

AValiação DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS EXPOSTOS AO SOBRENADANTE DE ESFERÓIDES DE MCF-7 TRATADOS COM LÁTEX DE AVELÓS E JANAÚBA

ELAINE CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA¹; KEREN ANDREIA S. DE MOURA¹; AMANDA D. ROCHA²; BRENO B. FERRARI²; LEONILDA M. B. SANTOS²

¹Fatec José Crespo Gonzales - Coordenadoria de Sistemas Biomédicos

²Instituto de Biologia- Universidade Estadual de Campinas

elaine.oliveira10@fatec.sp.gov.br

Evaluation of the activity of macrophages exposed to the supernatant of MCF-7 spheroids treated with avelós and janaúba latex

Eixo Tecnológico: Ambiente e Saúde

Resumo

O câncer de mama (CM) é uma das malignidades mais comuns detectadas entre mulheres em idade reprodutiva. Esse distúrbio é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo, além de ser a segunda causa de morte por câncer no mundo. O CM é uma doença complexa, caracterizada por vários graus de heterogeneidade no microambiente tumoral (MT). O MT apresenta uma complexa estrutura que envolve células tumorais, células do sistema imune, fibroblastos, células do endotélio e uma gama de citocinas. Todas estas interações acabam por propiciar a base necessária para o desenvolvimento tumoral, como autossuficiência, a angiogênese, inflamação, imunossupressão e metástase. Além dos tratamentos convencionais para o CM, novos avanços têm prolongado e melhorado a vida destas pacientes. No entanto, ainda se houve entre os pacientes rumores sobre curas milagrosas por tratamentos não convencionais, como as plantas. Garrafadas preparadas com os látex de avelós (AV) e janaúba (JN), são conhecidos como o “leite que cura o câncer”. Em nossos estudos foi possível demonstrar que a exposição de uma linhagem de câncer de mama, a MCF-7, aos látex estimulou a proliferação destas células *in vitro*, além de estimular a produção de genes para citocinas supressoras da resposta imune em cultura 2D e 3D. Diante disso, o nosso objetivo nesta fase do trabalho foi avaliar o efeito do sobrenadante das MCF-7 tratadas com os dois tipos de látex sobre a atividade de uma linhagem de macrófagos, a J774. Os resultados sugerem que inicialmente a J774 são estimuladas pelo látex, porém a exposição prolongada leva o declínio da atividade destas células *in vitro*.

Palavras-chave: Cultura 3D, MCF-7, macrófagos, extrato de plantas.

Abstract

Breast cancer (BC) is one of the most common malignancies detected among women of reproductive age. This disorder is the second most common type of cancer in the world, in addition to being the second cause of cancer-related deaths in the world. BC is a complex disease characterized by varying degrees of heterogeneity in the tumor microenvironment (TM). The TM has a complex structure involving tumor cells, immune system cells, fibroblasts, endothelial cells, and a range of cytokines. These interactions provide the necessary basis for tumor development, such as self-sufficiency, angiogenesis, inflammation, immunosuppression, and metastasis. In addition to conventional treatments for BC, new advances have prolonged and improved the lives of these patients. However, there have still been rumors among patients about miraculous cures through unconventional treatments, such as plants. Bottles prepared with the latex of avelós (AV) and janaúba (JN) are known as the “milk that cures cancer.” In our studies, it was possible to demonstrate that the exposure of a breast cancer cell line, MCF-7, to latex stimulated the proliferation of these cells *in vitro*, in addition to stimulating the production of genes for cytokines that suppress the immune response in 2D and 3D cultures. Therefore, our objective in this phase of the work was to evaluate the effect of the supernatant of MCF-7 treated with the two types of latex on the activity of a macrophage cell line, J774. The results suggest that J774 are initially stimulated by latex, but prolonged exposure leads to a decline in the activity of these cells *in vitro*.

Key-words: 3D culture, MCF-7, macrophages, herbal extracts.

1. Introdução

O consumo inadequado de plantas medicinais pela população tem sido alvo de pesquisas e programas governamentais de conscientização. O uso de plantas medicinais, assim como a automedicação é uma prática comum em diferentes camadas da sociedade, mas principalmente naquelas populações com menor poder socioeconômico. Isto se deve principalmente pelo baixo custo e fácil acesso a diferentes tipos de plantas e diferentes tipos de preparações.

O câncer de mama (CM) é uma das malignidades mais comuns detectadas entre mulheres em idade reprodutiva. Esse distúrbio é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo, além de ser a segunda causa de morte por câncer [1,2]. O CM é uma doença complexa, caracterizada por vários graus de heterogeneidade no microambiente tumoral (MT) [3].

O microambiente tumoral (MT) foi classificado desta forma pelas propriedades únicas que o diferem dos tecidos normais do organismo pela sua autossuficiência. Isto é devido a complexa estrutura que envolve células tumorais, células imunes, fibroblastos, células do endotélio e uma gama de citocinas produzidas por estas células ou por outras na periferia. Todas estas interações acabam por propiciar toda a base necessária para o desenvolvimento tumoral como a angiogênese, inflamação, imunossupressão e metástase [4].

Os macrófagos associados a tumor (TAMs) são células mieloides que estão presentes no MT e atuam como células envolvidas na progressão do tumoral. Devido ao seu papel na resposta imune inicialmente, estas acabam por secretar moléculas como o VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) promovendo assim angiogênese e modulando o ambiente em hipóxia. Os TAMs também secretam quimiocinas, fatores de crescimento como EGF que facilitam a invasão de células tumorais e a interação com linfócitos TCD4 e TCD8, diminuindo suas capacidades de antitumorais. Ademais esses macrófagos possuem capacidade de remodelar a membrana extracelular (MEC) gerando assim resistência a medicamentos neoplásicos, como a doxorrubicina utilizado no tratamento de câncer de mama [4,5].

Os macrófagos são células plásticas que podem se apresentam em dois tipos diferentes de fenótipos: M1 e M2. As células tipo M1 (ativação clássica), produzem citocinas tipo I pró-inflamatórias, são apresentadoras de antígenos e possuem atividade antitumoral, destruindo as células cancerígenas por fagocitose ou citotoxicidade. Já as células M2 (ativação alternativa) produzem reparo e crescimento tecidual, também geram citocinas tipo II, respostas anti-inflamatórias e são conhecidas por favorecerem o tumor (pró-tumorigênica). Diversos estudos apontam a complexidade dos TAMs no câncer de mama e que inclusive células basais desse tipo de câncer podem induzir fenótipo M2 dos macrófagos [6,7]. Diversos estudos apontam a complexidade dos TAMs no câncer de mama e que inclusive células basais desse tipo de câncer podem induzir fenótipo M2 dos macrófagos [5,8].

A proposta deste trabalho foi avaliar o perfil de uma linhagem de macrófagos (J774) exposta ao sobrenadante de células MCF-7 após a exposição aos látex de avelós e janaúba (natural e filtrado).

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Linhagens celulares MCF-7 e J774.

Anais da VIII Mostra de Docentes em RJ

Painéis de citometria de fluxo usado na avaliação da atividade das J774 in vitro. J774 Marcador Fluorocromo Viabilidade 510 BV 480 (BD Biociences); F4/80 BUV 805 (BD Biociences); CD11b BUV 615 (BD Biociences); CD11c APC-Cy 7 (BD Biociences); CD80 PE-Cy 7 (BD Biociences); CD86 APC (BD Biociences); IA/IE BV 711 (BD Biociences), PDL-1 BUV 395 (BD Biociences) e Ki67 Alexa Fluor 647 (eBiociences).

Primers utilizados no qPCR: Expressão de genes para citocinas IL-1 α , IL-6, IL 10, IL-12p40, IL 23, TNF- α , TGF- β , NF κ B, VEGF, IDO

Imunofluorescência: Ki67 Alexa Fluor 647 (eBiociences), Faloidina Alexa Fluor 488 (eBiociences) e DAPI (Pharmingen).

2.2. Metodologia

Linhagens celulares. A linhagem celular da Michigan Cancer Fundation-7 (MCF-7) é uma linhagem de células de adenocarcinoma de mama humano comumente usada para pesquisa de câncer in vitro. A linhagem celular de macrófago murino (J774) é derivada de sarcoma de retículo de camundongo da linhagem BALB/c, e é geralmente utilizada para estudo da atividade funcional de macrófagos in vitro e in vivo. As linhagens foram mantidas em garrafas de cultura de 25 e 75 cm² (NEST- China) até atingir confluência de 80%. O meio de cultivo utilizado para a manutenção das linhagens (meio completo) foi o DMEM (Sigma-Aldrich, USA), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil), 1% de antibiótico e antimicótico (Thermo Fisher-USA) e 2% de glutamina (Sigma Aldrich, USA). As garrafas permaneceram em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C.

Extração do leite do avelós (*Euphorbia tirucali*) e da janaúba (*Synadenium grantii*). Os látex foram obtidos de árvores plantadas no Espaço Mandala (Horto de Plantas Medicinais da Unicamp) no período da manhã. A diluição dos látex foi de 16 gotas de avelós e 32 gotas de janaúba para 1L de água mineral Nestle. Para extração dos látex foi feito um corte na folha ou caule com um bisturi, as gotas foram coletadas diretamente em uma garrafa de água mineral de 1L que permaneceu em geladeira por uma noite. As soluções foram denominados de 100% de avelós natural (AN) e janaúba natural (JN), a partir destas as amostras foram diluídas em 50% e 25%. Parte das amostras foram filtradas em filtro de café que foi esterilizado em autoclave, as soluções filtradas foram denominadas (AF e JF). Nesta fase do estudo, utilizamos somente as soluções de 100%.

Ensaio de Viabilidade Celular pelo método do MTT. Foram utilizadas células da linhagem J774 distribuídas em placas de 96 poços em uma concentração de 1x10⁵ células/ml. Depois de 12 horas de incubação, os poços receberam os látex AN, AF, JN e JF 100%. O MTT foi diluído em PBS na concentração de 5 mg/ml e depois acrescido em DMEM, onde a quantidade foi calculada baseando-se na proporção de 150 uL/poço de DMEM. A solução final foi acrescentada em cada poço, onde houve o tratamento, na quantidade de 170 uL/poço (20 uL do composto MTT + 150 uL de meio completo). As placas foram incubadas por 4 hora na estufa à 37° C com atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação, a solução foi retirada e adicionado 100 uL/poço de DMSO (dimetilsulfóxido de dimetilo). O equipamento utilizado para leitura da densidade óptica foi o leitor de microplacas Biotek Synergy HT no Instituto de Biologia (Unicamp), no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram analisados com o auxílio do Prism GraphPad Software Inc.

Imunofenotipagem da linhagem J774. A caracterização da J774 foi realizada por citometria de fluxo pela marcação de moléculas de superfície expressas por macrófagos naturais e tratados com o sobrenadante dos esferóides de MCF-7. A linhagem J774 foi avaliada quanto

Anais da VIII Mostra de Docentes em RJ

a sua viabilidade com o marcador BV480 e expressão de moléculas de superfície como F4/80, CD11b, CD11c, CD80, CD86, MHC II e o receptor PDL-1. As células foram distribuídas em placa de 24 poços (Nest, China), na concentração de 1×10^5 células/mL. Os poços foram incubados e estimulados ou não com lipopolissacarídeo (LPS) 1ng/mL por 4 horas. Após este período as células foram marcadas com anticorpos para os diferentes marcadores, e analisados no citômetro FACSsymphony A5 (Instituto de Biologia, Unicamp).

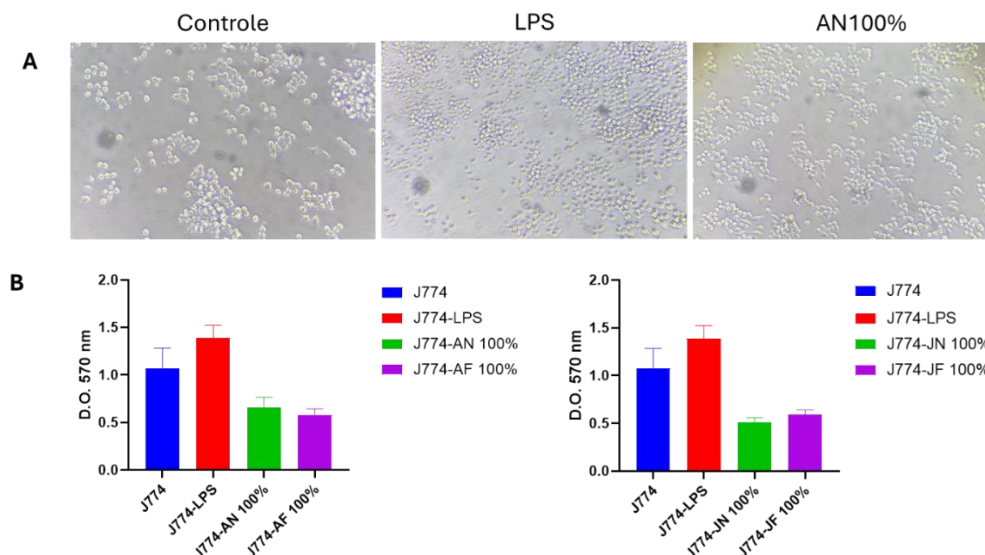
Avaliação morfológica das células MCF-7 in vitro (Cultura 2D). A linhagem MCF-7 foi distribuída em placas para microscopia confocal com fundo de laminula (Perfecta, Brasil) em meio de cultura DMEM completo. As placas permaneceram na incubadora de CO₂ para adesão das células por 12 horas, após este período, cada placa recebeu o seu tratamento específico (AN, AF, JN e JF 100%) e foram incubadas por 24 horas. Para avaliar a morfologia das células após os tratamentos, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 5 minutos. O citoesqueleto foi corado com um marcador dos filamentos de actina, a Faloidina Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, USA). O núcleo foi marcado com um corante de DNA, o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride). Depois desse período, os esferóides foram avaliados no Microscópio de Fluorescência Invertido Zeiss (Carl Zeiss AG, Germany) do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica aplicada à Biologia Celular (INFABIC). As imagens foram analisadas pelo software ImageJ Fiji.

Avaliação funcional das J774. Os esferóides de MCF-7 foram produzidos após 4 dias de incubação, em meio contendo metilcelulose. Os esferóides foram expostos ao látex de avelós (AN e AF 100%) e a janaúba (JN e JF 100%) por um período de 24 e 48 horas. Os poços receberam uma dose do látex 50µL (24h) e duas doses 100µL (48h). Ao mesmo tempo, foi preparado uma placa de 24 poços contendo 1×10^5 células/mL da linhagem J774 que foi tratada com os diferentes sobrenadantes. Após 24h de incubação em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, as células J774 foram avaliadas quanto aos marcadores de superfície por citometria de fluxo (Tabela 1). Os diferentes tratamentos e os FMO foram analisados no citômetro FACSsymphony A5 (Instituto de Biologia, Unicamp). Neste experimento, parte das J774 tratadas foram armazenadas em Trizol (Sigma-Aldrich, USA) para avaliação da expressão do perfil de genes após os tratamentos. O material foi mantido em biofreezer a -80°C para preservação do material de estudo.

3. Resultados e Discussão

1. O tratamento com os látex de avelós e janaúba diminuem a viabilidade das J774 in vitro. Neste ensaio objetivamos avaliar a viabilidade dos macrófagos tratados com os látex natural e filtrados (AN, AF, JN e JF 100%). A figura 1A demonstra uma imagem microscópica representativa das J774 que foram tratados ou não com os látex. É possível observar na imagem do controle (sem tratamento) que a J774 tem morfologia esférica quando em cultura. A imagem J774 tratada com o látex demonstra que a J774 apresenta uma morfologia diferente quando comparado a imagem controle. A figura 1B demonstra os resultados da viabilidade celular por MTT das J774 expostas aos látex de avelós e janaúba, natural e filtrados na diluição que consideramos 100% (16 gotas do látex de avelós em 1 litro de água mineral, e 32 gotas do látex de janaúba em 1 litro de água mineral). Os resultados mostram que tanto o avelós quanto a janaúba, natural ou filtrada, afetam a viabilidade da J774 in vitro, quando comparado aos controles. É possível observar que o LPS apresenta efeito proliferativo nesta linhagem, como demonstrado na literatura [8].

Fig. 1- Viabilidade celular da linhagem de macrófago murino J774 por MTT após tratamento com os látex AN, AF, JN e JF 100%. (A) Imagem representativa da morfologia da J774 com os tratamentos feito em microscópio óptico invertido. (B) Densidade óptica dos cristais de formazam (MTT) produzidos pelas células em cultura tratadas com os látex. Os gráficos foram gerados pelo software Prisma GraphPad.



Fonte: (Autor, 2024).

Caracterização fenotípica da linhagem J774

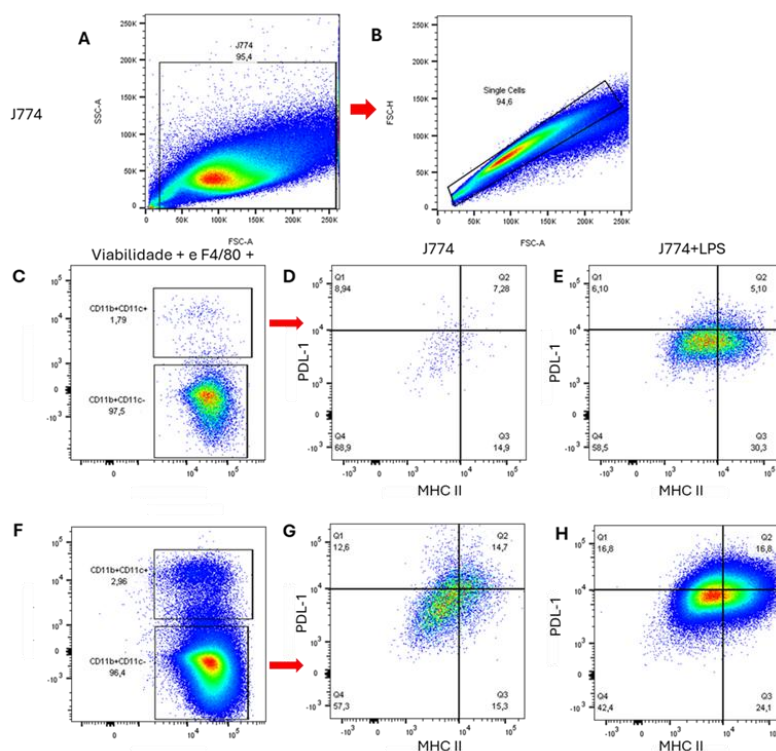
A Figura 2 mostra os principais marcadores expressos pela linhagem J774 que tem importantes características fenotípicas e morfológicas com os macrófagos naturais. Linhagens celulares de macrófagos, são amplamente utilizadas em estudos imunológicos e análises de processos celulares como fagocitose e quimiotaxia [6,9]. Esta caracterização nos permitirá avaliar o comportamento destas células quando estiverem no microambiente tumoral (MT). Por isso, a expressão dos marcadores foi avaliada nas células sem qualquer estímulo (J774) e nas células estimuladas com LPS (J774+LPS). As figuras 2A e 2B demonstram a estratégia de análise da citometria utilizando o software FlowJo.

A caracterização da J774 foi realizada por citometria de fluxo, pela marcação de moléculas de superfície expressas por macrófagos naturais. O marcador de viabilidade celular, BV480 foi utilizado para separar as células vivas que expressavam o principal marcador de macrófagos, o F4/80. O marcador F4/80 é expresso pela maioria dos macrófagos teciduais, como os macrófagos de pulmão, peritoniais, intestino, timo e baço [8]. A população de células vivas e positiva para F4/80 foram separadas pela expressão dos marcadores CD11b e CD11c. A integrina CD11b regula a adesão e migração dos leucócitos durante a resposta inflamatória, por isso foi utilizado por ser altamente expresso na superfície celular em células NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos. Já o antígeno CD11c é expresso principalmente em macrófagos e células dendríticas. As figuras 2C e 2F mostram que na J774 e J774+LPS existem duas populações que são CD11b+CD11c+ (J774 1,79% e J774+LPS 2,76%) e CD11b+CD11c- (J774 97,5% e J774+LPS 96,4 [9,10]).

Este ensaio nos permitirá conhecer o perfil destas células quando forem expostas aos tratamentos e ao sobrenadante das células MCF-7, tanto na cultura 2D quanto na 3D [8,11].

Anais da VIII Mostra de Docentes em RJ

Fig. 2- Imunofenotipagem da linhagem de macrófago murino J774 incubada apenas com meio DEMEM completo (J774) e com 1ng/mL de LPS (J774+LPS). (A e B) Estratégia de separação das células de interesse. (C e F) Separação de células viáveis marcadas com F4/80 que expressavam CD11b e CD11c. (D e G) J774 CD11b+CD11c+ e CD11b+CD11c- que expressam MHC II e PDL-1. (E e H) J774+LPS CD11b+CD11c+ e CD11b+CD11c- que expressam MHC II e PDL-1. A porcentagem de células marcadas foram avaliadas por citometria de fluxo.

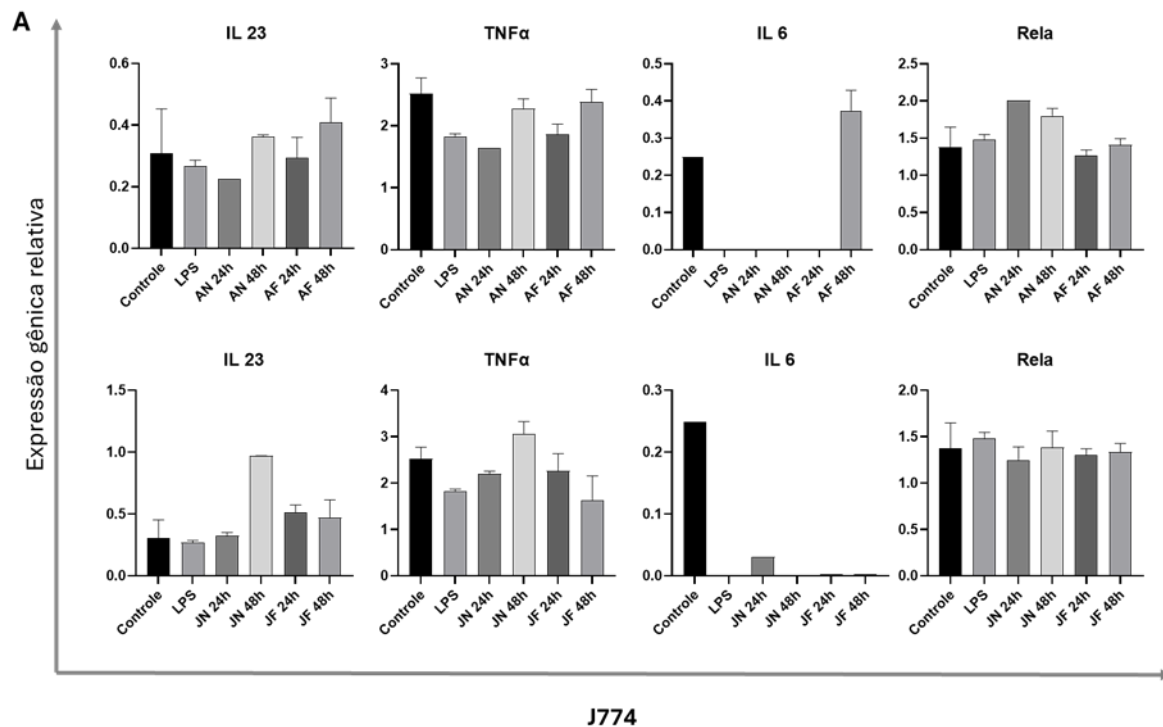


Fonte: (Autor, 2024).

Expressão de genes por q-PCR.

Avaliamos a expressão gênica por q-PCR de diferentes genes para citocinas pró e anti-inflamatórias envolvidos na ativação e pela criação de um ambiente supressor no microambiente tumoral. Resultados anteriores obtidos por nosso grupo de pesquisa mostraram que a linhagem de câncer de mama MCF-7 aumentou sua capacidade de proliferação, a resistência ao medicamento antineoplásico doxorrubicina, além do aumento de citocinas que contribuem com a progressão tumoral [10,11]. Isto nos levou a buscar novas informações sobre a capacidade de interferir na resposta dos macrófagos. Os macrófagos, juntamente com as células dendríticas são a base para iniciar a resposta inflamatória e antitumoral. No entanto, se as células tumorais estiverem recebendo estímulos proliferativos, isto pode diminuir a efetividade destas células, tornando-as aliadas para a manutenção, progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases [12,13]. avaliamos o maior número de genes que pudessem ser expressos por macrófagos que estiveram em contato com substâncias produzidas por células tumorais tratadas com os látex de interesse. Os resultados mostraram que há uma tendência a expressão de citocina envolvidas na progressão tumoral pelas J774 (Figura 3).

Fig. 3- Expressão gênica de IL 23, TNF, IL 6 e o gene RelA na linhagem celular J774 incubadas com sobrenadante dos látex (AN, AF, JN e JF 100%) e o controle sem tratamento e o controle LPS.



Fonte: (Autor, 2024).

4. Considerações finais

Este trabalho está avaliando o efeito do sobrenadante dos esferóides tratados com os látex sobre uma linhagem de macrófago, a J774 e sua diferenciação em subtipos de macrófagos M1 e M2. Este direcionamento foi devido a resultados anteriores que mostraram que as células MCF-7 expressavam genes para citocinas como a IL-6, IL-10 e TGF- β que sabidamente estão envolvidas na progressão tumoral. A avaliação dos macrófagos nos tem permitido encontrar indícios que os látex de avelós e janaúba apresentam um efeito negativo sobre esta linhagem de câncer de mama, e podem induzir a polarização de macrófagos para o fenótipo M2. Além disso, este estudo está progredindo para geração de evidências sobre as implicações do uso deste tipo de garrafada para tratamento de câncer de mama. Os ensaios *in vitro* utilizando o cultivo 3D pode mimetizar, em parte, o comportamento e resposta de macrófagos neste tratamento.

Agradecimentos

Colaboração no Projeto Temático da Fapesp 2014/26431-0

Referências

[1] SALA DCP et al. Breast cancer screening in Primary Health Care in Brazil: a systematic review. **Rev Bras Enferm.** 2021 Jul 9;74(3):e20200995. doi: 10.1590/0034-7167-2020-0995.

Anais da VIII Mostra de Docentes em RJ

- [2] GUINDALINI RSC et al. Detection of germline variants in Brazilian breast cancer patients using multigene panel testing. **Sci Rep**. 2022 Mar 9;12(1):4190. doi: 10.1038/s41598-022-07383-1.
- [3] BARZAMAN K et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **Int Immunopharmacol**. 2020 Jul;84:106535. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106535.
- [4] SOYSAL SD et al. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. **Pathobiology**. 2015 Sep;82(3-4):142-52. doi: 10.1159/000430499.
- [5] XIAO Y, YU D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. **Pharmacol Ther**. 2021 May; 221:107753. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107753.
- [6] NASIR I et al. Tumor macrophage functional heterogeneity can inform the development of novel cancer therapies. **Trends Immunol**. 2023 Dec;44(12):971-985. doi: 10.1016/j.it.2023.10.007.
- [7] VITALE I et al. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. **Cell Metab**. 2019 Jul 2;30(1):36-50. doi: 10.1016/j.cmet.2019.06.001.
- [8] PARK JV et al. Tumor Cells Modulate Macrophage Phenotype in a Novel In Vitro Co-Culture Model of the NSCLC Tumor Microenvironment. **J Thorac Oncol**. 2022 Oct;17(10):1178-1191. doi: 10.1016/j.jtho.2022.06.011.
- [9] GAZTELU, I. Z.; CASANOVAS, O. Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems. **Front Oncol**. 2018 Jul 2;8:248. doi: 10.3389/fonc.2018.00248.
- [10] LAM J et al. Baseline mechanical characterization of J774 macrophages. **Biophys J**. 2009 Jan;96(1):248-54. doi: 10.1529/biophysj.108.139154.
- [11] DOS ANJOS CASSADO, A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. **Results Probl Cell Differ**. 2017;62:161-179. doi: 10.1007/978-3-319-54090-0_7.
- [12] AUGUSTINE TN et al. Breast Cancer Cells Induce a Pro-inflammatory Response to Mitigate Immune Mediation in a 3D Culture Model. **Anticancer Res**. 2020 Nov;40(11):6179-6193. doi: 10.21873/anticancer.14638.
- [13] BRADY NJ et al. Macrophages: Regulators of the Inflammatory Microenvironment during Mammary Gland Development and Breast Cancer. **Mediators Inflamm**. 2016; 2016:4549676. doi: 10.1155/2016/4549676.