assim como a resposta antimicrobiana e antitumoral, a polarização para M1 ocorre, geralmente, em resposta a lesões ou infecções, sinalizadas por padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e ao dano (DAMPs) (Figura 3). Essa polarização também é induzida por LPS, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF e é induzida por altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (como, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, COX-2, IL-23 e etc), alta produção de óxido nítrico (NO) e de intermediários reativos de nitrogênio (RNS) e oxigênio (ROS), contribuindo no direcionamento de uma resposta inflamatórias. Além disso, macrófagos M1 expressam

altos níveis de MHC II, moléculas coestimuladoras como CD80 e CD86 (HUANG et al., 2018; RHEE, 2016).

Uma rede de fatores de transcrição e reguladores pós-traducionais estão envolvidos na polarização do M1. As vias canônicas de sinalização IRF/STAT que são ativadas por IFNs e TLRs, via STAT1, induzem a polarização M1 (WANG; LIANG; ZEN, 2014). Os macrófagos M1 regulam positivamente IRF5, o que induz a síntese de IL-12, IL-23 e TNF- α (WEISS et al., 2013). Já a via LPS/TLR4 desempenha um papel nessa polarização, através de STAT1- α/β independente de MyD88 (TOSHCHAKOV et al., 2002).

Os macrófagos M1 participam da eliminação de patógenos, através da ativação do sistema NADPH oxidase e consequente geração de ROS. ROS causa danos teciduais, o que prejudica a regeneração tecidual e a cicatrização. Para proteger contra esse dano tecidual, a resposta inflamatória deve ser inibida por mecanismos de regulação negativa de sinalizações inflamatórias e a regulação positiva de sinalizações envolvidas em respostas imunorregulatórias, de controle da inflamação conduzidas pelos macrófagos M2 (RHEE, 2016; SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

A polarização para M2 está associada a resolução da inflamação, na remodelação da matriz extracelular e reparo tecidual, na imunorregulação, angiogênese e na promoção tumoral (Figura 3). Estas podem ser induzidas por IL-4, IL-10, IL-13 e IL-33, citocinas Th2, além de TGF- β e outros sinais. M2 secreta citocinas que contra balançam a inflamação como TGF- β , IL-10, CCL18 e a quimiocina CCL22 (HUANG et al., 2018).

IL-4 e IL-13 atuam via STAT6 através da ativação do IL-4R α . Já IL-10 leva a ativação de STAT3 através da ligação em seu receptor IL-10R. A IL-33 é uma citocina da família IL-1 e amplifica a polarização de M2 induzida por IL-13, caracterizada pela regulação positiva de Arg-1, CCL17 e CCL24. Outras proteínas também são expressas nesse fenótipo como MMP-9, Fizz-1, Ym-1, PD-L1, MRC1/CD206, CD163, dectina-1 e CD209 (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). Os altos níveis de Arg-1 influenciam no aumento da síntese de poliaminas, o que estimula o crescimento celular, formação de colágeno e reparo tecidual. Esses macrófagos estão envolvidos na imunossupressão e reestabelecimento da homeostase (ARLAUCKAS et al., 2018).

Os macrófagos M2 têm alta capacidade fagocítica, necessária para eliminação de detritos e células apoptóticas. Esta população também promove o reparo tecidual e a cicatrização, devido suas propriedades pró-angiogênicas e pró-fibróticas. Assim, tal

polarização atua atenuando a inflamação e impedindo uma resposta inflamatória crônica, além de também orquestrar a remodelação tecidual (FU et al., 2020).

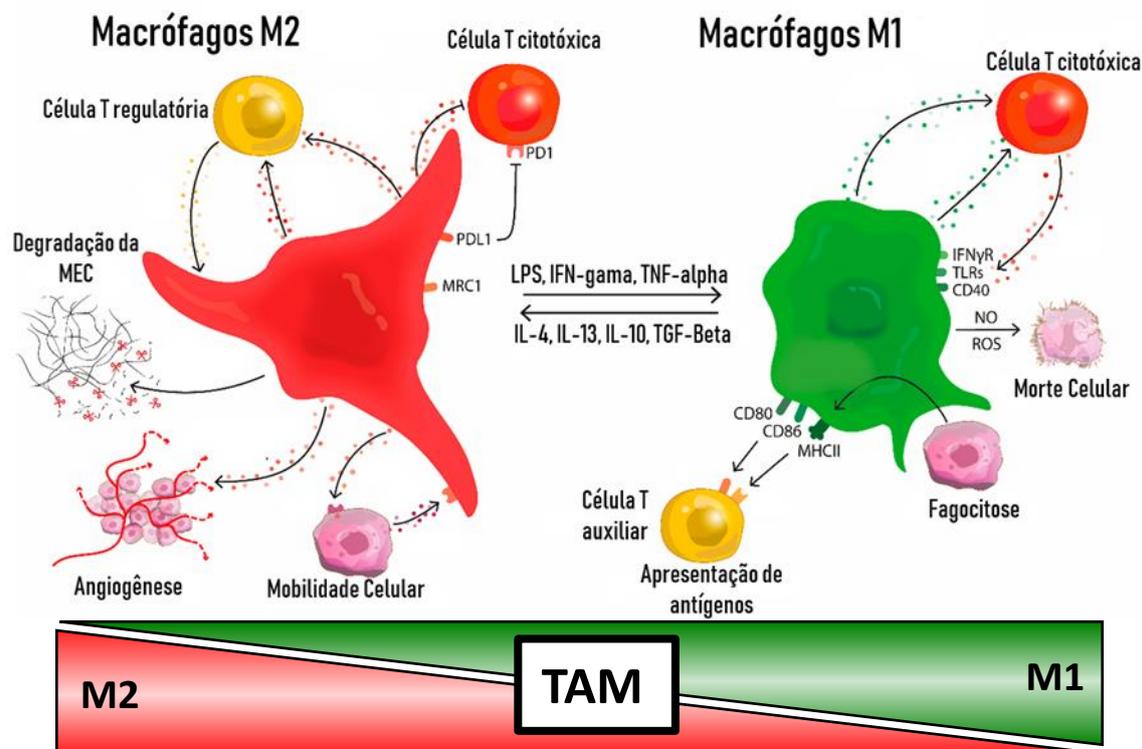


Figura 3. Os fenótipos M1 e M2 de macrófagos (adaptado): Enquanto o fenótipo M1 está envolvido em funções pró-inflamatórias, o fenótipo M2 está relacionado a funções de resolução da inflamação, evitando uma desregulação da resposta inflamatória (VAN DALEN et al., 2019).

1.3.4 Macrófagos associados a tumores

Os macrófagos encontrados no MT são conhecidos como macrófagos associados a tumores (TAMs), que desempenham papéis importantes e opostos, durante a evolução do tumor. TAMs contribuem para a resposta antitumoral, através da fagocitose e priming de células T (apresentação de antígeno ou sinais coestimulatórios), induzindo assim a resposta imune adaptativa (LECOULTRE; DUTOIT; WALKER, 2020).

Contudo, TAMs também podem contribuir na evasão tumoral do sistema imunológico. Essa evasão se dá através de moléculas imunossupressoras, como Arginase-1, TGF- β e IL-10. Portanto, o equilíbrio entre a atividade antitumoral e pró-tumoral dos macrófagos, influenciam diferentes características tumorais, como o crescimento, a resposta à terapia e a sobrevida dos pacientes (YANG et al., 2020b).

Muitos trabalhos demonstraram que uma maior densidade de TAMs está relacionada à malignidade tumoral, ao aumento da proliferação, a maior densidade de

vasos sanguíneos e maior número de células T regulatórias (Treg), que possuem função imunossupressora, inibindo a imunidade antitumoral (FACCIABENE; MOTZ; COUKOS, 2012). Portanto, quanto maior a presença de TAMs, pior o prognóstico clínico (LIU; JOSHI, 2020). Nos últimos anos, estudos vêm mostrando diferentes mecanismos de desenvolvimento tumoral, promovido por TAMs (Figura 4).

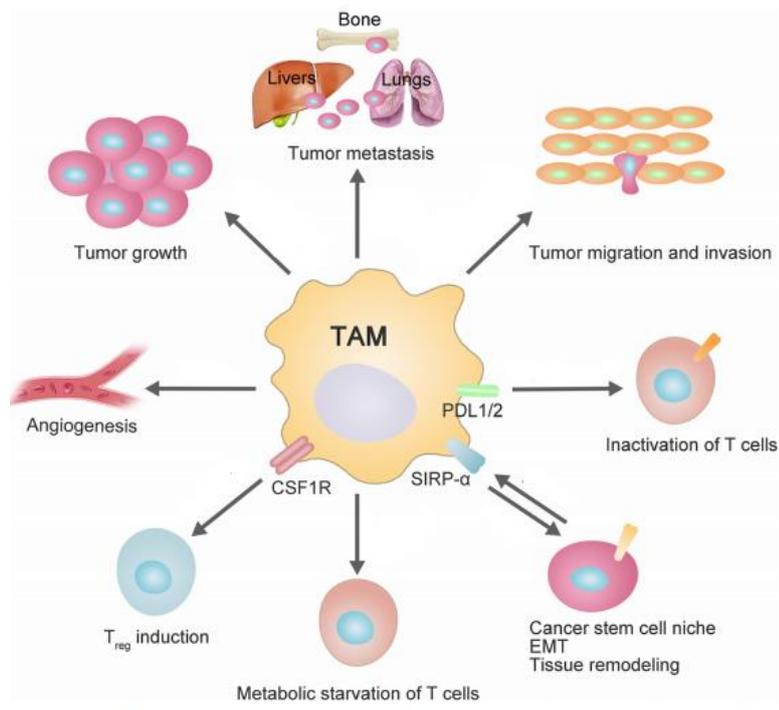


Figura 4. A importância de TAM no desenvolvimento tumoral: O desenvolvimento tumoral depende também da regulação promovida pelo MT e do cross-talk do tumor com outras células. Dentre essas, os macrófagos participam de uma série de funções pró-tumorais: crescimento tumoral, angiogênese, indução de imunossupressão (através da indução de Treg, e inativação de células T), remodelamento tecidual, EMT, migração, invasão e metástase. Todas essas essenciais para a promoção tumoral (MENZIES et al., 2017).

Tal variedade de mecanismos é possibilitada tanto pela heterogeneidade intrínseca dos macrófagos, como também pelas particularidades de cada MT, que por sua vez, vão depender do tipo tumoral. Assim TAMs possuem diferentes subpopulações dentro do MT, e suas características e respostas vão depender do contexto em que se encontram. É importante ressaltar que a classificação M1/M2, apesar de ser importante didaticamente é uma simplificação, e dependendo dos sinais do microambiente tumoral, os macrófagos podem facilmente transitar entre diferentes estados de polarização, variando entre fenótipo M1 e M2 (FU et al., 2020).

No entanto, os mecanismos de como os TAMs participam da tumorigênese, angiogênese, da resposta e resistência aos tratamentos, da migração, invasão, metástase e, também a imunossupressão, ainda não foram completamente elucidados. Neste trabalho o papel de TAMs na invasão e resistência a quimioterapia, dois aspectos importantes na metástase, foram estudados.

A quimioterapia é um dos tratamentos mais conhecidos e utilizados para cânceres sólidos. No entanto, parte das células tumorais são geneticamente resistentes aos quimioterápicos e/ou adquirem resistência ao longo tratamento (MANSOORI et al., 2017; MARINE; DAWSON; DAWSON, 2020). Estudos tem demonstrado que TAMs atuam ativamente no desenvolvimento da quimiorresistência, e sua inibição ou diminuição é suficiente para atenuar tal resistência *in vivo* e *in vitro* (CHEN et al., 2019).

Algumas das citocinas secretadas por TAM podem induzir programas anti-apoptóticos em células tumorais, como por exemplo a IL-6 (KONG et al., 2016), a IL-10 (RUFFELL et al., 2014) e a IL-34 (BAGHDADI et al., 2016). Tais citocinas já foram relatadas como mediadoras da resistência à quimioterapia em muitos tumores sólidos. Além desses, outros fatores secretados por TAM já foram observados na mediação de resistência, como HGF, catepsinas B e S e TNF- α . A deposição de matriz extracelular por TAMs também promove a resistência tumoral à quimioterapia e radioterapia, remodelando e direcionando as interações entre células cancerosas e os macrófagos (CHEN et al., 2019).

Apesar dos avanços realizados na busca por melhores terapias, a opção mais utilizada para o tratamento do câncer é a quimioterapia. Assim, a quimiorresistência constitui um fator limitante no tratamento, visto que além de promover a metástase, pode promover recidiva da doença, impactando ainda mais a sobrevivência dos pacientes. A quimiorresistência desafia então a clínica e continua sendo o principal obstáculo para a terapia do câncer (ALFAROUC et al., 2015; BORST, 2012; HOUSMAN et al., 2014).

Portanto, elucidar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na aquisição de resistência é fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Atualmente, 90% das falhas na quimioterapia são consequência da invasão e metástase tumoral relacionada à resistência aos tratamentos (CONDEELIS; POLLARD, 2006; LIN; XU; LAN, 2019).

TAMs desempenham um papel crucial em todas as etapas do processo metastático (LIN; XU; LAN, 2019). A MEC serve como um arcabouço e como uma barreira para a migração de células. Assim sua degradação é necessária para que as células tumorais

atinjam a circulação. Nos estágios iniciais da tumorigênese, os macrófagos são encontrados em pontos de ruptura da membrana basal, o que sugere que as células tumorais exploram as capacidades de remodelação da matriz dos macrófagos, permitindo assim que essas saiam do sítio primário e migrem através do estroma circundante (LIN; XU; LAN, 2019) Os TAMs podem facilitar esse processo através da secreção de MMPs, serina proteases e catepsinas, que possibilitam a disrupção da membrana basal através da modificação de junções célula-célula. Contudo outras moléculas secretadas por TAMs já foram relacionadas à invasão, como TGF- β , MIP-1 β , CCL18, S100A8 e S100A9. Um outro mecanismo de promoção da invasão é o loop de sinalização parácrina EGF/CSF-1, onde a liberação de EGF pelos macrófagos, um potente quimioatratador, é resultante da sinalização via CSF-1 sintetizado pelas células tumorais (LIN; XU; LAN, 2019; YANG et al., 2020a).

A transição epitelial-mesenquimal (EMT) das células tumorais é um processo também promovido pelos macrófagos que está associado tanto a quimiorresistência como a invasão (ARNAUD-SAMPAIO et al., 2020). A EMT é um processo onde as células adquirem um fenótipo mesenquimal, após a regulação negativa de suas propriedades epiteliais. O fenótipo epitelial é caracterizado pela polaridade apical-basal, e pelas junções celulares íntegras e as interações com a membrana basal. Durante a EMT, as células sofrem alterações na expressão gênica e nos mecanismos de regulação pós-traducional que levam à redução das características epiteliais e a conjunta aquisição das características mesenquimais (LI et al., 2019a). Assim as células exibem morfologia semelhante a fibroblastos, e têm sua capacidade migratória aumentada, o que frequentemente leva a aquisição de propriedades invasivas. A síntese de IL-10, TGF- β e CCL18 já foi associado a mecanismos de promoção de EMT, via TAMs (CAI et al., 2019; CHEN; TAN; WANG, 2018; SU et al., 2014)

1.4 Sinalização Purinérgica

A sinalização purinérgica, utiliza o ATP, nucleotídeos pirimidínicos e purínicos relacionados – mono, di e trifosfatados - e a adenosina como moléculas transmissoras e, semelhante a outros sistemas de sinalização que utilizam mensageiros extracelulares, tem componentes responsáveis pela liberação, recepção e inativação do mensageiro químico (Figura 5). O sistema purinérgico surgiu muito cedo na evolução: o mecanismo de liberação e de degradação de ATP operam em bactérias, e os primeiros receptores

específicos são encontrados em protozoários e algas (BURNSTOCK, 2018; VERKHRATSKY; BURNSTOCK, 2014).

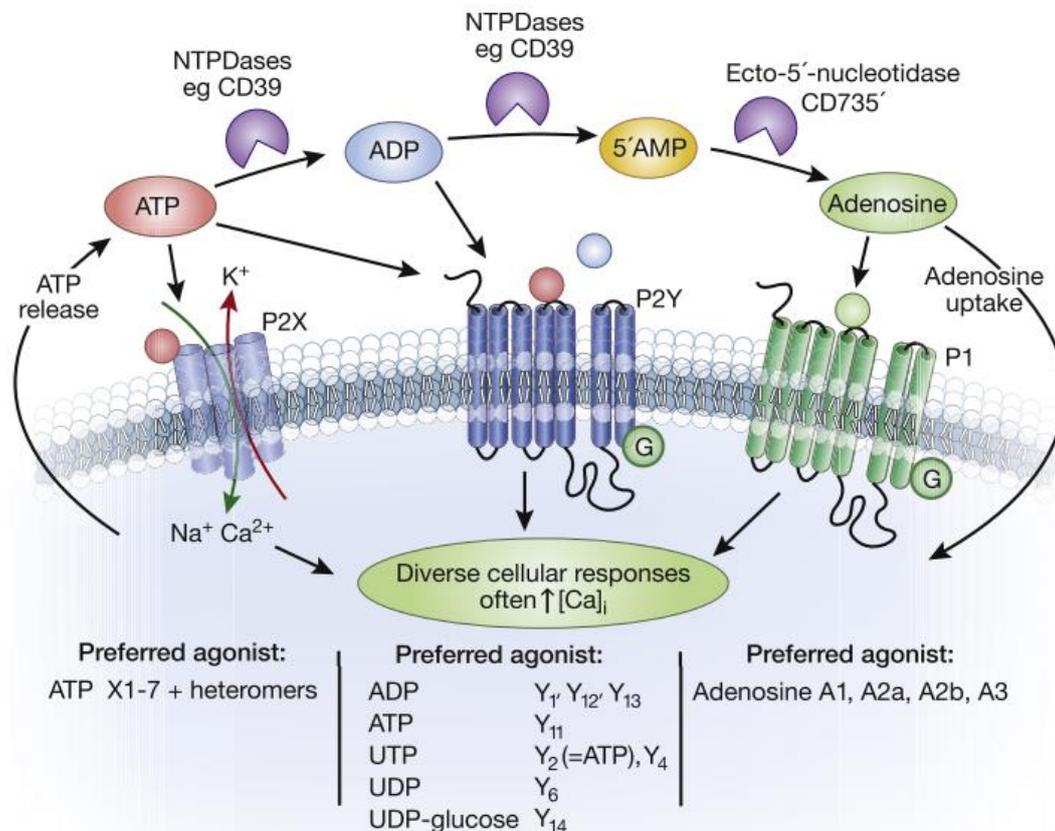


Figura 5. A sinalização purinérgica: O ATP extracelular é reconhecido pelos receptores P2, e ADP, UTP, e UDP são reconhecidos pelos receptores P2Y. Já a adenosina é reconhecida pelos receptores P1. As ectonucleotidasas localizadas na membrana plasmática catalisam a hidrólise sequencial de ATP extracelular em ADP, AMP e adenosina. P2X são canais catiônicos triméricos, não seletivos, que podem formar estruturas homo ou heteroméricas. Já os receptores P1 e P2Y são receptores transmembrana acoplados à proteína G (MENZIES et al., 2017).

A evolução subsequente desse sistema, resultou em uma diversificação substancial das cascatas de sinalização purinérgica. Novas classes de purinoreceptores e novas vias de liberação e de conversão dos mensageiros possibilitaram um controle mais refinado dos níveis extracelulares de transmissores purinérgicos (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015).

Moléculas do sistema purinérgico são expressas em praticamente todos os tipos de células e tecidos, onde medeiam uma gama surpreendentemente ampla de respostas fisiológicas e fisiopatológicas. Diversos mecanismos não neuronais e neuronais, incluindo respostas imunes, inflamação, vasodilatação, secreção exócrina e endócrina, envolvem sinalização purinérgica. A sinalização purinérgica de longo prazo está

associada aos processos de proliferação, diferenciação, motilidade e morte celular, como também aos processos de desenvolvimento, de regeneração, cicatrização, reestenose, renovação de células epiteliais, câncer e envelhecimento (VERKHRATSKY; BURNSTOCK, 2014). A onipresença da sinalização purinérgica a diferencia de outros sistemas que utilizam transmissores químicos na comunicação intercelular, já que este não tem segregação anatômica, nem funcional (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015; VIRGILIO; SARTI; COUTINHO-SILVA, 2020).

1.4.1 O ATP extracelular como DAMP

Organismos vivos são caracterizados por um sistema homeostático. Para a manutenção da homeostase no organismo, é necessária uma rede refinada de sensores que irão monitorar constantemente o ambiente interno, detectando qualquer alteração, como lesões e infecções. Dessa forma, o sistema homeostático precisa ser capaz de liberar uma série de mensageiros intracelulares, que irão sinalizar tais alterações (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015).

Uma maneira desenvolvida pela evolução de sinalizar danos, é um sistema onde um receptor de membrana específico, irá detectar uma molécula, normalmente encontrada intracelularmente, no microambiente em que se encontra. Um desses sinais, chamados de DAMP (padrão molecular associado ao dano) é o ATP. Em um microambiente saudável, o ATP é encontrado principalmente intracelularmente, onde alcança uma concentração de vários mM. Extracelularmente, a concentração de ATP é baixa, na faixa de nM (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015).

A liberação condutiva de ATP do citosol para o meio extracelular, é possível através de, resumidamente, três mecanismos. Um desses é através da necrose, uma forma inflamatória de morte celular, onde ocorre o rompimento da membrana celular, o que por sua vez leva à liberação de grandes quantidades de ATP, já que no citosol este é encontrado em grandes concentrações (IYER et al., 2009; JUNGER, 2011). O ATP liberado, serve então como um sinal “me encontre” que atrai células fagocíticas como os macrófagos, que medeiam então a remoção dos corpos necróticos (RAVICHANDRAN, 2011).

O segundo mecanismo é através da liberação vesicular de ATP. Grânulos especializados armazenam ATP e o liberam rapidamente por meio de fusão com a membrana plasmática (DOSCH et al., 2018). Tanto o armazenamento como a exocitose dependem de um transportador secundário ativo, VNUT (transportador vesicular de

nucleotídeos). VNUT garante o acúmulo de ATP no interior das vesículas através de gradiente eletroquímico de prótons (positivo no interior dos grânulos) gerado pela força motriz de V-ATPase (MIYAJI et al., 2011; SAWADA et al., 2008).

O último mecanismo de liberação de ATP é via canais permeáveis a este, presentes na membrana celular. Assim, em resposta à abertura das vias condutivas, e favorecidos pelo enorme gradiente de concentração intra/extracelular, ocorre a liberação de ATP. Atualmente são conhecidos cinco grupos de canais: hemicanais de conexina, panexina 1, modulador de homeostase de cálcio 1 (CALHM1), canais de ânions regulados por volume (VRACs) e canais maxi-ânions (MACs). Todos esses canais possuem permeabilidade aniônica e um grande poro condutor (DESAI; LEITINGER, 2014). O ATP é altamente solúvel em água e, portanto, rapidamente difusível no ambiente extracelular, onde é também rapidamente degradado (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015; VIRGILIO; SARTI; COUTINHO-SILVA, 2020).

Como mensageiro extracelular, o ATP é reconhecido pelos receptores P2, que por sua vez, são encontrados em todas as células. Assim, como DAMP, o ATP e seus receptores são ótimos sinalizadores de danos. A adenosina, produto da degradação de ATP, possui uma atividade imunossupressora, atuando então como um mediador de feedback negativo na sinalização (VIRGILIO; SARTI; COUTINHO-SILVA, 2020).

Nos macrófagos, e outras células da linhagem mieloide, o ATP extracelular, já foi associado a três respostas distintas: a primeira é com o ATP atuando como um fator quimiotático, atraindo tais células para esse microambiente; a segunda é com o ATP atuando como um sinal “me encontre” de células mortas e em apoptose, esse sinal auxilia na resposta fagocítica dos macrófagos; e a última é com relação a intensificação da resposta inflamatória pelos macrófagos, tanto na secreção de citocinas, como em diferentes respostas dentro da resposta imunológica (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015)

1.4.2 Receptores purinérgicos

Os receptores purinérgicos podem responder tanto ao ATP, como a nucleotídeos pirimidínicos relacionados (UTP, UDP) e a adenosina (Figura 5). Assim, esses foram divididos em duas famílias, com base em sua estrutura e propriedades farmacológicas.

A família de receptores P2 é composta pelas subfamílias P2XR e P2YR. Os sete receptores P2X são canais iônicos seletivos, homo- ou heterotriméricos, dependentes de ATP (ionotrópicos) e facilitam o efluxo de cátions extracelulares, incluindo o potássio. Embora todas as subunidades (P2X1 a P2X7) respondam a ATP, estes o fazem com

diferentes afinidades pelo ligante e diferentes cinéticas de ativação e dessensibilização. Dentre os P2X, é dada uma maior atenção ao subtipo P2X7, que será detalhado mais à frente. Já a subfamília P2Y, são receptores acoplados à diferentes proteínas G (são, portanto, metabotrópicos), e respondem a ATP, ADP, UTP, UDP ou UDP-glicose. Os oito receptores dessa família, também possuem seletividades diferentes por seus ligantes (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

A segunda família de receptores é a família P1, que compreende 4 receptores acoplados a proteína G. Tais receptores reconhecem a adenosina, e são classificados de acordo com seu acoplamento à adenilil ciclase, que por sua vez, age como um mecanismo de regulação dos níveis de AMP cíclico (cAMP)(RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Os receptores A1 e A3 estão acoplados à subunidade G *inibitória*, e sua ativação leva, portanto, a diminuição no nível de cAMP. Já os receptores A2A e A2B estão acoplados à subunidade G *estimuladora* e sua ativação resulta em um aumento no nível de cAMP. O receptor A2B também está acoplado às proteínas Gq, que auxiliam na atividade da fosfolipase C e na mobilização de cálcio intracelular. A afinidade desse receptor pela adenosina é menor, quando em comparação com os outros receptores P1, e por isso, A2B é ativado geralmente em estados patológicos, onde a concentração de adenosina é alta. Em geral, a ativação dos receptores P1, pela adenosina, se opõe às respostas celulares causadas pela ativação dos receptores P2(DWYER; KISHORE; ROBSON, 2020; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Basicamente, todos os subtipos de receptores P1 e P2 são expressos por células do sistema imune, de um modo dependente do tipo celular e dos diferentes estados de diferenciação que essas células possuem na resposta imunológica (RAYAH; KANELLOPOULOS; DI VIRGILIO, 2012). O papel dos receptores P2X na regulação imunológica é amplamente reconhecido. Evidências já demonstraram a expressão dos receptores P2X1, P2X4 e P2X7 em fagócitos mononucleares, como macrófagos, micróglia, neutrófilos e eosinófilos. Linfócitos T e B, e células NK também expressam esses três receptores (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015). No entanto, o receptor P2X, predominantemente associado a inflamação, é o receptor P2X7 (BURNSTOCK, 2016; DI VIRGILIO et al., 2001).

Os receptores P2Y acoplados a Gq e Gi e estão associados à quimiotaxia de macrófagos em resposta a gradientes de concentração de ATP (DESAI; LEITINGER, 2014). O subtipo P2Y2, desempenha um papel crucial nos macrófagos e outras células imunes no reconhecimento da localização de células mortas e em apoptose, que liberam

ATP (LEMKE, 2019; ZITVOGEL; KEPP; KROEMER, 2010). Esse receptor também já foi associado à resposta inflamatória, induzindo a síntese de IL-1 β (DE LA ROSA et al., 2020) e mediando a inflamação aguda (ADAMSON et al., 2018)

Receptores P1 são amplamente expressos em células imunes mieloides e linfoides (DI VIRGILIO; VUERICH, 2015). Tais receptores transmitem um sinal de “se acalme”, que orquestra a resolução da inflamação, um processo conceitualmente diferente de uma sinalização anti-inflamatória, que limita a iniciação do processo inflamatório, prevenindo a atração e migração de células imunes (DESAI; LEITINGER, 2014).

A sinalização de receptores P1 regula a diferenciação de monócitos para macrófagos e pode inibir a atividade fagocítica dessas células (EPPELL; NEWELL; BROWN, 1989). Além disso a adenosina extracelular, ligante desses receptores, foi associada a um aumento da polarização ao fenótipo M2, e tem múltiplos efeitos imunossupressivos no fenótipo M1 (CSOKA et al., 2012). A adenosina já foi associada a diminuição de vários mediadores inflamatórios como IL-12 (HASKO, 2000), MIP-1 (SZABÓ et al., 1998), INF γ (BARNHOLT et al., 2009), NO, superóxido e, o mais bem elucidado, TNF- α . A diminuição da síntese de TNF- α é mediada pelos receptores A2A e A2B (BELIKOFF et al., 2011; KRECKLER et al., 2006)

Além do bloqueio da síntese de mediadores pró-inflamatórios, a adenosina pode estimular a síntese da citocina anti-inflamatória IL-10, protegendo a homeostase do tecido normal ao evitar uma resposta inflamatória crônica. Esse aumento pode ser mediado via receptor A2A e A2B (CSÓKA et al., 2007; NÉMETH et al., 2005).

1.4.2.1 O receptor P2X7

Entre as sete subunidades de canais iônicos P2X, destaca-se o P2X7, um canal iônico trimérico, capaz de apresentar dois estados de permeabilidade acoplados e que, quando ativado, pode gerar uma variedade de eventos celulares, incluindo secreção de mediadores pró-inflamatórios, proliferação celular e apoptose. Esse receptor é ativado em concentrações na faixa de centenas de micromolar, e concentrações na faixa de milimolar, induzem a formação de poros de condutância, associados a apoptose (LIU et al., 2017).

O papel do receptor P2X7 em macrófagos M1 e M2 vêm sendo estudado, mas ainda não está elucidado. Vários artigos relacionam o receptor P2X7 à ativação de vias envolvidas na síntese e liberação de citocinas inflamatórias. Uma delas é a clivagem, via caspase-1 e inflamassomo NLRP3, de pro-IL-1 β em IL-1 β para sua posterior secreção. O

inflamassomo NLRP3 também ativa NF- κ B, o que leva à transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo os que sintetizam citocinas e quimiocinas (DI VIRGILIO et al., 2016; JACOB et al., 2013; PÉTRILLI et al., 2007; ZHANG et al., 2017b).

A ativação do receptor P2X7 pode levar à liberação de catepsinas, PGE2, fosfatidilserina e MMP-9, todas as quais estão implicadas em processos inflamatórios, angiogênicos e de extra/intravasamento de células. O aumento do ATP extracelular também pode desencadear, via P2X7, a ativação da enzima TACE e consequente liberação de TNF- α (GENIN et al., 2015). A degradação de ATP extracelular em adenosina constitui um potente sinal anti-inflamatório, e a ativação de receptores P1 resulta num aumento da polarização de macrófagos M2 o que, consequentemente, atenua a inflamação promovida pelo fenótipo M1 (BARBERÁ-CREMADES; BAROJA-MAZO; PELEGRÍN, 2016). A adenosina também afeta a secreção de TNF- α e aumenta a produção de IL-10 em macrófagos (DE TORRE-MINGUELA et al., 2016).

A sinalização do receptor P2X7, promovida por ATP, também vêm sendo associada na resolução da inflamação, em macrófagos M2. Tal sinalização leva à liberação do receptor do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), de CD14 e das anexinas A1, A2 e A4. Quando o receptor P2X7 é expresso em outras células imunes, como por exemplo as células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs) e células tumorais, o receptor P2X7 também pode exercer funções imunomoduladoras (GENIN et al., 2015).

Genin e colaboradores demonstraram através da quantificação de marcadores celulares de M1 e M2 que o ATP e a adenosina extracelulares resultam na maturação de macrófagos predispostos à polarização M2. Macrófagos expostos ao meio condicionado de glioma (cuja análise por HPLC mostrou a presença de grandes quantidades de ATP e seus metabólitos) apresentavam ativação de receptores P2X7 e A2A, e secretavam IL-10 e MCP-1. Essas, por sua vez, induziam a polarização dos macrófagos ao fenótipo M2. Estes estudos estabeleceram uma relação entre o fenótipo M2, a ativação de receptores purinérgicos e a liberação de citocinas anti-inflamatórias (JUNGER, 2011; VIRGILIO; SARTI; COUTINHO-SILVA, 2020).

1.4.3 A metabolização de ATP em adenosina

Mensageiros extracelulares devem ser facilmente concluídos, evitando uma superestimulação ou dessensibilização de seus receptores. Na sinalização purinérgica, o

ATP extracelular é catabolizado por poderosas ectonucleotidasas, convertendo rapidamente ATP em ADP, AMP e adenosina, removendo os fosfatos (Figura 5). Este processo termina a ativação dos receptores P2, evitando a dessensibilização dos receptores (HAMIDZADEH; MOSSER, 2016). Quatro famílias de ectonucleotidasas foram identificadas em células de mamíferos: (i) a família ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (ENTPD), (ii) a família ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (ENPP), (iii) fosfatase alcalina (APs) e, (iv) ecto-5'-nucleotidase (5'-NT, também conhecida como CD73). Um dos metabólitos gerados pela desfosforilação do ATP é a adenosina, um imunossupressor potente, que cumpre um requisito chave dos sistemas homeostáticos, ou seja, a produção de sinal de feedback negativo para atenuar e reverter a ativação exacerbada dos receptores P2 (HAMIDZADEH; MOSSER, 2016).

Em macrófagos, o ATP é catabolizado em duas etapas. Primeiro, o ATP é hidrolisado a AMP, pela E-NTPDase1, ou CD39, na superfície do macrófago, de maneira dependente de cátions. Na segunda etapa, AMP é convertido em adenosina pela ecto-5'-nucleotidase, ou CD73. A expressão dessas duas enzimas varia já que o estado de ativação dos macrófagos também varia, conforme o microambiente em que se encontra (ZANIN et al., 2012). Além disso, os níveis de expressão de ambas enzimas determina a concentração de adenosina encontrada no microambiente. Por exemplo, em condições de hipóxia, a funcionalidade de CD39 e CD73 aumenta aproximadamente 6 vezes em relação ao controle; já o cultivo prolongado de macrófagos não submetidos a hipóxia, diminuiu a expressão de CD73 (HAMIDZADEH; MOSSER, 2016; SYNNESTVEDT et al., 2002).

Macrófagos M1 apresentam uma leve diminuição na expressão de ambas ectonucleotidasas (CD39 e CD73) quando comparados a macrófagos não tratados. Já os macrófagos M2 apresentam maiores níveis das mesmas enzimas. Assim os macrófagos conseguem regular o catabolismo de ATP, ao mesmo tempo em que modulam seu perfil de resposta (ZANIN et al., 2012).

Estudos já demonstraram que o tratamento de macrófagos com ATP ou adenosina, induz a um fenótipo alternativamente ativado, M2, que apresenta baixos níveis de citocinas inflamatórias, e um aumento nos níveis de expressão de fatores relacionados à angiogênese e à resolução da inflamação (BARBERÁ-CREMADES; BAROJA-MAZO; PELEGRÍN, 2016; FERRANTE et al., 2013; HASKÓ; PACHER, 2012).

Também já foi relatado, que a hidrólise de ATP via a ectonucleotidase CD39, está associada a transição de polarização de macrófagos: de um fenótipo inflamatório para um imunorregulatório (ZANIN et al., 2012). Os macrófagos derivados de animais

nocauteados para CD39, não conseguem catabolizar ATP, o que promovia a síntese de citocinas inflamatórias por até 24h após a estimulação. Os animais *wild-type* no entanto não eram capazes de sintetizar tais citocinas por apenas algumas horas (COHEN et al., 2013). Com relação a enzima CD73, um estudo mostrou que a inibição dessa enzima não tinha um papel importante na polarização de macrófagos. Assim, parece que das duas enzimas envolvidas na hidrólise do ATP, o CD39 possui um efeito mais enfático, que o CD73, na polarização de macrófagos. (EICHIN et al., 2015).

1.4.4 Influência na invasão e quimiorresistência

A invasão é a primeira etapa da cascata invasão-metástase e consiste tanto na ruptura da membrana basal, através da modificação de junções célula-célula, como na transformação das células tumorais, via EMT, para aquisição de motilidade. Até agora, muito pouco se sabe sobre o envolvimento da sinalização purinérgica na invasão de células tumorais, mediada por TAMs. Dos trabalhos realizados até agora, dois receptores foram relacionados à invasão tumoral promovida por macrófagos: P2X7 e P2Y2.

O receptor P2X7 já foi associado à remodelação da MEC e na promoção da invasividade tumoral, através da síntese e ativação de catepsinas e MMPs (LOPEZ-CASTEJON et al., 2010; XIA et al., 2015; YOUNG et al., 2018). A sinalização Wnt/ β -catenina também é importante para a proliferação tumoral, a invasão, metástase, e também, na aquisição de características de células-tronco (YUAN et al., 2020; ZHANG; WANG, 2020).

Os TAMs ativados por células tumorais (câncer de cólon) são capazes de secretar IL-1 β , uma citocina inflamatória, de forma dependente do receptor P2X7. A ativação desse receptor bloqueia a fosforilação de β -catenina, o que leva ao seu acúmulo. Tal acúmulo leva então a transcrição de genes relacionados a Wnt (KALER; AUGENLICHT; KLAMPFER, 2009). O ATP extracelular também auxilia a invasão tumoral através da via P2Y2/ β -catenina que eleva os níveis de β -catenina, e conseqüentemente, de CD44, c-Myc e Ciclina D1 (ZHANG et al., 2017a).

Uma pequena parte das células que iniciam o tumor possui capacidade de auto-renovação, as chamadas células-tronco cancerosas (CSCs). A quimiorresistência tumoral é frequentemente associada as CSCs. Tais células podem evitar a apoptose, causada pelos quimioterápicos, sendo resistentes. Essa resistência pode levar a recidiva metastática, permitindo que o tumor progrida mesmo após a terapia (ABDULLAH; CHOW, 2013).

Existem diferentes mecanismos moleculares que permitem que as células evadam os efeitos citotóxicos da terapia, como a EMT, processos que regulam a disponibilidade de droga, e vias de sinalização oncogênica. Tais mecanismos são responsáveis pela manutenção de um fenótipo altamente quimiorresistente (ARNAUD-SAMPAIO et al., 2020).

A inflamação é um potente indutor da EMT em tumores, e várias correlações já foram observadas entre a ativação de macrófagos e a indução de EMT. O papel dos receptores P1 e P2 na EMT, também já foi observado (ARNAUD-SAMPAIO et al., 2020). A ativação do receptor P2X7 induziu aumento nos níveis de expressão de VEGF, um indutor de EMT (ADINOLFI et al., 2012) e o aumento na liberação de MMPs, promovido pelo receptor P2X7 como já mencionado, também contribui para a EMT, através do processamento de pró-TGF- β e da proteólise de E-caderina (ZUCCARINI et al., 2017). TGF- β , é um clássico indutor da EMT, e é capaz de aumentar a expressão de CD73, favorecendo a degradação de AMP e a geração de adenosina (REGATEIRO; COBBOLD; WALDMANN, 2013).

Então já foi sugerido que os macrófagos têm capacidade de modular o fenótipo de células tumorais através do sistema purinérgico, através da indução da EMT. Contudo, como exatamente o sistema purinérgico influencia na indução de EMT, via macrófagos, ainda não está muito claro.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do receptor P2X7 nos fenótipos de macrófagos M1, M2 e TAM para invasividade e quimiorresistência de neuroblastoma.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção de diferentes polarizações de macrófagos de camundongos wild type (C57BL/6J) e de camundongos nocauteados para o receptor P2X7 (C57BL/6 P2rx7^{-/-}).
- Determinação da influência do receptor P2X7 na polarização de macrófagos.
- Determinação da influência do receptor P2X7 na expressão gênica de componentes do sistema purinérgico.
- Determinação da influência do receptor P2X7 na polarização de macrófagos polarizados para invasividade de células tumorais.
- Determinação do efeito do secretoma de diferentes perfis de macrófagos na quimioresistência de células tumorais.

3. Materiais e Métodos

3.1 Cultura de células

3.1.1 Cultivo de células L-929 e produção de meio condicionado

A diferenciação de macrófagos a partir de seus precursores da medula óssea ocorre através do estímulo com M-CSF (do inglês, macrophage colony-stimulating factor). Tal citocina é secretada por células L-929(ATCC® CCL-1™, tecido conjuntivo subcutâneo), uma linhagem de fibroblasto murino (CHO et al., 2014).

A linhagem L-929 foi cedida gentilmente pela Prof^a Dr^a Denise Morais da Fonseca, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (GE Healthcare Life Science) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina; 10,000 U/mL, Gibco™). Foram mantidas a 37° C e 5% de CO₂. Após atingirem a confluência, o meio foi trocado por RPMI 1640 não suplementado, e esse foi mantido por 7 dias. Depois, o meio condicionado foi coletado, centrifugado, filtrado e mantido a -80°C até sua utilização.

3.1.2 Isolamento, diferenciação, polarização e produção de meio condicionado de macrófagos derivados de medula óssea

Para a obtenção da cultura primária, camundongos isogênicos C57BL/6J e C57BL/6 P2rx7^{-/-} de 6 a 12 semanas, foram utilizados. Tais animais foram provenientes de biotérios diferentes: os animais *wild-type* do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e os nocauteados para o gene *p2rx7* do Biotério de matrizes de camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (P2rx7^{-/-}). Todos os procedimentos estão de acordo com a Comissão de Ética em Uso de Animais do Instituto de Química, sob o número 118/2018 (Anexo 1).

Os animais foram primeiramente anestesiados por via inalatória com isoflurano. Após, estes foram eutanasiados através de deslocamento cervical. Em seguida, os fêmures dos camundongos foram coletados. Após lavagem com PBS 1X gelado, a medula óssea foi separada e centrifugada a 1400 rpm por 10 min, a 4°C. Em seguida, as células foram suspensas e semeadas em placas de petri (90 mm) a densidades de 1x10⁷ células/placa, em meio RPMI suplementado com 5% SFB (GE Healthcare Life Science), 1% piruvato

de sódio (100 μ M, Gibco™), 1% aminoácidos não essenciais (100X, Gibco™), 1% antibióticos (10,000 U/mL, Gibco™), 1% L-glutamina (200 mM, Gibco™), 0,1% 2-mercaptoetanol (55 mM, Gibco™) e 20% de MC L929, por 7 dias. O meio de cultura foi completado no quarto dia de diferenciação. No sétimo dia, os macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) foram coletados em PBS 1Xgelado, centrifugados e semeados conforme descrito posteriormente (CORRALIZA et al., 1995; EL KASMI et al., 2008; SONOKI et al., 1997; ZHANG et al., 2009).

Após ressemeados, os macrófagos receberam então os tratamentos para as polarizações: para M0, RPMI 1640; para M1, LPS 100 ng/mL + IFN- γ 30 ng/mL; para M2, IL-4 20 ng/mL; e para TAM, 70% de meio condicionado (MC) célula de neuroblastoma ACN humano. Os tratamentos foram mantidos por 24 h (ADINOLFI et al., 2012).

Para obtenção de meio condicionado, após as 24h de tratamentos para polarização, os meios de diferenciação foram substituídos por RPMI 1640 e mantidos por mais 24h, antes de sua coleta e armazenamento.

3.1.3 Cultivo de células ACN e produção de meio condicionado

Como modelo *in vitro* de neuroblastoma metastático humano, células ACN, derivadas de metástase de medula óssea de neuroblastoma humano, foram empregadas. Duas sublinhagens foram cultivadas: células silenciadas e não silenciadas para o receptor P2X7. As células não silenciadas foram transfectadas com uma miscelânea de *small hairpin* RNAs e identificadas como células ACN *scrambled* (controle). As células silenciadas receberam o *small hairpin* RNA direcionado ao receptor P2X7 (shRNA1). Os procedimentos de silenciamento foram realizados na Universidade de Ferrara, Itália, por nossa colaboradora, Dra. Elena Adinolfi, conforme especificado na referência indexada (ARNAUD-SAMPAIO et al., 2020).

As ACNs foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB (GE Healthcare Life Science), 1% aminoácidos não essenciais (100X, Gibco™), 1% antibióticos (10,000 U/mL, Gibco™) e 500nM de puomicina. Os meios foram trocados a cada 48h, e as células mantidas a 37° C e 5% de CO₂.

Para a obtenção de meio condicionado, células ACN *scrambled* foram cultivadas em garrafas de 175 mm². Após atingirem a confluência, o meio de cultura foi trocado por

RPMI 1640 não suplementado e mantido por 24h. Após, o meio foi coletado, centrifugado (10 min, 1200 rpm), e armazenado em -80°C .

3.2 Ensaios de viabilidade celular

3.2.1 De macrófagos

Dois experimentos diferentes, em triplicata experimental, foram conduzidos para avaliar a sobrevivência celular dos macrófagos utilizados: um avaliando a viabilidade celular dos macrófagos após suas respectivas polarizações, e outro avaliando a viabilidade celular após as polarizações e os tratamentos com ATP e cafeína, utilizados nos ensaios de co-cultura indireta e invasão tumoral.

Para avaliar a viabilidade celular após as polarizações, MDMO *wild-type* e nocauteados para o receptor P2X7 foram semeados em placas pretas de fundo transparente, de 96 poços, com densidade de $6,25 \times 10^4$ por poço. Após 24h, os meios foram trocados por RPMI 1640 não suplementado, no qual permaneceram na ausência de soro fetal bovino por 2h. Os tratamentos especificados no item 3.1.2 foram aplicados pelas 24h subsequentes. Seguidamente, os macrófagos foram incubados com uma solução 1:10 do reagente de viabilidade celular, Alamar Blue TM (Thermo Fisher Scientific), em RPMI 1640. As células foram então mantidas a 37°C e 5% de CO_2 por 4h, e então a intensidade de fluorescência do reagente foi medida (comprimentos de onda de excitação/emissão 560/590 nm) no equipamento FlexStation® III (Molecular Devices).

No ensaio para avaliar o efeito de ATP e cafeína após as polarizações, os tratamentos, (i) meio RPMI 1640 (controle), (ii) ATP (1mM), e (iii) ATP (1mM) + cafeína (100 μM) foram adicionados, e mantidos por 48h. Em seguida, as células foram incubadas com Alamar Blue TM e, após, os dados de intensidade de fluorescência foram adquiridos.

3.2.2 De células tumorais

Células ACN *scrambled* e ACN shRNA1, expressando diferencialmente o receptor P2X7, foram usadas em dois ensaios diferentes de viabilidade celular. Em ambos, as células foram semeadas em placas pretas de fundo transparente, de 96 poços, com densidade de 1×10^4 por poço. Após 24h, os meios foram trocados por RPMI 1640 não suplementado, no qual as células permaneceram mais duas horas na ausência de soro fetal bovino.

Em um dos ensaios, os tratamentos foram: (i) meio RPMI 1640 (controle), (ii) ATP (1mM), e (iii) ATP (1mM) + cafeína (100 μ M), as mesmas drogas utilizadas nos ensaios de co-cultura indireta e invasão tumoral. Estes foram mantidos por 48h antes da incubação das células com a solução de Alamar Blue TM para mensuração da intensidade de fluorescência.

Os dados de fluorescência obtidos foram então analisados através do software GraphPad Prism 5. Primeiramente foi avaliado se os dados estavam distribuídos de maneira gaussiana. Após a constatação de distribuição normal, optou-se pela análise de variância bidirecional (Two-way analysis of variance) ou a análise de variância simples (One-way analysis of variance), seguidas do teste de Bonferroni.

3.3 RT-qPCR

Para a caracterização dos macrófagos obtidos, de duas distintas linhagens, um painel de marcadores moleculares foi selecionado, tanto de genes relacionados aos fenótipos M1 e M2, como genes relacionados à sinalização purinérgica. Na Tabela 1 estão listados os primers usados e suas sequências *forward* e *reverse*. A análise da expressão relativa desses genes foi feita através da RT-qPCR.

Precusores mielóides foram semeados (1×10^7 por placa) em placas de petri (10 mm²). Estes foram diferenciados e polarizados conforme seção 3.1.2. Após a polarização, as amostras foram coletadas em TRIzolTM (Thermo Fisher Scientific), e o RNA foi extraído conforme protocolo do fabricante. Após a purificação das amostras e eliminação do DNA genômico persistente na amostra com DNase, o DNA complementar foi sintetizado por transcrição reversa usando RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischer Scientific), também seguindo as recomendações do fabricante.

A reação de real-time foi preparada com Power SYBRTMGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers *forward* e *reverse* (100 nM), água ultrapura e as amostras de cDNA. O termociclador usado é do modelo Applied Biosystems Step One Plus. A reação consiste em 10 minutos a 95°C para ativação da DNA polimerase e 35 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação e 1 minuto a 60°C para anelamento, seguidos de curva de melting com leituras a cada 0,3°C. Ao todo, de 5 a 6 ensaios diferentes foram realizados, todos em triplicata experimental.

Tabela 1. Primers utilizados para análise da expressão gênica por RT-qPCR

Genes	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
Nos2	CAGGAACCTACCAGCTCACTCT	ATGTGCTGAAACATTCCTGTG
Tnf	ACCTGGCCTCTCTACCTTGT	GACCCGTAGGGCGATTACAG
Arg1	GAACCCAACCTCTTGGGAAGAC	GGAGAAGGCGTTTGCTTAGTT
Mrc1	TTTGCAAGCTTGTAGGAAGGA	CCAATCCACAGCTCATCATTT
P2rx7	GCACGAATTATGGCACCGTC	CCCCACCCTCTGTGACATTCT
P2rx4	CCCTTTCCTGCCAGATAT	CCGTACGCCTTGGTGAGTGT
P2ry2	CTGATCAGGTCCAGGGCAAT	GTATCCCAGTTCGTCCCCCT
Adora2a	TCCTCACGCAGAGTTCCATC	TACCCGTCACCAAGCCATTG
Adora2b	GGAACCGAGACTTCCGCTAC	GACTGAGAGTAGACTGCGCC
Entpd1	CACAGGGGTGGTGCAGCAGT	TCGGCCAGGTACGCACCGAT
Nt5e	AGGTGTGGACATCGTGGTGGGA	GGTACTTCCCCGCACGCAC
Gapdh	AGGTCGGTGTGAACGGATTTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

3.3.1 Análise dos dados de RT-qPCR

Para a comparação relativa da expressão dos genes estudados entre o grupo controle e os grupos tratados foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Para obtenção do primeiro valor de ΔC_t , subtraiu-se o C_t da amostra do gene utilizado como controle endógeno (GAPDH) do valor de C_t da amostra de cada gene analisado. O segundo ΔC_t foi obtido através da comparação do ΔC_t de cada amostra com o valor de ΔC_t da amostra de referência (controle), que é a amostra com que todas as outras serão comparadas. O segundo valor obtido foi então inserido como expoente negativo no fator 2, como na fórmula ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Os valores finais estão expressos nos gráficos como A. U. (*arbitrary units*, unidades arbitrárias). A amostra de referência sempre terá o valor de A.U =1 e as demais amostras, valores de A.U. relativos à amostra referência.

Os resultados dessa análise então foram analisados de forma binária. Assim, valores iguais ou acima de 0,5 A.U., serão considerados como genes expressos, e valores abaixo de 0,5 A. U. não serão considerados (limite está apresentado em forma de linha nos gráficos). Para avaliar a diferença entre as linhagens (WT x P2rx7^{-/-}), foi feito pré-teste de normalização, seguido de teste t., no software GraphPad Prism 5.

3.4 Ensaios de invasão tumoral em co-cultura indireta com macrófagos

MDMOs foram obtidos conforme seção 3.1.2 e semeados (1×10^5 por poço) em placas de 24 poços. Após as polarizações, o meio foi trocado e ATP (1mM) foi adicionado.

Simultaneamente, inserções (Corning® Transwell®) foram revestidas com 0,6% de gelatina, e as células ACN foram semeadas (5×10^4 células/inserção). Portanto, a placa continha macrófagos no poço inferior e células tumorais nas inserções. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata (Figura 6). No grupo controle, não havia macrófagos no poço inferior, consistindo apenas em células ACN na inserção.

As placas permaneceram incubadas a 37° C e 5% de CO₂ por 48h. Ao final, as células que invadiram a membrana foram fixadas por 30 minutos com PFA 4%, lavadas com PBS 1X e coradas com DAPI (1:10.000) por 15 minutos. O imageamento foi feito em microscópio de fluorescência acoplado ao sistema automatizado de aquisição TissueFAXS Plus®.

Após o imageamento, foi conduzida, através do software de análise StrataQuest (TissueGnostics), a contagem das células invasivas na membrana dos insertos. Os dados obtidos foram então plotados e as porcentagens de invasão em relação ao controle foram calculadas, seguida de uma nova porcentagem, em relação ao número de células tumorais semeadas, por inserto. Em seguida, conduziu-se pré-teste de normalização, seguido da análise de variância simples ou bidirecional, e teste de Bonferroni, no software GraphPad Prism 5.

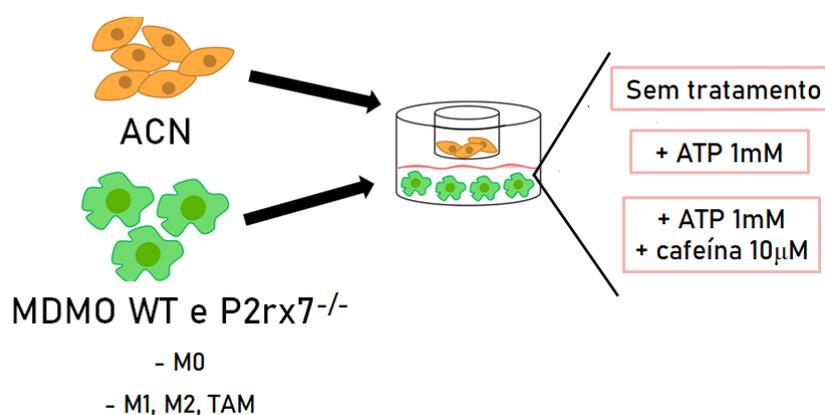


Figura 6. Esquema do ensaio de invasão tumoral em co-cultura indireta com macrófagos *wild-type* e *P2rx7^{-/-}*. Os macrófagos foram cultivados no poço inferior e as células de neuroblastoma nas inserções. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata. No grupo controle, não havia macrófagos no poço inferior.

3.5 Ensaios de quimiorresistência tumoral

Células ACN *scramble* de ACN shRNA1 (*P2X7⁺* e *P2X7⁻*, respectivamente), foram semeadas em placas de 96 poços pretas de fundo transparente, a uma densidade de 1×10^4 por poço. Após 24h, os meios foram trocados por RPMI 1640, no qual

permaneceram na ausência de soro fetal bovino por 2 h. As células foram tratadas com os meios condicionados de macrófagos na presença ou na ausência de vincristina (300nM) conforme mostrado na Figura 7. Em seguida, as células foram incubadas com Alamar Blue™ (Thermo Fisher Scientific) na proporção 1:10 em meio RPMI 1640, a 37° C e 5% de CO₂ por 4h. A intensidade de fluorescência foi medida (comprimentos de onda de excitação/emissão 560/590 nm) no equipamento FlexStation® III (Molecular Devices).

Os dados de fluorescência obtidos foram analisados através do software GraphPad Prism 5. Primeiramente, foi avaliado se os dados estavam distribuídos de maneira gaussiana. Após a constatação de distribuição normal, optou-se pela análise de variância bidirecional (Two-way analysis of variance) ou a análise de variância simples (One-way analysis of variance), seguido do teste de Bonferroni.

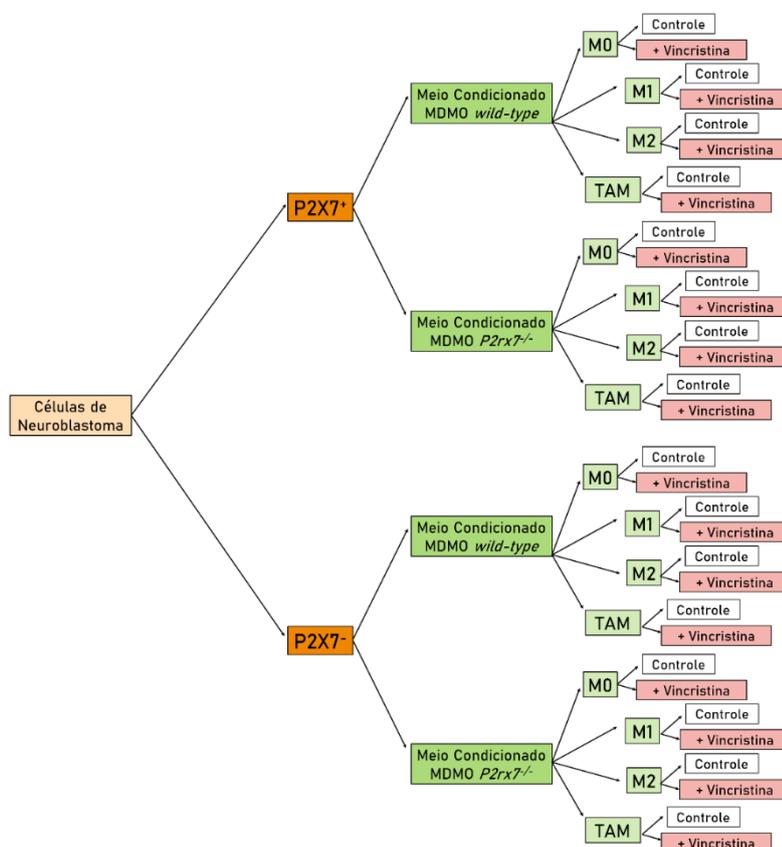


Figura 7. Esquema com tratamentos utilizados nos ensaios de quimiorresistência tumoral com células ACN P2X7⁺ e ACN P2X7⁻. As células ACN foram cultivadas e tratadas conforme o esquema para os ensaios de quimiorresistência tumoral.

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Para comparar mais de dois diferentes grupos experimentais, originados de uma mesma linhagem celular, foi utilizado a análise de variância com um fator ou com dois fatores (ANOVA de uma via e

ANOVA de duas vias) e como pós-teste a correção de Bonferroni. Para a comparação entre dois grupos experimentais, oriundos de diferentes linhagens, foi utilizado o teste t de Student. O software utilizado para as análises e construção dos gráficos foi o GraphPad Prism 5.

4. Resultados

4.1.1 Tratamentos para polarização não alteram viabilidade de macrófagos

Para avaliar a sobrevivência de macrófagos frente aos tratamentos para polarização, foram realizados experimentos de viabilidade celular. Assim, após as 24h de tratamento para as polarizações (M0, RPMI 1640; M1, LPS 100 ng/mL + IFN- γ 30 ng/mL; M2, IL-4 20 ng/mL; e TAM, 70% de meio condicionado das células de neuroblastoma humano, ACN) foi avaliada a porcentagem de viabilidade celular das células.

Os resultados demonstraram que os diferentes tratamentos empregados para as polarizações M1, M2 e TAM não levaram a uma diminuição da viabilidade celular comparado ao controle M0 (Figura 8). A ausência do receptor P2X7 não influenciou na viabilidade de MDMO $P2rx7^{-/-}$, apresentando valores próximos aos obtidos com os MDMO *wild-type* (Figura 8).

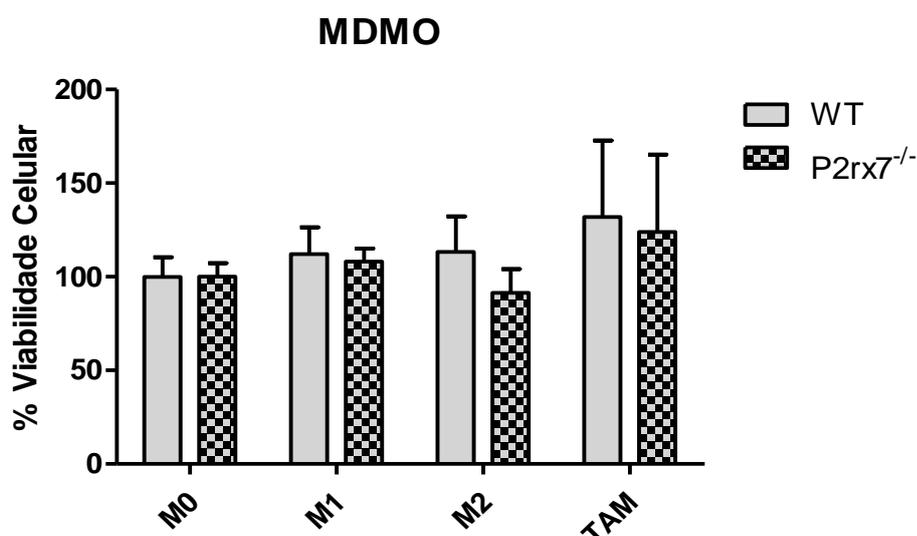


Figura 8. Análise da viabilidade de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos *wild-type* e $P2rx7^{-/-}$. A intensidade de fluorescência após incubação com alamarBlue™ foi quantificada e os valores plotados são relativos a macrófagos *wild-type* (barras não preenchidas com padrão) e macrófagos $P2rx7^{-/-}$ (barras preenchidas com padrão), polarizados para M1, M2 ou TAM (polarizados com MC de células ACN de neuroblastoma humano) comparados ao controle, M0. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.

4.1.2 ATP induz morte de macrófagos via receptor P2X7, enquanto células de neuroblastoma são resistentes

A viabilidade dos MDMOs também foi avaliada na presença de ATP, agonista dos receptores purinérgicos P2, e de cafeína, um antagonista dos receptores adenosinérgicos P1, ambos tratamentos empregados nos ensaios de invasão tumoral em co-cultura indireta com macrófagos. Os dados mostram que o tratamento com 1mM de ATP reduziu em cerca de 50% a viabilidade dos MDMO *wild-type* quando comparado ao controle de cada grupo tratado (Figura 9A). A cafeína não reverteu esse efeito, demonstrando que parece não haver relação com a sinalização adenosinérgica. Contudo, a viabilidade de MDMOs derivados de animais *P2rx7^{-/-}* não foi alterada com a mesma concentração de ATP, e a cafeína também não produziu alterações (Figura 9B). Esses resultados demonstram o importante papel do P2X7 na morte dos macrófagos, já que a ausência deste receptor preveniu a morte de MDMO induzida por ATP.

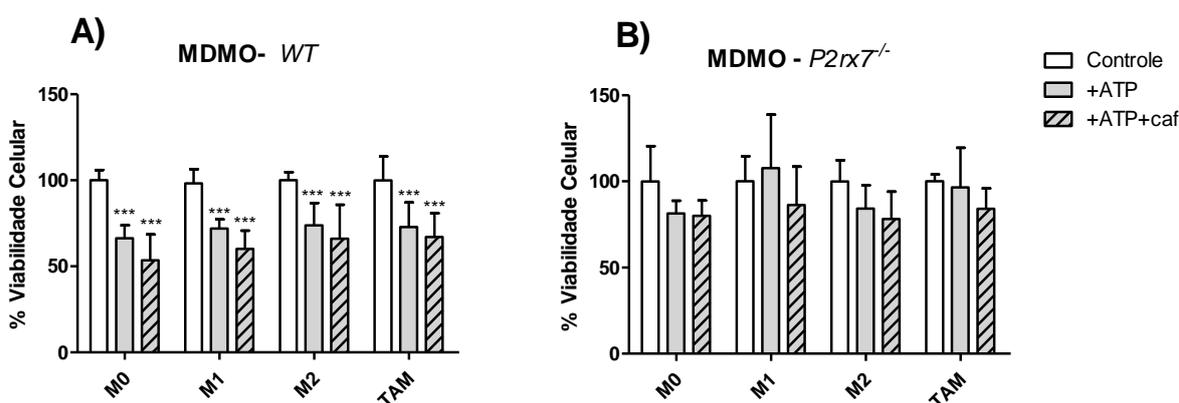


Figura 9. Análise da viabilidade de macrófagos tratados com ATP e cafeína.

A intensidade de fluorescência após incubação com alamarBlue™ foi quantificada e os valores plotados são relativos aos macrófagos A) *wild-type* e B) *P2rx7^{-/-}* polarizados para M1, M2 ou TAM (polarizados com MC de células ACN de neuroblastoma humano) tratados com ATP (1mM) ou ATP (1mM) + cafeína (10μM) comparados ao controle, M0. Os dados representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes para *wild-type* e 2 experimentos independentes para *P2rx7^{-/-}*, todos realizados em triplicata. Para a análise estatística dos dados foi utilizado a análise de variância com dois fatores (***) $p < 0,001$.

A influência do ATP e da cafeína na viabilidade de células ACN de neuroblastoma humano também foi avaliada. Diferentemente dos MDMO, a viabilidade das células tumorais não foi reduzida com o tratamento com 1mM de ATP, assim como a cafeína, indicando um mecanismo de resistência a morte celular induzida por ATP em neuroblastoma (Figura 10).

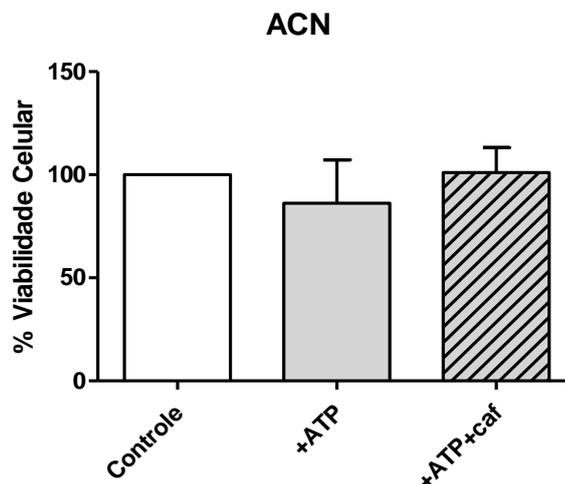


Figura 10. Análise da viabilidade de células de neuroblastoma (ACN) na presença dos tratamentos, ATP e/ou cafeína. A intensidade de fluorescência do alamarBlue® emitida pelas células foi quantificada e os valores plotados são relativos a células de neuroblastoma, comparados ao controle. Os dados representam a média \pm SD de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.

4.2 P2X7 influencia na polarização de macrófagos M2 e TAM, mas não de M1

Para confirmar se os tratamentos de polarização empregados estavam induzindo os fenótipos de macrófagos inflamatórios ou anti-inflamatórios, marcadores foram selecionados para análise de expressão gênica via RT-qPCR. Assim, Nos2 e Tnf foram usados como marcadores do fenótipo inflamatório M1, e para o fenótipo anti-inflamatório M2, foram usados Arg1 e Mrc1 (AZAMBUJA et al., 2019; HASKÓ; PACHER, 2012). Como critério de expressão dos marcadores, definimos os níveis de mRNA considerados positivos aqueles iguais ou maiores a 50% dos níveis das amostras de referência, ou seja, 0,5 A.U.

Primeiramente, os níveis de mRNA desses marcadores foram quantificados em MDMOs M0 e MDMOs polarizados para os fenótipos M1, M2 e TAM de camundongos *wild-type*. Conforme podemos observar na Figura 11 (A e B), M0 expressa Tnf e Mrc1,

um marcador de M1 e um marcador de M2; M1 expressa ambos marcadores de M1 (Nos2 e Tnf), e também Arg1, um marcador de M2; M2 expressa ambos marcadores para esse fenótipo (Arg1 e Mrc1); já TAM expressa apenas Arg1, marcador de M2. Dessa forma, podemos constatar que o protocolo e tratamento utilizados estão gerando diferentes fenótipos de macrófagos. Além disso, confirmamos que o tratamento para polarização para M1 levou a um fenótipo M1-like, enquanto o tratamento para M2 levou a um fenótipo M2-like.

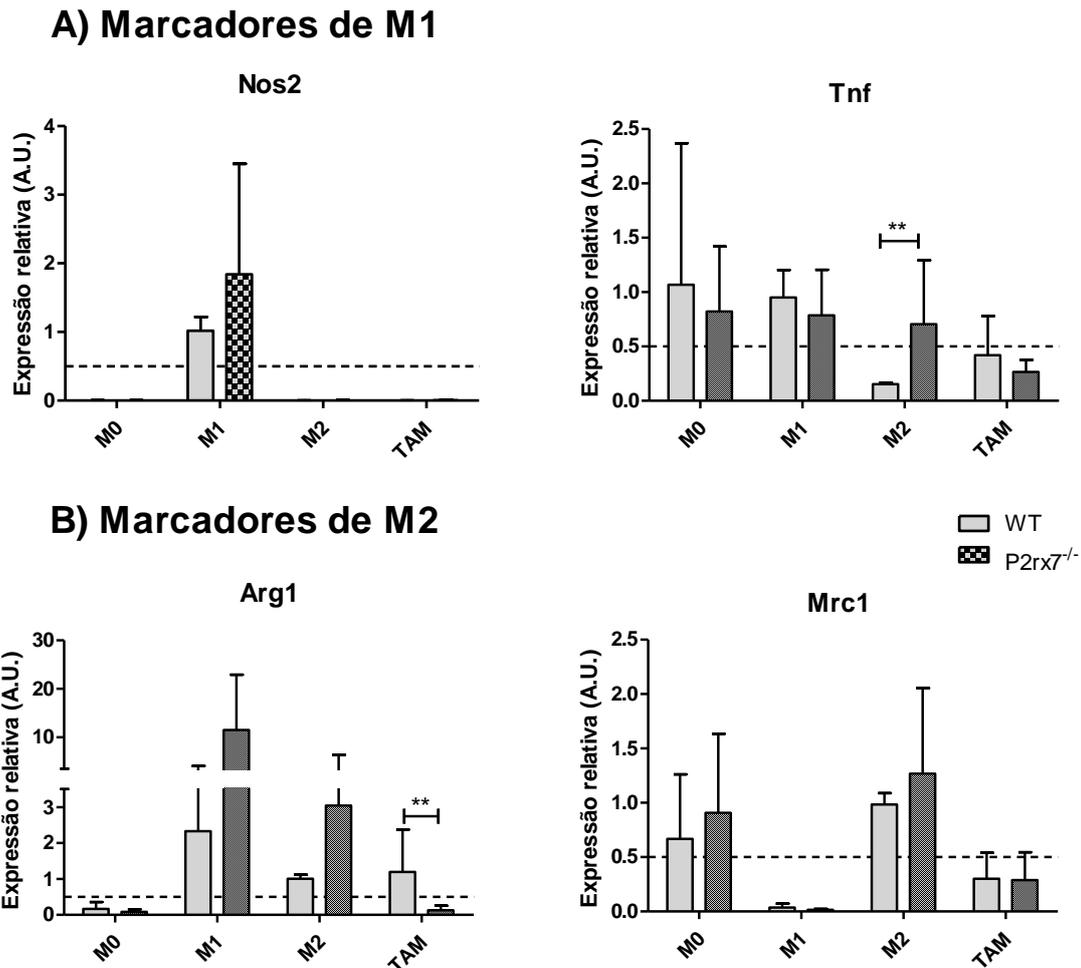


Figura 11. Avaliação da expressão de marcadores de polarização em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos *wild-type* e de camundongos *P2rx7^{-/-}*. Os níveis de mRNA dos A) marcadores de M1 (Nos2 e Tnf) e B) marcadores de M2 (Arg1 e Mrc1) em macrófagos M0 e induzidos às polarizações M1, M2 ou tratados com MC de células ACN de neuroblastoma humano (TAM) foram quantificados por qPCR. Os dados foram analisados de forma binária (expressam ou não expressam). Valores iguais ou acima de 0,5 A.U. foram considerados como genes expressos (limite está apresentado em forma de linha nos gráficos). Para avaliar a diferença significativa entre linhagens (*wild-type* x *P2rx7^{-/-}*) foram realizados testes t entre os pares. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Os marcadores de polarização também foram avaliados em MDMO M0 e MDMO polarizados para M1, M2 e TAM de camundongos *P2rx7^{-/-}* e comparados a expressão com seu correspondente MDMO *wild-type* (Figura 11 A e B). Enquanto M0 e M1 não apresentaram mudanças nos marcadores expressos, o fenótipo M2, além dos marcadores de M2, apresentou também expressão de Tnf; e TAM, que em *wild-type* expressa Arg1, em *P2rx7^{-/-}* não o expressa.

4.2.1 Sinalização purinérgica na polarização de MDMO, além do receptor P2X7

Cada vez mais evidências apontam que a inflamação crônica pode levar ao câncer, por isso defeitos na vigilância imunológica desempenham um papel central na biologia do câncer. O sistema purinérgico tem importante função na regulação da inflamação (ARNAUD-SAMPAIO et al., 2020), de modo que a ausência de um gene pode levar ao aumento da expressão de genes relacionados para compensar a função da proteína codificada pelo gene mutado ou deletado. O ATP extracelular recruta células imunes, assim como macrófagos e fagócitos, neutrófilos e células dendríticas, para o sítio inflamatório através da ativação dos receptores purinérgicos, P2X7 e também P2X4 e P2Y2 (MURPHY et al., 2017). Por outro lado, a metabolização do ATP pelas enzimas CD39 e CD73 favorece a geração de adenosina e consequente estímulo anti-inflamatório atuando através dos receptores P1 (DI VIRGILIO et al., 2018; TAKENOUCI et al., 2014). Enquanto a sinalização de adenosina mediada pelo receptor A2A tem um amplo efeito revertendo a ativação M1, o receptor A2B aumenta a polarização para M2 (HUI; CHEN, 2015).

Visto que nós observamos que a ausência de P2X7 não influenciou no fenótipo inflamatório de MDMOs, mas influenciou na polarização para fenótipos anti-inflamatórios, a expressão gênica dos receptores P1 (*Adora2a* e *Adora2b*); P2 (*P2rx4* e *P2ry2*); e das ectonucleotidasas *Entpd1* (CD39) e *Nt5e* (CD73) foi analisada em MDMOs *wild-type* e *P2rx7^{-/-}* para ajudar na compreensão dessas diferenças observadas.

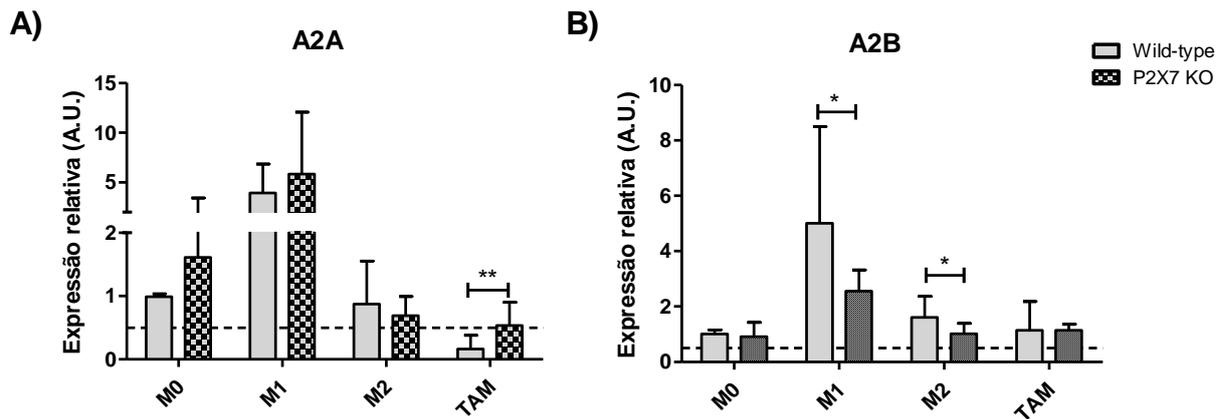


Figura 12. Avaliação da expressão dos receptores adenosinérgicos Adora2a e Adora2b em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos *wild-type* e *P2rx7^{-/-}*. (A) Os níveis de mRNA de Adora2a em macrófagos M0 e de macrófagos polarizados M1, M2 e TAM de camundongos *wild-type* e *P2rx7^{-/-}*, foram quantificados por qPCR. (B) Os níveis de mRNA de Adora2b em macrófagos M0 e polarizados M1, M2 e TAM de camundongos *wild-type* e *P2rx7^{-/-}* foram comparados ao fenótipo corresponde de MDMOs *wild-type*. Os dados foram analisados de maneira binária (expressam ou não expressam): valores iguais ou acima de 0,5 A.U. foram considerados como expressos (limite está apresentado em forma de linha tracejada nos gráficos). Para avaliar a diferença significativa entre linhagens (*WT x P2rx7^{-/-}*), foram realizados testes t entre os pares. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

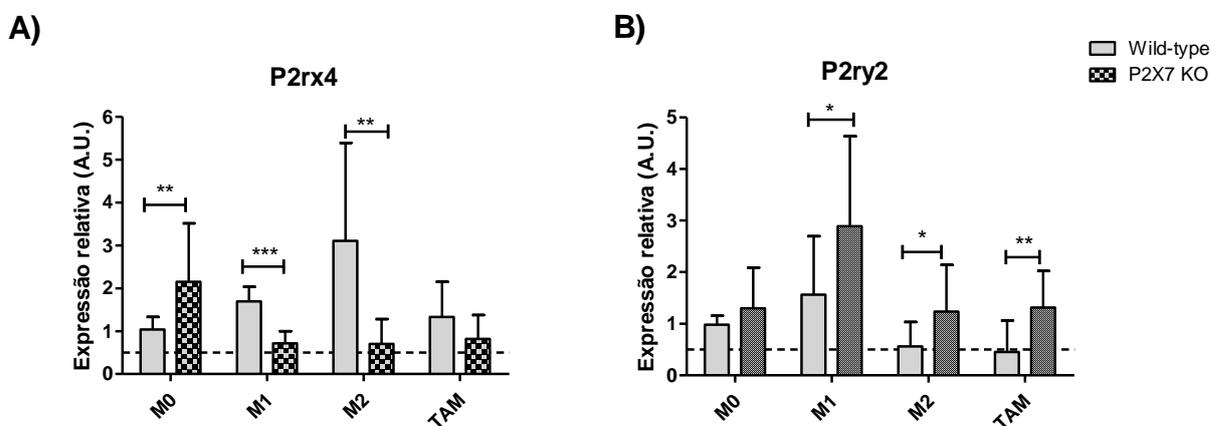


Figura 13. Avaliação da expressão dos receptores P2rx4 e P2ry2 em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos *wild-type* e *P2rx7^{-/-}*. (A) Os níveis de mRNA de P2rx4 em macrófagos M0 e de macrófagos polarizados, M1, M2 e TAM de camundongos *wild-type* e de camundongos *P2rx7^{-/-}*, foram analisados por qPCR. (B) Os níveis de mRNA de P2ry2 em macrófagos M0 e de macrófagos polarizados, M1, M2 e TAM de camundongos *wild-type* e de camundongos *P2rx7^{-/-}*, foram analisados por qPCR. Os dados foram analisados de maneira binária (expressam ou não expressam): valores iguais ou acima de 0,5 A.U. foram considerados como genes expressos (limite está apresentado em forma de linha tracejada nos gráficos). Para avaliar a diferença

significativa entre linhagens (*WT* x *P2rx7^{-/-}*), foram realizados testes t entre os pares. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Com relação aos receptores P1, observamos a expressão de Adora2a em todos os fenótipos, exceto em TAM *wild-type* (Figura 13A). Já as polarizações provenientes dos animais nocauteados para o receptor P2X7, todas apresentaram expressão, inclusive TAM (Figura 13A). Para Adora2b, todos os grupos apresentaram expressão em *wild-type*, com expressão significativa cinco vezes maior em M1, em relação ao controle (Figura 13B). Enquanto que na ausência de P2X7, houve uma diminuição significativa, de aproximadamente 50%, na expressão em M1, e de aproximadamente 60% em M2, quando comparados à mesma polarização em MDMO *wild-type*. Nos demais fenótipos a expressão não foi alterada (Figura 13B).

Considerando os receptores P2, observamos que o receptor P2X4 (*P2rx4*) é expresso em todos os fenótipos, sendo significativamente maior em M2 de *MDMO wild-type* (Figura 14A). No entanto, na ausência do receptor P2X7 houve uma significativa diminuição da expressão em M0, M1 e M2, mas não em TAM (Figura 14A). Com relação a *P2ry2*, observamos sua expressão em M0, M1 e M2 de *MDMO wild-type* (Figura 14B). Contudo, em *MDMO P2rx7^{-/-}* a expressão de tal receptor aumenta significativamente em todos os grupos, cerca de 185% para M1, 220% para M2 e 282% para TAM (Figura 14B).

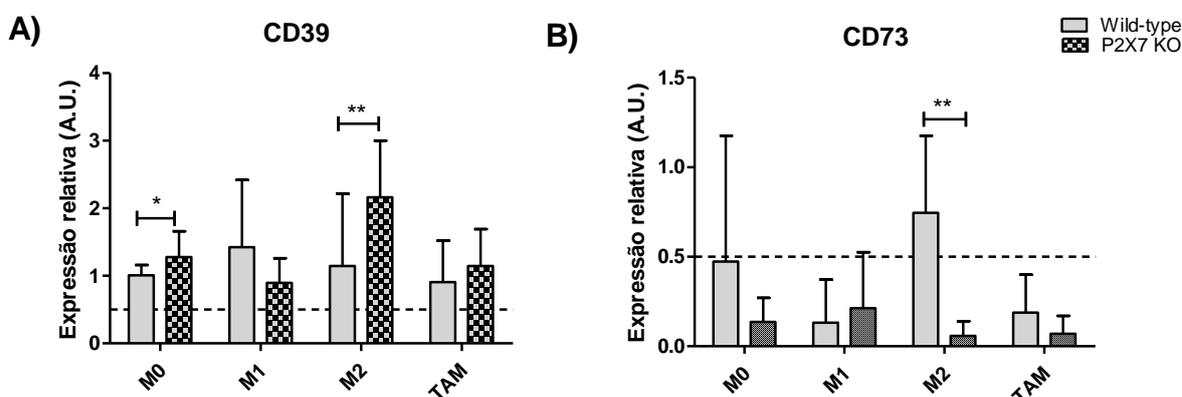


Figura 14. Avaliação da expressão das ectonucleotidases Entpd1 (CD39) e Nt5e (CD73) em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos *wild-type* e *P2rx7^{-/-}*. (A) Os níveis de mRNA de Entpd1 em macrófagos M0 e de macrófagos polarizados, M1, M2 e TAM de camundongos *wild-type* e de camundongos *P2rx7^{-/-}*, foram analisados por qPCR. (B) Os níveis de mRNA de Nt5e em macrófagos M0 e de macrófagos polarizados, M1, M2 e TAM de camundongos *wild-type* e de camundongos *P2rx7^{-/-}*, foram analisados por qPCR. Os dados foram analisados de maneira binária (expressam ou não expressam): valores iguais ou acima de 0,5 A.U. foram considerados como genes expressos (limite está apresentado em forma de linha tracejada nos gráficos).

Para avaliar a diferença significativa entre linhagens (*WT* x *P2rx7^{-/-}*), foram realizados testes t entre os pares. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Analisando as ectonucleotidases, verificamos que expressão da Entpd1 (CD39) foi uniforme entre os fenótipos de MDMO *wild-type* (Figura 15A), enquanto que a ausência do receptor P2X7 levou a um aumento de 188% na expressão dessa enzima no fenótipo M2 (Figura 15A). Já a ectonucleotidase CD73 (Nt5e) foi expressa no fenótipo M2 em MDMO *wild-type* (Figura 15B), mas foi significativamente inibida em MDMO *P2rx7^{-/-}* (Figura 15B).

4.3 Análise da invasividade tumoral em co-cultura indireta

Para avaliar se o receptor P2X7 expresso em macrófagos polarizados interfere na capacidade invasiva de células de neuroblastoma, foram realizados ensaios de invasão celular *in vitro* usando co-cultura indireta. Os experimentos também foram realizados na presença dos tratamentos: ATP (1mM) ou ATP (1mM) + cafeína (10 μ M). A escolha dessa concentração de ATP se deve à alta concentração de ATP extracelular (eATP) encontrada no microambiente tumoral, de até centenas de micromolares (LI et al., 2019b; POH; ERNST, 2018), além de considerar as altas concentrações necessárias para ativação do receptor P2X7 *in vitro* (na faixa de milimolares), visto que a afinidade de ligação do receptor por seu agonista é baixa (HUI; CHEN, 2015). Além disso, como a metabolização do ATP em adenosina é uma estratégia de regulação da sinalização purinérgica, a cafeína foi utilizada para bloquear os receptores P1 conjuntamente ao tratamento com ATP, para distinção entre os efeitos causados por ATP ou por seu metabólito, adenosina, na invasão tumoral.

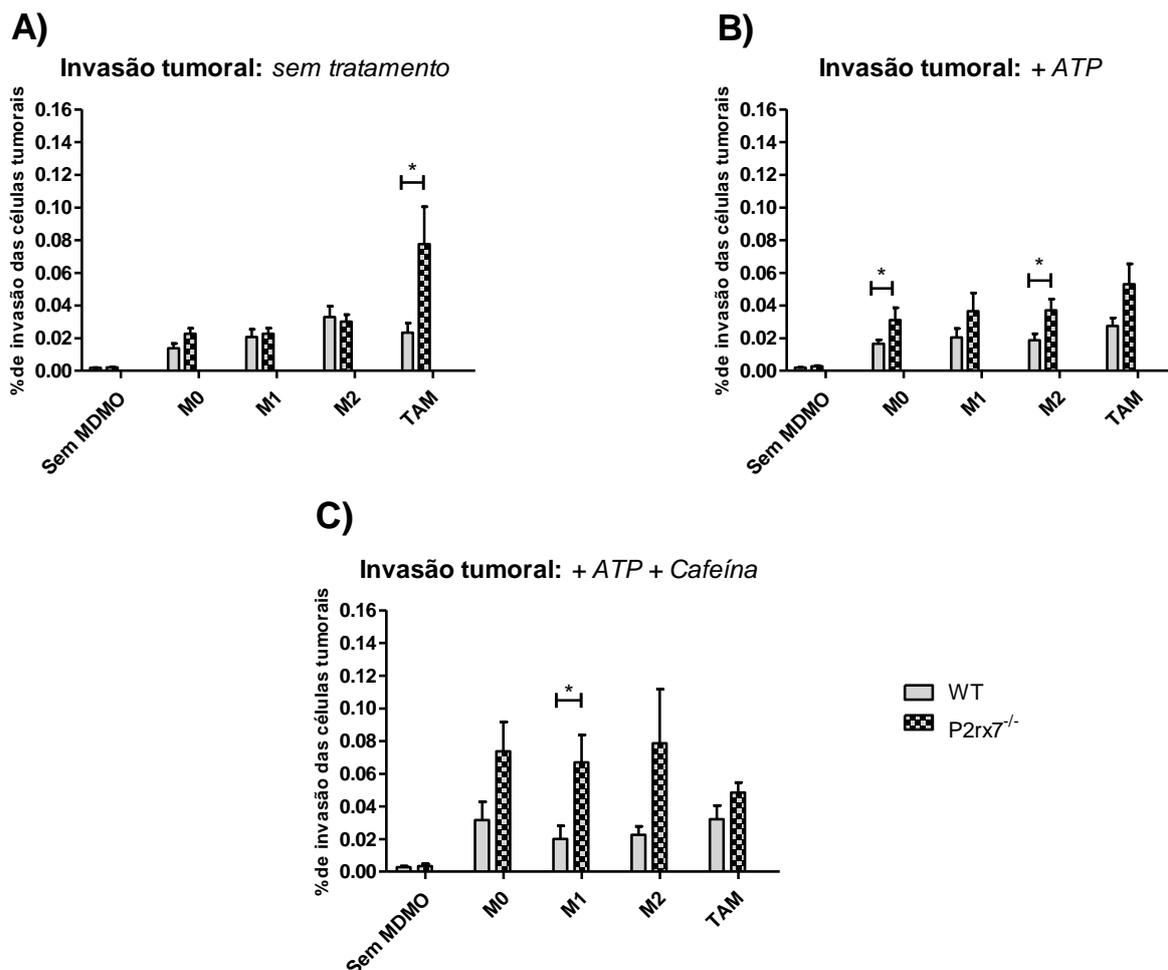


Figura 15. A invasividade tumoral promovida por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos wild-type e P2rx7^{-/-}. As células invasivas foram contadas e as respectivas porcentagens, em relação ao número inicial de células, foi calculado. Os dados foram analisados em relação ao controle (na ausência de macrófagos) por análise de variância de dois fatores, e pós teste Bonferroni. A) valores controles (sem tratamento), B) ensaio na presença de ATP (1mM), e C) ensaio na presença de ATP (1mM) e cafeína (10 μ M). Os dados representam a média \pm SD de 4 experimentos independentes para os ensaios conduzidos com ATP, 3 experimentos para wild-type tratados com ATP mais cafeína, e 2 experimentos independentes para P2rx7^{-/-} nos tratamentos com ATP mais cafeína. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Para a análise estatística dos dados foi utilizado a análise de variância com dois fatores para dados da mesma linhagem de macrófagos, e para avaliar a diferença significativa entre linhagens, foram realizados testes t entre os pares (**p<0,05; *p<0,01; ***p<0,001).

Os resultados mostram que a co-cultura indireta de células de neuroblastoma com MDMO *wild-type* promove a invasão tumoral e que a ativação dos macrófagos, já é suficiente na promoção da invasividade (Figura 16A). Embora a invasividade das células

de neuroblastoma ACN humano em co-cultura com MDMO P2rx7^{-/-} tenha sido similar em M0, M1 e M2, no fenótipo TAM nocauteado houve um aumento de cerca de 3,5 vezes na capacidade invasiva das células tumorais (de $0,02139 \pm 0,01997$ % em MDMO *wild-type* para $0,07751 \pm 0,07261$ % em MDMO P2rx7^{-/-}) (Figura 16A).

O tratamento com 1 mM de ATP não alterou a taxa de invasividade das células tumorais em co-cultura com MDMOs *wild-type* mantendo os valores próximos a 0,02% (Figura 17B), mas devemos considerar que tal tratamento reduziu em cerca de 60-70% a viabilidade dos MDMOs *wild-type*, enquanto que na ausência do receptor P2X7, tais células não tiveram a sobrevivência afetada com o mesmo tratamento (Figura 9). Sendo assim, se consideramos que a influência na taxa de invasão é diretamente proporcional ao a quantidade de macrófagos, podemos inferir que o estímulo dos MDMOs *wild-type* com ATP aumenta em cerca 2 vezes a taxa de invasão de neuroblastoma, similarmente ao que ocorre com MDMOs P2rx7^{-/-} (Figura 16B). ATP aumentou em cerca de duas vezes a capacidade invasiva das células de neuroblastoma quando em co-cultura com macrófagos P2rx7^{-/-} ativados quando comparado às co-culturas com WT correspondentes (Figura 16B). Esse aumento não foi inibido pela cafeína (Figura 16C), indicando a que a sinalização por ATP é importante para invasão tumoral – não a adenosinérgica –, mas não deve envolver o receptor P2X7 expresso em macrófagos. Quando as células tumorais foram co-cultivadas com TAM P2rx7^{-/-} estimulados com ATP, o aumento na taxa de invasividade não foi significativo como o observado para co-culturas não estimuladas com ATP. Isso indica que na ausência do receptor P2X7, outros receptores P2 devem ser acionados por ATP para inibir a invasão tumoral induzida por TAM P2rx7^{-/-}.

4.4 Análise da quimiorresistência tumoral

O tratamento com quimioterápicos leva à morte de células tumorais. Contudo, uma pequena parte das células desenvolve resistência a tais tratamentos, o que pode resultar em recidiva metastática, permitindo a progressão tumoral.

Assim, foram conduzidos ensaios de viabilidade celular na presença e ausência do quimioterápico vincristina em duas linhagens de neuroblastoma: uma não silenciada para o receptor P2X7 (P2X7⁺) e outra silenciada para P2X7 (P2X7⁻), tratadas MC de MDMOs *wild-type* ou P2rx7^{-/-} polarizados ou não para os fenótipos M1, M2 e TAM. A Figura 17 mostra os resultados obtidos com ambas as linhagens comparados aos respectivos controles (células não tratadas com MC, nem com vincristina).

A primeira observação é que os tratamentos com os MC de MDMOs *wild-type* e P2rx7^{-/-} polarizados M1 e M2 reduzem a viabilidade das células de neuroblastoma (Figura 17 A e B), e o tratamento adicional com o quimioterápico foi capaz de ampliar moderadamente esse efeito.

No entanto, a combinação dos tratamentos das células ACN com MC de M1, tanto *wild-type* como P2rx7^{-/-}, mais vincristina, indica que o MDMO M1-like aumenta a sensibilidade de células de neuroblastoma P2X7⁺ ao quimioterápico, já que o tratamento apenas com vincristina reduz a viabilidade das células tumorais para 63,1% nas células ACN P2X7⁺ e 64,5% nas ACN P2X7⁻ (Figura 17 A e B), mas quando tratadas com MC de M1 *wild-type*, a viabilidade celular foi reduzida para 46,4% e 59,3%, respectivamente.

Outra observação foi que a viabilidade das células ACN P2X7⁺ tratadas com meio condicionado de TAM *wild-type* não foi alterada, apresentando valores similares ao controle em P2X7⁺ (101,9%), assim como não alterou a resposta à vincristina (Figura 17A), enquanto que o tratamento com MC de TAM P2rx7^{-/-} resultou na diminuição da viabilidade de células expressando o receptor P2X7 (55%, Figura 17B). Tal diminuição na viabilidade não foi alterada na presença de quimioterápico, indicando assim que TAM P2rx7^{-/-}, afeta a viabilidade celular ao mesmo tempo em que promove à resistência a vincristina.

Contudo, na linhagem de neuroblastoma silenciada para o receptor P2X7 (ACN P2X7⁻), tanto o MC de TAM *wild-type* como de TAM P2rx7^{-/-} induziram a proliferação das células tumorais, uma vez que taxa de células viáveis aumentou para 178,3% na ausência de vincristina e 92,3% quando na presença do quimioterápico, uma diferença de 51,8% na presença de MC de TAM *wild-type* (Figura 17A) e para 186,8% na ausência de vincristina e com a adição do quimioterápico esse valor foi de 129,4% uma diferença de 67,7% na presença de MC de TAM P2rx7^{-/-} (Figura 17B).

Tais resultados indicam então, que os fenótipos M1 e M2, principalmente M1, de macrófagos levam à uma diminuição da viabilidade tumoral, e a perda do receptor P2X7 não afeta tal capacidade. Por outro lado, o fenótipo TAM tanto de MDMO WT como de MDMO P2rx7^{-/-} aumenta a capacidade proliferativa das células tumorais silenciadas para o receptor P2X7.

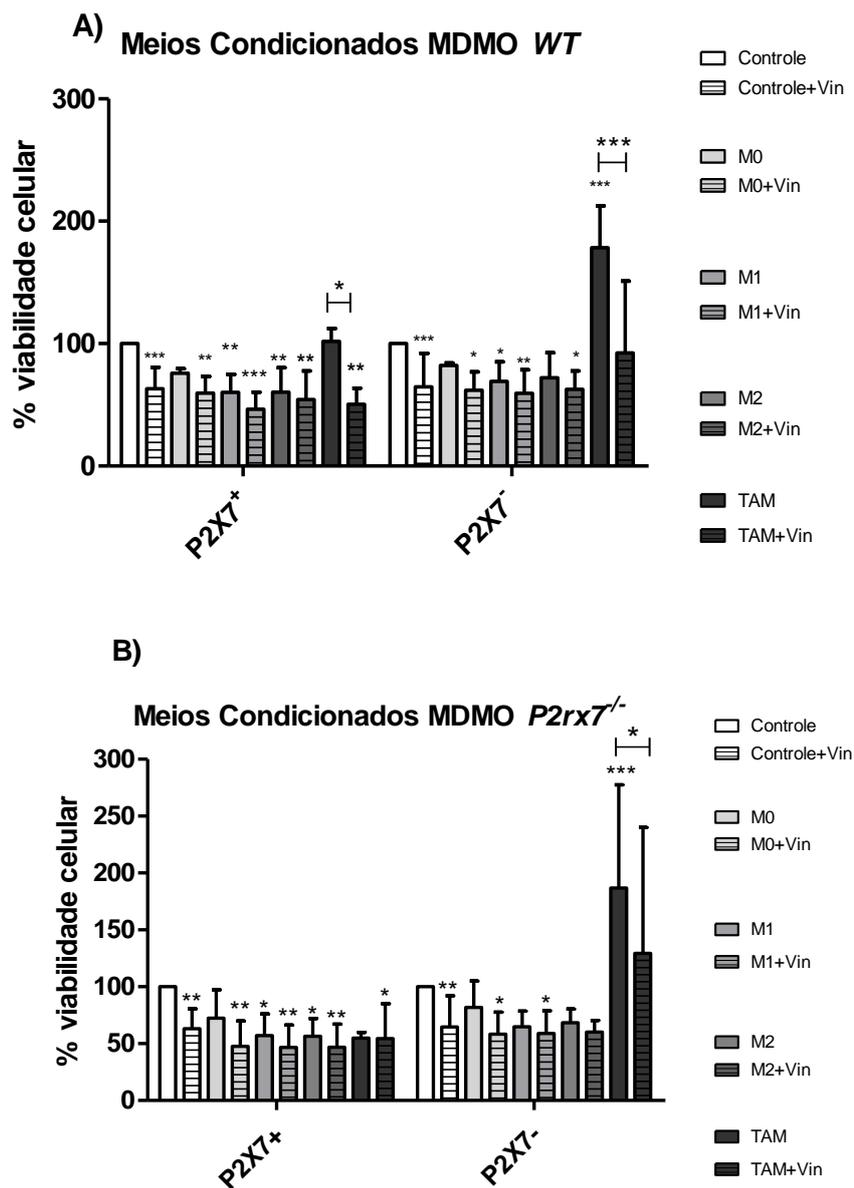


Figura 16. Quimiorresistência de células tumorais $P2X7^+$ e $P2X7^-$. A intensidade de fluorescência após incubação com alamarBlue™ foi quantificada e os valores plotados são relativos ao controle, células não tratadas. A) meios condicionados de camundongos *wild-type*, e B) meios condicionados de camundongos $P2rx7^{-/-}$. Os dados representam a média \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes para os meios condicionados de TAM (ambas linhagens) e 3 experimentos independentes para os outros meios condicionados. Todos os experimentos realizados em triplicata. Para a análise estatística dos dados foi utilizado a análise de variância com dois fatores para dados da mesma linhagem de macrófagos, e para avaliar a diferença significativa entre linhagens, foram realizados testes t entre os pares (** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5. Discussão

Tumores sólidos consistem de células neoplásicas em proliferação, MEC, rede vascular e estroma circundantes, que compreendem diversos tipos celulares e componentes extracelulares. Esse conjunto complexo de fatores é denominado microambiente tumoral (MT) (HUI; CHEN, 2015). As características únicas do MT o diferenciam dos microambientes de tecidos saudáveis, o que é essencial na modulação da iniciação, progressão e metástase tumoral, como também na resistência às terapias (LI et al., 2019b; POH; ERNST, 2018)

Dentre os diferentes tipos celulares observados no MT encontram-se os macrófagos. Tais células mieloides imunes são as mais abundantes na maioria dos tumores humanos e murinos, e suas atividades podem ser anti ou pró-tumorigênicas (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018; VAROL; MILDNER; JUNG, 2015). Estas células possuem alta plasticidade, respondendo a uma ampla variedade de estímulos. Essa alta plasticidade leva à formação de populações heterogêneas, com respostas efetoras diferentes, de acordo com os estímulos do microambiente em que se encontram. Assim, foi proposto um sistema de classificação para as diferentes polarizações que os macrófagos podem assumir, que é formado por dois fenótipos extremos: um fenótipo pró-inflamatório ou clássico, chamado de M1, e um anti-inflamatório ou alternativo, chamado de M2 (HUANG et al., 2018; SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

Os macrófagos encontrados no MT, os TAMs, desempenham papéis importantes e opostos durante a evolução do tumor. Os TAMs se originam dos monócitos circulantes, que por sua vez, são derivados de células-tronco hematopoéticas da medula óssea (RHEE, 2016). Os monócitos são recrutados para os tecidos tumorais e, em seguida, diferenciam-se em TAMs. TAMs podem contribuir para a resposta antitumoral, através da fagocitose e priming de células T, induzindo assim a resposta imune adaptativa, como também podem contribuir para a evasão tumoral do sistema imunológico através de moléculas imunossupressoras (LECOULTRE; DUTOIT; WALKER, 2020; YANG et al., 2020b). Portanto, o equilíbrio entre a atividade antitumoral e pró-tumoral dos macrófagos no MT influencia diferentes características tumorais, como o crescimento, a resposta à terapia e também a sobrevida dos pacientes (ARNAUD-SAMPAIO et al., 2020). Neste trabalho, o papel de TAMs na invasão e resistência à quimioterapia, dois aspectos importantes na metástase, foram estudados.

O papel do receptor P2X7 em macrófagos M1 e M2 já foi observado e sua importância é notável, mas devido à multiplicidade de mecanismos envolvidos, este papel ainda não está definitivamente elucidado.

Até agora, muito pouco se sabe sobre o envolvimento da sinalização purinérgica na invasão de células tumorais, mediada por TAMs. Dos trabalhos realizados até agora, dois receptores foram relacionados à invasão tumoral promovida por macrófagos: P2X7 e P2Y2. O receptor P2X7 atua na remodelação da MEC e pode promover a invasão tumoral através da síntese e ativação de catepsinas e MMPs, e da sinalização Wnt/ β -catenina, amplamente implicada na proliferação tumoral, invasão e metástase; e também, na aquisição de características semelhantes a células-tronco (ARNAUD-SAMPAIO et al., 2020; YELDAG; RICE; HERNÁNDEZ, 2018). O receptor P2X7 induz também o aumento da expressão de VEGF, um conhecido indutor de EMT, além de participar de outras vias de sinalização que convergem para a EMT, como a fosforilação de ERK1/2, a via (PI3K)/Akt, e na liberação de MMPs, que aumentam a EMT através do processamento de pró-TGF- β e proteólise da E-caderina (ARNAUD-SAMPAIO et al., 2020).

Diante do exposto, a implicação dos receptores purinérgicos em respostas inflamatórias, na progressão tumoral e na polarização de macrófagos é evidente, e o receptor P2X7 vem surgindo como um alvo em potencial. Porém, os resultados e descobertas são ambíguos, já que sua ativação leva tanto a respostas inflamatórias quanto anti-inflamatórias dependendo do contexto. Os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre os tumores e o sistema imune, assim como a influência do sistema purinérgico na polarização de macrófagos associados a diferentes tumores, incluindo o neuroblastoma, ainda não estão totalmente esclarecidos. Tais esclarecimentos podem contribuir para o entendimento da biologia do câncer e para a caracterização de possíveis alvos terapêuticos.

Anteriormente, foi demonstrado na literatura que o receptor estudado neste projeto, o receptor P2X7, apresenta importantes funções na resposta imune (RAYAH; KANELLOPOULOS; DI VIRGILIO, 2012) e no crescimento tumoral (ADINOLFI et al., 2012). Animais nocauteados para o receptor P2X7 apresentam acelerado crescimento tumoral (ADINOLFI, 2014); entretanto, o bloqueio farmacológico do receptor inibe o crescimento tumoral *in vivo* (ULRICH et al., 2018). Esta diferença pode ser explicada pelos papéis diversos que o receptor exerce quando expresso em células tumorais ou em células do sistema imune. Similarmente, o transplante de enxertos tumorais expressando

o receptor P2X7 em animais nocauteados para o receptor ou em animais *wild-type* que receberam tratamento farmacológico sistêmico para inibição do receptor P2X7 apresentaram resultados opostos (DE MARCHI, 2019).

Assim, os objetivos deste trabalho consistiram em elucidar o papel do receptor P2X7 na polarização de macrófagos na presença e ausência de fatores secretados por células de neuroblastoma (meio condicionado), e sua influência em respostas celulares de grande relevância clínica, como capacidade migratória e quimiorresistência das células tumorais.

Para o desenvolvimento do presente trabalho, primeiramente foi analisado se os protocolos de obtenção e polarização dos macrófagos influenciavam na viabilidade celular dessas células, tanto as provenientes de animais *wild-type* como as provenientes de *P2rx7^{-/-}*. Assim foram conduzidos ensaios de viabilidade celular. Os resultados demonstraram que os diferentes tratamentos empregados para as polarizações M1, M2 e TAM não levaram a uma diminuição da viabilidade celular comparado ao controle. Tais observações propiciaram o prosseguimento do trabalho.

Em seguida, foi avaliado se os diferentes tratamentos empregados para as polarizações, levavam a polarizações M1 e M2-like, e se o receptor P2X7 influenciava nessa polarização. Assim, através do RNAm e da RT-qPCR, foram avaliados a expressão de *Nos2* e *Tnf*, marcadores do fenótipo M1, e também de *Arg1* e *Mrc1*, marcadores para o fenótipo M2. Os resultados mostraram que os tratamentos levaram a fenótipos M1-like e M2-like nos macrófagos *wild-type*. Também observamos que as alterações nos fenótipos M2 e TAM, e não em M0 e M1, de macrófagos nocauteados para o receptor P2X7, indicam o papel desse receptor na resolução da inflamação, já que M2 está relacionado a tais funções, assim como TAM, que foi múltiplas vezes na literatura associado à M2. Ambos fenótipos compartilham a capacidade de conduzir a remodelação tecidual e reduzir as respostas imunológicas, afetando a imunovigilância (LI et al., 2019b).

A expressão de Arginase-1 por macrófagos vem sendo relacionada a respostas imunossupressoras (ARLAUCKAS et al., 2018)(ALLARD et al., 2017; HAMIDZADEH; MOSSER, 2016). Assim, como o fenótipo TAM foi alterado devido à ausência de P2X7, atenuando a expressão de Arginase-1, sugerimos que o receptor P2X7 possa estar envolvido nas respostas imunossupressoras relacionadas a *Arg1*, e, portanto, sua perda pode comprometer as funções imunossupressoras dessas células. Além disso,

os dados também mostram que a ausência desse receptor na linhagem nocaute, não parece interferir na resposta inflamatória dessas células.

A expressão de Arg1, marcador de M2, em macrófagos M1, apesar de contraditória, já foi relatada nesse fenótipo antes, em vários outros vários estudos que demonstraram que o tratamento com LPS induz a expressão desse gene, através da sinalização dos receptores Toll-like (TLR), tanto em macrófagos derivados da medula óssea como em macrófagos peritoneais (DE LA ROSA et al., 2020). Apesar da expressão da Arg1, tal polarização para M1 apresentou as maiores expressões de ambos genes inflamatórios, portanto, confirmando o fenótipo M1-like. Avaliando o efeito do receptor P2X7, esperávamos obter uma atenuação de marcadores de M1 no próprio M1 de MDMOs P2xr7^{-/-} devido ao importante papel que P2X7 possui na inflamação, mas isso não foi observado. Essa observação pode ser devido a mecanismos de compensação emergidos nesses animais em resposta a perda de P2X7 (EL-BROLOS; STAINIER, 2017)

Apesar de ensaios explorando a resposta dessas células sejam necessários para tal confirmação, avaliamos se outros receptores P2 envolvidos na inflamação, assim como P2rx4 e P2ry2, estariam mais expressos em MDMOs P2xr7^{-/-} como um mecanismo de compensação. Apesar da expressão de P2rx4 não ter sido aumentada, observamos uma maior expressão de P2ry2 no fenótipo M1 de MDMO P2rx7^{-/-}. O receptor P2X7 é amplamente relacionado à ativação do inflamassomo NLRP3 e liberação de IL-1 β . Contudo, um estudo recente demonstrou que a ativação do receptor P2Y2 aumenta a transcrição de IL-1 β , mas tal aumento não se deve à ativação de NLRP3, e sim à ativação de JNK (DE LA ROSA et al., 2020). Assim sugerimos que o receptor P2X7 possa estar envolvido em um mecanismo compensatório para não alterar o fenótipo inflamatório, M1, de MDMO P2rx7^{-/-}. Como a inflamação é um processo complexo e muitos mecanismos envolvidos ainda precisam ser elucidados, não se pode descartar a possibilidade de tais observações serem resultado de outras sinalizações.

Verificamos uma diminuição na expressão de CD73 nos MDMOs M2 de P2xr7^{-/-}. Tais observações sugerem o papel do receptor P2X7 na regulação de CD39 e CD73 para regulação da metabolização de ATP de modo que a ausência do P2X7 contribui para a metabolização de ATP, com acúmulo de AMP, porém sem gerar adenosina. A diminuição na expressão de CD73 indica que M2, antes o único com o potencial de metabolização de ATP a adenosina, tem tal capacidade afetada quando na ausência de P2X7. Esses dados podem explicar a não supressão de Tnf no fenótipo M2 de MDMO P2rx7^{-/-}, uma vez que, CD73 desempenha esse papel em macrófagos, através da metabolização de ATP e

consequente ativação dos receptores de adenosina, principalmente A2A(MURPHY et al., 2017)

Além disso, a ausência do receptor P2X7 resultou em uma redução da expressão do receptor A2B, tanto nos macrófagos M1 quanto M2, novamente apontando para um desfavorecimento de fenótipos anti-inflamatórios, visto o papel deste receptor na promoção da polarização alternativa de macrófagos (HASKÓ & PACHER, 2012). Nos macrófagos polarizados pelo meio condicionado de neuroblastoma, a expressão de *arg1*, novamente um mediador anti-inflamatório, também foi suprimida, reforçando a importância do receptor P2X7 no estabelecimento dos fenótipos anti-inflamatórios.

A invasão é a primeira etapa da cascata invasão-metástase e consiste tanto na ruptura da membrana basal, através da modificação de junções célula-célula, como na transformação das células tumorais, via EMT, para aquisição de motilidade. Para avaliar a influência das diferentes polarizações de macrófagos, e do receptor P2X7, na invasão de neuroblastoma, ensaios de invasão celular *in vitro* usando co-cultura indireta, foram feitos. Tal ensaio também foi conduzido na presença de ATP – para avaliar a ativação do receptor P2X7 – e também na presença de ATP e cafeína - foi utilizada para bloquear os receptores P1, os receptores de adenosina, conjuntamente com ATP, para distinção entre os efeitos causados por ATP ou por adenosina, na invasão tumoral.

Observamos uma promoção na invasividade, em todas as polarizações de MDMOs *wild-type* e P2rx7^{-/-}, principalmente quando na presença do fenótipo TAM P2rx7^{-/-} (3,5 vezes mais em relação a *wild-type*), fenótipo ativado pelas próprias células de neuroblastoma. Objetivamente, este dado parece sugerir que a ausência do receptor P2X7 em macrófagos permite a aquisição de um fenótipo capaz de tornar as células de neuroblastoma altamente invasivas. Neste caso, o receptor P2X7 expresso em macrófagos apresentaria uma atividade desfavorável à invasão tumoral.

A ativação do receptor P2X7 com seu agonista ATP não levou a mudanças na invasão promovida pelos MDMOs *wild-type*, mas promoveu um aumento de 2 vezes na taxa de invasão de neuroblastoma na presença de macrófagos P2rx7^{-/-}, o que pode ser explicado pela morte de macrófagos induzida por ATP através do receptor P2X7. A atividade citotóxica do receptor P2X7 é conhecida desde as primeiras descrições funcionais deste receptor, inicialmente chamado na literatura de receptor P2Z (DI VIRGILIO, 1995). Através da abertura de um poro de membrana permeável a moléculas de até 900 Da, o receptor P2X7 promove uma alteração de permeabilidade celular que pode resultar em um estímulo letal para as células (DI VIRGILIO, 2018). Além disso,

atualmente diversas outras funções são conhecidas para o receptor, incluindo seu papel na ativação do inflamassomo e sua participação na proliferação celular. Em grande parte, o equilíbrio entre estas funções antagônicas (morte x proliferação) depende do padrão de expressão das diferentes isoformas do receptor (ARNAUD-SAMPAIO, 2019), que serão discutidas em maior detalhe mais adiante.

Aqui, nós observamos que a viabilidade de MDMOs *wild-type* é afetada de 60-70% com o tratamento com ATP e confirmamos, como já descrito na literatura, que a morte ocorre via receptor P2X7, uma vez que a ausência do receptor P2X7 nos macrófagos suprime a morte celular. O tratamento com ATP não levou à morte de MDMOs P2rx7^{-/-} mas elevou, em aproximadamente duas vezes, o percentual de invasão. Esse efeito não foi observado com os MDMOs *wild-type*, pois uma parte dessas células morre, em decorrência da ativação do receptor P2X7. Observamos também que os efeitos gerados pela administração de ATP não são inibidos quando na presença de cafeína, demonstrando não estarem relacionados ao seu metabólito, adenosina.

Nós sugerimos que a maior invasividade observada na presença de ATP pode ser explicada pela expressão aumentada de P2ry2 em MDMO P2rx7^{-/-}, já que este é expresso por todos os fenótipos nocauteados. Tal receptor vem sendo associado à invasão tumoral de diferentes tipos de cânceres, onde promove a migração e invasão tumoral, através de genes relacionados à EMT (LI et al., 2013; QIU et al., 2018). Além disso, alguns estudos demonstraram o papel desse receptor na inibição do crescimento e da apoptose, de células tumorais e neurônios (ARTHUR et al., 2006; HÖPFNER et al., 2001; LIMAMI et al., 2012). Assim, sugerimos que o aumento observado na invasão pode ser devido as sinalizações desencadeadas pela ativação do receptor P2ry2 nos macrófagos.

Apesar dos avanços realizados na busca por melhores terapias, a opção mais utilizada para o tratamento do câncer é a quimioterapia. No entanto, parte das células tumorais são geneticamente resistentes aos quimioterápicos e/ou adquirem resistência ao longo tratamento (YELDAG; RICE; HERNÁNDEZ, 2018; ZHENG, 2017). Assim, a quimiorresistência constitui um fator limitante no tratamento, visto que além de promover a metástase, pode promover recidiva da doença, impactando ainda mais a sobrevivência dos pacientes (ABDULLAH; CHOW, 2013).

Esses ensaios demonstraram que os fenótipos M1 e M2 não contribuem na quimiorresistência, pelo contrário, ambas polarizações, tanto em macrófagos *wild-type* como P2rx7^{-/-}, contribuíram para a diminuição na viabilidade celular tumoral – tanto as células de neuroblastoma expressando P2X7, como silenciadas para o receptor P2X7 –

umentando a sensibilidade das células tumorais ao quimioterápico. O fenótipo M1 apresentou a maior capacidade de redução na viabilidade de neuroblastoma, consistentemente com o que seria esperado de um fenótipo pró-inflamatório.

No entanto, a polarização TAM mostrou efeitos diferentes na proliferação e/ou quimiorresistência de neuroblastoma a depender da expressão do receptor P2X7 nas células tumorais. Nas células silenciadas para o receptor P2X7, a polarização TAM independentemente da presença ou ausência do receptor P2X7, não causou diminuição da viabilidade celular, pelo contrário: levou à proliferação e quimiorresistência das células de neuroblastoma.

Por outro lado, nas células ACN P2X7⁺, TAM *wild-type* não mudou a taxa de células tumorais viáveis, nem mesmo a resposta a vincristina, enquanto que TAM P2rx7^{-/-} induziu uma quimiorresistência do neuroblastoma, mesmo afetando a viabilidade tumoral. O receptor P2X7 é um canal heterotrimérico, e suas subunidades podem apresentar até dez isoformas diferentes (P2X7A-J). A isoforma P2X7A é a mais bem estudada e caracterizada. Esta apresenta uma porção C-terminal capaz de interagir com a panexina-1 e está relacionada à morte celular decorrente desse receptor. Já a isoforma P2X7B não possui a porção C-terminal, sendo uma forma truncada do receptor, o que prejudica a capacidade de indução a apoptose (ADINOLFI et al., 2010; GIULIANI et al., 2014). Apesar de não induzir morte celular, P2X7B já foi demonstrado como capaz de induzir a proliferação celular e resultados recentes de nosso grupo tem mostrado que P2X7B é a isoforma envolvida na quimiorresistência de neuroblastoma (dados não publicados da doutoranda Vanessa Arnaud-Sampaio). Diante disso, sugerimos que TAM *wild-type* não devem interferir na expressão de P2X7A e P2X7B nas células tumorais, de modo a não interferir nem na morte nem na proliferação e quimiorresistência do neuroblastoma P2X7⁺, enquanto que TAM P2rx7^{-/-} deve favorecer a expressão da isoforma P2X7B, tornando as células de neuroblastoma resistentes ao quimioterápico. Futuros experimentos para esclarecer a modulação da expressão das isoformas em células tumorais por TAM serão necessários.

Dado o papel cada vez mais bem estabelecido dos TAMs no progresso tumoral, estratégias terapêuticas vêm sendo traçadas na tentativa de prevenir o recrutamento de monócitos e macrófagos para o tumor ou de alterar suas atividades pró-tumorais. Essa modulação é um componente da estratégia mais atual e que mais vêm revolucionando o tratamento de tumores: a imunoterapia. Simplificadamente, o objetivo da imunoterapia é reforçar a resposta imune mediada por células T, que é desfavorecida pelo fenótipo

adquirido pelos macrófagos que se associam aos tumores. Uma estratégia é o bloqueio do eixo CCL2-CCR2, responsável pelo recrutamento de monócitos circulantes; outra estratégia, complementar, é a reprogramação de TAMs por um anticorpo anti-CD40, para restauração do fenótipo pró-inflamatório e da resposta imune mediada por células T (DENARDO; RUFFELL, 2019). Dada a importância do fenótipo de macrófagos para o progresso tumoral, e a relevância do receptor P2X7 para essa plasticidade, esperamos que essa pesquisa possa contribuir amplamente para a construção do conhecimento em torno da imunobiologia do câncer.

6. Conclusão

O presente trabalho demonstrou o envolvimento de P2X7R na polarização de macrófagos com fenótipos alternativamente ativados, como TAMs, que sugerimos poder atuar na regulação da expressão diferencial das isoformas do receptor P2X7 nas células tumorais. Além disso, o receptor P2X7 expresso em macrófagos parece ter um papel na supressão da invasão tumoral e também na quimiorresistência de tumores que expressam o receptor P2X7R.

7. Referências Bibliográficas

- ABDULLAH, L. N.; CHOW, E. K.-H. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. **Clinical and Translational Medicine**, 2013.
- ACHILLEOS, A.; TRAINOR, P. A. **Neural crest stem cells: Discovery, properties and potential for therapy** *Cell Research*, fev. 2012.
- ADAMSON, S. E. et al. Myeloid P2Y2 receptor promotes acute inflammation but is dispensable for chronic high-fat diet-induced metabolic dysfunction. **Purinergic Signalling**, v. 14, n. 1, p. 19–26, 1 mar. 2018.
- ADINOLFI, E. et al. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. **The FASEB Journal**, 2010.
- ADINOLFI, E. et al. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. **Cancer Research**, v. 72, n. 12, p. 2957–2969, 15 jun. 2012.
- ALFAROUC, K. O. et al. **Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp** *Cancer Cell International*, 2015.
- ALLARD, B. et al. **The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets** *Immunological Reviews* Blackwell Publishing Ltd, , 1 mar. 2017.
- ARLAUCKAS, S. P. et al. Arg1 expression defines immunosuppressive subsets of tumor-associated macrophages. **Theranostics**, v. 8, n. 21, p. 5842–5854, 2018.
- ARNAUD-SAMPAIO, V. F. et al. **Using Cytometry for Investigation of Purinergic Signaling in Tumor-Associated Macrophages** *Cytometry Part A*, 2020.
- ARTHUR, D. B. et al. Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: Novel pathways for neuronal survival. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 14, 2006.
- AZAMBUJA, J. H. et al. **Inhibition of the adenosinergic pathway in cancer rejuvenates innate and adaptive immunity** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 2 nov. 2019.
- BAGHDADI, M. et al. Chemotherapy-induced IL34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells. **Cancer Research**, v. 76, n. 20, 2016.
- BARBERÁ-CREMADES, M.; BAROJA-MAZO, A.; PELEGRÍN, P. Purinergic signaling during macrophage differentiation results in M2 alternative activated macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 2, 2016.
- BARNHOLT, K. E. et al. Adenosine Blocks IFN- γ -Induced Phosphorylation of STAT1 on Serine 727 to Reduce Macrophage Activation. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, 2009.
- BELIKOFF, B. G. et al. A2B Adenosine Receptor Blockade Enhances Macrophage-Mediated Bacterial Phagocytosis and Improves Polymicrobial Sepsis Survival in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 4, 2011.
- BIELLENBERG, D. R.; ZETTER, B. R. **The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis** *Cancer Journal (United States)* Lippincott Williams and Wilkins, , 5 jul. 2015.
- BORST, P. Cancer drug pan-resistance: Pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what? **Open Biology**, v. 2, n. MAY, 2012.
- BRASSART-PASCO, S. et al. **Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression** *Frontiers in Oncology* Frontiers Media S.A., , 15 abr. 2020.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.
- BURNSTOCK, G. P2X ion channel receptors and inflammation. **Purinergic Signalling**, v. 12, n. 1, 2016.
- BURNSTOCK, G. Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**, 2018.

CAI, J. et al. Tumor-associated macrophages derived TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells through Smad2,3-4/Snail signaling pathway. **Cancer Research and Treatment**, v. 51, n. 1, 2019.

CHEN, Y. et al. **Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression***Journal of Biomedical Science*BioMed Central Ltd., , 20 out. 2019.

CHEN, Y.; TAN, W.; WANG, C. **Tumor-associated macrophage-derived cytokines enhance cancer stem-like characteristics through epithelial–mesenchymal transition***Oncotargets and Therapy*, 2018.

CHO, D. I. et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 46, n. 1, 2014.

COHEN, H. B. et al. TLR stimulation initiates a CD39-based autoregulatory mechanism that limits macrophage inflammatory responses. **Blood**, v. 122, n. 11, 2013.

COLON, N. C.; CHUNG, D. H. **Neuroblastoma***Advances in Pediatrics*Academic Press Inc., , 2011.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. **Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis***Cell*, 27 jan. 2006.

CORRALIZA, I. M. et al. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, n. 2, 1995.

CSÓKA, B. et al. Role of A2A adenosine receptors in regulation of opsonized E. coli-induced macrophage function. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 4, 2007.

CSOKA, B. et al. Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. **The FASEB Journal**, 2012.

DAVIDOFF, A. M. Neuroblastoma. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 21, n. 1, p. 2–14, fev. 2012.

DE LA ROSA, G. et al. Signaling through purinergic receptor p2y2 enhances macrophage il-1 β production. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 1–17, 2020.

DE TORRE-MINGUELA, C. et al. Macrophage activation and polarization modify P2X7 receptor secretome influencing the inflammatory process. **Scientific Reports**, v. 6, 3 mar. 2016.

DENARDO, D. G.; RUFFELL, B. **Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy***Nature Reviews Immunology*, 2019.

DESAI, B. N.; LEITINGER, N. Purinergic and calcium signaling in macrophage function and plasticity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, 2014.

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, 2001.

DI VIRGILIO, F. et al. **P2 receptors in cancer progression and metastatic spreading***Current Opinion in Pharmacology*, 2016.

DI VIRGILIO, F. et al. **Non-nucleotide agonists triggering P2X7 receptor activation and pore formation***Frontiers in Pharmacology*Frontiers Media S.A., , 1 fev. 2018.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. **Purinergic signaling in the immune system***Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 2015.

DILLEKÅS, H.; ROGERS, M. S.; STRAUME, O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? **Cancer Medicine**, v. 8, n. 12, p. 5574–5576, 1 set. 2019.

DOSCH, M. et al. **Mechanisms of ATP release by inflammatory cells***International Journal of Molecular Sciences*, 2018.

DWYER, K. M.; KISHORE, B. K.; ROBSON, S. C. **Conversion of extracellular ATP into adenosine: a master switch in renal health and disease***Nature Reviews Nephrology*, 2020.

EICHIN, D. et al. CD73 activity is dispensable for the polarization of M2 macrophages. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 10 ago. 2015.

EL KASMI, K. C. et al. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. **Nature Immunology**, v. 9, n. 12, 2008.

- EL-BROLOS, M. A.; STAINIER, D. Y. R. **Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms***PLoS Genetics*Public Library of Science, , 1 jul. 2017.
- EPPELL, B. A.; NEWELL, A. M.; BROWN, E. J. Adenosine receptors are expressed during differentiation of monocytes to macrophages in vitro. Implications for regulation of phagocytosis. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 12, 1989.
- FACCIABENE, A.; MOTZ, G. T.; COUKOS, G. **T-Regulatory cells: Key players in tumor immune escape and angiogenesis***Cancer Research*, 1 maio 2012.
- FERRANTE, C. J. et al. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling. **Inflammation**, v. 36, n. 4, 2013.
- FU, L. Q. et al. **The roles of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis and metastasis***Cellular Immunology*Academic Press Inc., , 1 jul. 2020.
- GENIN, M. et al. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, 2015.
- GIULIANI, A. L. et al. Trophic activity of human P2X7 receptor isoforms A and B in osteosarcoma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- HAMIDZADEH, K.; MOSSER, D. M. **Purinergic signaling to terminate TLR responses in macrophages***Frontiers in Immunology*, 2016.
- HAMNER, J. B.; DAVIDOFF, A. M.; SHOCHAT, S. J. Neuroblastoma. In: **Reoperative Pediatric Surgery**. [s.l.: s.n.].
- HASKO, G. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. **The FASEB Journal**, 2000.
- HASKÓ, G.; PACHER, P. Regulation of macrophage function by adenosine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 4, 2012.
- HIRAYAMA, D.; IIDA, T.; NAKASE, H. **The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis***International Journal of Molecular Sciences*, 2018.
- HÖPFNER, M. et al. Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y2 receptors in human colorectal carcinoma cells: Involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 16, n. 3, p. 154–166, 2001.
- HOUSMAN, G. et al. **Drug resistance in cancer: An overview***Cancers*, 2014.
- HU, N.; STROBL-MAZZULLA, P. H.; BRONNER, M. E. **Epigenetic regulation in neural crest development***Developmental Biology*, 2014.
- HUANG, X. et al. Polarizing macrophages in vitro. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2018. v. 1784p. 119–126.
- HUI, L.; CHEN, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. **Cancer Letters**, v. 368, n. 1, p. 7–13, 2015.
- IYER, S. S. et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 48, 2009.
- JACOB, F. et al. **Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses***Purinergic Signalling*, 2013.
- JOHNSEN, J. I.; DYBERG, C.; WICKSTRÖM, M. **Neuroblastoma—A neural crest derived embryonal malignancy***Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2019.
- JUNGER, W. G. **Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling***Nature Reviews Immunology*, 2011.
- KALER, P.; AUGENLICHT, L.; KLAMPFER, L. Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: A crosstalk interrupted by vitamin D³. **Oncogene**, v. 28, n. 44, 2009.
- KONG, L. et al. Deletion of interleukin-6 in monocytes/macrophages suppresses the initiation of hepatocellular carcinoma in mice. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, 2 set. 2016.

KRECKLER, L. M. et al. Adenosine inhibits tumor necrosis factor- α release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A₃ adenosine receptor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 317, n. 1, 2006.

LALLIER, T. E. Cell Lineage and Cell Migration in the Neural Crest. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 615, n. 1, 1991.

LECOULTRE, M.; DUTOIT, V.; WALKER, P. R. **Phagocytic function of tumor-associated macrophages as a key determinant of tumor progression control: A review** **Journal for ImmunoTherapy of Cancer** BMJ Publishing Group, , 17 dez. 2020.

LIMKE, G. **How macrophages deal with death** **Nature Reviews Immunology**, 2019.

LEY, K. et al. **How mouse macrophages sense what is going on** **Frontiers in Immunology**, 2016.

LI, M. et al. Biological role of metabolic reprogramming of cancer cells during epithelial-mesenchymal transition (Review). **Oncology Reports**, v. 41, n. 2, 2019a.

LI, W. H. et al. P2Y₂ receptor promotes cell invasion and metastasis in prostate cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 6, p. 1666–1675, 17 set. 2013.

LI, X. et al. **Harnessing tumor-associated macrophages as aids for cancer immunotherapy** **Molecular Cancer** BioMed Central Ltd., , 5 dez. 2019b.

LIMAMI, Y. et al. The P2Y₂/Src/p38/COX-2 pathway is involved in the resistance to ursolic acid-induced apoptosis in colorectal and prostate cancer cells. **Biochimie**, v. 94, n. 8, p. 1754–1763, ago. 2012.

LIN, Y.; XU, J.; LAN, H. **Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: Biological roles and clinical therapeutic applications** **Journal of Hematology and Oncology**, 2019.

LIU, K. X.; JOSHI, S. **“Re-educating” Tumor Associated Macrophages as a Novel Immunotherapy Strategy for Neuroblastoma** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 2 set. 2020.

LIU, T. et al. **NF- κ B signaling in inflammation** **Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, , 2017.

LOPEZ-CASTEJON, G. et al. P2X₇ Receptor-Mediated Release of Cathepsins from Macrophages Is a Cytokine-Independent Mechanism Potentially Involved in Joint Diseases . **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 4, 2010.

LU, P. et al. Extracellular Matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 12, 2011.

MANSOORI, B. et al. **The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review** **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, 2017.

MARINE, J. C.; DAWSON, S. J.; DAWSON, M. A. **Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer** **Nature Reviews Cancer** Nature Research, , 2020.

MATTHAY, K. K. et al. Neuroblastoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 10 nov. 2016.

MENZIES, R. I. et al. **Purinergic signaling in kidney disease** **Kidney International** Elsevier B.V., , 1 fev. 2017.

MILLS, C. D. **Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages** **Frontiers in Immunology**, 2015.

MILLS, C. D.; LEY, K. **M1 and M2 macrophages: The chicken and the egg of immunity** **Journal of Innate Immunity**, 2014.

MIYAJI, T. et al. Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, 2011.

MOGENSEN, T. H. **Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses** **Clinical Microbiology Reviews**, 2009.

MURPHY, P. S. et al. CD73 regulates anti-inflammatory signaling between apoptotic cells and endotoxin-conditioned tissue macrophages. **Cell Death and Differentiation**, v. 24, n. 3, p. 559–570, 1 mar. 2017.

MURRAY, C. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, 2016.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, n. 9061, 1997.

NAKAGAWARA, A. et al. **Neuroblastoma** *Japanese Journal of Clinical Oncology* Oxford University Press, , 1 mar. 2018.

NÉMETH, Z. H. et al. Adenosine Augments IL-10 Production by Macrophages through an A 2B Receptor-Mediated Posttranscriptional Mechanism . **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, 2005.

PARK, J. R.; EGGERT, A.; CARON, H. **Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment** *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2010.

PÉTRILLI, V. et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 9, 2007.

POH, A. R.; ERNST, M. **Targeting macrophages in cancer: From bench to bedside** *Frontiers in Oncology* Frontiers Media S.A., , 12 mar. 2018.

QIU, Y. et al. P2Y2 receptor promotes the migration and invasion of breast cancer cells via EMT-related genes Snail and E-cadherin. **Oncology Reports**, v. 39, n. 1, p. 138–150, 1 jan. 2018.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. **Receptors for purines and pyrimidines** *Pharmacological Reviews*, 1998.

RAVICHANDRAN, K. S. **Beginnings of a Good Apoptotic Meal: The Find-Me and Eat-Me Signaling Pathways** *Immunity*, 2011.

RAYAH, A.; KANELLOPOULOS, J. M.; DI VIRGILIO, F. P2 receptors and immunity. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 14, 2012.

REGATEIRO, F. S.; COBBOLD, S. P.; WALDMANN, H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. **Clinical and Experimental Immunology**, 2013.

RHEE, I. **Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment** *Archives of Pharmacal Research*, 2016.

RUFFELL, B. et al. Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. **Cancer Cell**, v. 26, n. 5, 2014.

SAWADA, K. et al. Identification of a vesicular nucleotide transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 15, 2008.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A. et al. **Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease**. [s.l.: s.n.]. v. 233

SONOKI, T. et al. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 6, 1997.

SPRANGERS, S.; VRIES, T. J. D.; EVERTS, V. **Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells** *Journal of Immunology Research*, 2016.

SU, S. et al. A Positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. **Cancer Cell**, 2014.

SYNNESTVEDT, K. et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. **Journal of Clinical Investigation**, 2002.

SZABÓ, C. et al. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 2, 1998.

TAKENOUCHI, T. et al. Extracellular ATP does not induce P2X7 receptor-dependent responses in cultured renal- and liver-derived swine macrophages. **Results in Immunology**, v. 4, n. 1, p. 62–67, 2014.

TAYLOR, P. R. et al. MACROPHAGE RECEPTORS AND IMMUNE RECOGNITION. **Annual Review of Immunology**, 2005.

TOSHCHAKOV, V. et al. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. **Nature Immunology**, v. 3, n. 1529–2908, 2002.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 128, n. 3, p. 415–435, 1968.

VAN FURTH, R.; SLUITER, W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. **Journal of Experimental Medicine**, v. 163, n. 2, 1986.

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. **Macrophages: Development and tissue specialization**. [s.l: s.n.]. v. 33

VERKHRATSKY, A.; BURNSTOCK, G. Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. **BioEssays**, 2014.

VIRGILIO, F. DI; SARTI, A. C.; COUTINHO-SILVA, R. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 318, n. 5, p. C832–C835, 2020.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. **Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance** *Frontiers in Immunology*, 2014.

WEISS, M. et al. IRF5 is a specific marker of inflammatory macrophages in vivo. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

WU, T.; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. **Cancer Letters**, v. 387, p. 61–68, 2017.

XIA, J. et al. P2X7 receptor stimulates breast cancer cell invasion and migration via the AKT pathway. **Oncology Reports**, v. 34, n. 1, 2015.

YANG, J. et al. **Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *Nature Research*, , 1 jun. 2020a.

YANG, Q. et al. The role of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor progression and relevant advance in targeted therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2020b.

YELDAG, G.; RICE, A.; HERNÁNDEZ, A. DEL R. **Chemoresistance and the self-maintaining tumor microenvironment** *Cancers*, 2018.

YOUNG, C. N. J. et al. Sustained activation of P2X7 induces MMP-2-evoked cleavage and functional purinoceptor inhibition. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 3, 2018.

YUAN, S. et al. Role of Wnt/ β -Catenin Signaling in the Chemoresistance Modulation of Colorectal Cancer. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

ZANIN, R. F. et al. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and Ecto-5'-nucleotidase. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

ZHANG, J. L. et al. ATP-P2Y2- β -catenin axis promotes cell invasion in breast cancer cells. **Cancer Science**, v. 108, n. 7, 2017a.

ZHANG, W. et al. Arginase activity mediates retinal inflammation in endotoxin-induced uveitis. **American Journal of Pathology**, v. 175, n. 2, p. 891–902, 2009.

ZHANG, Y. et al. Tumacrophage: Macrophages transformed into tumor stem-like cells by virulent genetic material from tumor cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 47, 2017b.

ZHANG, Y.; WANG, X. **Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer** *Journal of Hematology and Oncology*, 2020.

ZHENG, H. C. **The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers** *Oncotarget* *Impact Journals LLC*, , 2017.

ZHI, Y. et al. NF- κ B signaling pathway confers neuroblastoma cells migration and invasion ability via the regulation of CXCR4. **Medical Science Monitor**, v. 20, 2014.

ZITVOGEL, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. **Decoding Cell Death Signals in Inflammation and Immunity** *Cell*, mar. 2010.

ZUCCARINI, M. et al. Modulation of the TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) mediated by P1 and P2 purine receptors in MDCK cells. **Purinergic Signalling**, v. 13, n. 4, 2017.

Anexos

Certificado da Comissão de Ética em Uso de Animais



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO N° 118/2019

Certifico que o Projeto "*Influência dos fenótipos M1 e M2 de macrófagos e do receptor P2X7 na metástase de neuroblastoma.*" desenvolvido sob responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Claudiana Lameu**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 16/04/2019.

We attest that the project entitled "*Influência dos fenótipos M1 e M2 de macrófagos e do receptor P2X7 na metástase de neuroblastoma.*", developed under the responsibility of **Dr(a). Claudiana Lameu**, follows the regulations established by the National Council for Control of Animal Experimentation and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 04/16/2019.

São Paulo, 08 de Jan de 2020.

Profa. Dra. Leticia Labriola
Presidente CEUA