UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**A sinalização via receptor A_{2A} contribui para suscetibilidade ao carcinoma
mamário experimental**

GRETEL RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

Ribeirão Preto-SP

2016

GRETEL RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

A sinalização via receptor A_{2A} contribui para suscetibilidade ao carcinoma
mamário experimental

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Imunologia Básica e Aplicada do Departamento
de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica
e Aplicada.

Orientador: Profº Dr. João Santana da Silva

Co-orientadora: Dra Luciana Benevides

Ribeirão Preto-SP

2016

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

Rodríguez, Gretel R.

A sinalização via receptor A_{2A} contribui para suscetibilidade ao carcinoma mamário experimental. Ribeirão Preto, 2016.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: João Santana Silva.

1. Receptor A _{2A}	3. Células Th17
2. Câncer de mama	4. Neutrófilos

Nome: Rodríguez, Gretel R.

Título: A sinalização via receptor A_{2A} contribui para suscetibilidade ao carcinoma mamário experimental.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

- Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – USP, com o apoio financeiro da FAPESP e CAPES.

*“Dedicado a minha família que mesmo na distância sempre foi a estrela que
iluminou meu caminho”*

AGRADECIMENTOS:

A Deus por ser meu pai celestial que guia meus passos e os guarda.

Ao Prof. João Santana da Silva que me recebeu no laboratório como sua aluna e na sua casa como um pai desde o primeiro momento que cheguei nessa terra que também já se transformou no meu segundo país.

À Maria Fernanda por me acolher como uma filha na sua vida.

À Luciana Benevides por ser minha co-orientadora, por ajudar na minha formação como profissional e como pessoa. Pela paciência, dedicação e conselhos.

À Prof^a. Vanessa Carregaro pelas discussões científicas e pela colaboração no meu projeto.

Aos professores que aceitaram participar da banca examinadora, contribuindo na correção desta dissertação.

A meu companheiro e amigo na vida pessoal Javier Ricardo e a minha irmã colombiana por estarem sempre presentes e por me apoiarem de forma incondicional.

A minhas amigas: Mariana Thomaz e Gabriela Pessenda por estarem junto a mim nas alegrias e nas tristezas.

A meus amigos que foram parte do laboratório e já não estão nele, mas que foram importantes para mim: Gustavo Quirino (marroncito), Verônica, Rodrigo, Murilo, Gabriela Oliveira e Fernanda Agustini.

A meus colegas do laboratório pelos momentos vividos: Mikhael, Frederico, Alynne, Ítala, Laís, Pedro (fofinho), Fabrine, Camila, Carla, Claudinha, Gaurav, Daniela Carlos, Manuela, Malena, Natália e Renata.

Aos funcionários que me ajudaram sempre: Cristiane Milanezi (Xuxa), Denise Ferraz, Wander Ribeiro, Ana Cristine e Mara.

Aos funcionários do biotério: Rubilan (Ju), Edi Nelson, Júlio e Denner.

A meus colegas de outros laboratórios: Sandra, as duas Amandas, Josiane (queridinha), Wendy, Izaíra, Ana Paula, Ana Flávia, Michelle, Luna, Naira, Dorlei e Beto.

As amigas de república: Amanda e Anny por ter-me acolhido em suas vidas.

Ao grupo de apoio espiritual do HC que cada quinta-feira deixou uma nova prova de amor.

A CAPES, FAPESP, CNPq, FAEPA pelo apoio financeiro.

“El conocimiento es la virtud, solo si se sabe se puede divisar el bien”

Sócrates

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xviii
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxi
1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVO	34
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1. Animais experimentais	36
3.2. Linhagem de células de carcinoma mamário murino	36
3.3. Modelo de indução de tumor mamário murino e tratamento.....	37
3.4. Cultura de células tumorais.....	37
3.5. Obtenção de leucócitos	38
3.6. Citometria de fluxo	38
3.7. Análise Histológica- Coloração pela Hematoxilina e Eosina	39
3.8. Extração de RNA e síntese de cDNA	40
3.9. Reação de PCR em Tempo Real (qPCR).....	41
3.10. Análise estatística	43
4. RESULTADOS	45
4.1. Aumento da expressão do receptor de adenosina A_{2A} ($A_{2A}R$) durante o desenvolvimento de tumor mamário que induz metástase	45

4.2. Deficiência do A _{2A} R previne o crescimento do tumor mamário 4T-1	46
4.3. Ausência de A _{2A} R promove uma redução da expressão de moléculas relacionadas com a resposta de células Th17 em tumor mamário 4T-1	49
4.4. A deficiência da expressão do A _{2A} R impede o recrutamento de neutrófilos para o microambiente tumoral	51
4.5. Expressão dos receptores de adenosina e das ectonucleotidases em células tumorais 4T-1	53
4.6. A administração de AMP e / ou de adenosina in vitro promove o aumento da expressão de IL-6, CCL20 e CXCL1 em células tumorais 4T-1	54
4.7. A deficiência do A _{2A} R promove uma redução da expressão de Cox-2 em tumor mamário que desenvolve metástase	56
4.8. Inibição de Cox-2 promove a redução do crescimento do tumor mamário 4T-1	57
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expressão dos receptores de adenosina no tumor mamário.....	46
Figura 2. Ausência de A _{2A} R reduz o crescimento do tumor mamário 4T-1.....	48
Figura 3. Ausência do A _{2A} R compromete o número de linfócitos T produtores de IL-17 em tumor mamário 4T-1	50
Figura 4. A inibição do receptor A _{2A} impede o recrutamento de neutrófilos para o microambiente do tumor mamário 4T-1.	52
Figura 5. Expressão dos receptores de adenosina e das ectonucleotidases em células tumorais... ..	54
Figura 6. A expressão de citocinas e quimiocinas em células 4T-1 tratadas ou não com AMP e / ou com adenosina.	55
Figura 7. Expressão de Cox-2 no tumor mamário que desenvolve metástase. Erro! Indicador não definido.	
Figura 8. Inibição de Cox-2 promove previne o crescimento do tumor mamário 4T-1	57

RESUMO

RESUMO

Rodríguez, G. R. **A sinalização via receptor A_{2A} contribui para suscetibilidade ao carcinoma mamário experimental.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

O câncer de mama é um dos tumores malignos mais comuns e que afeta um grande número de mulheres da população mundial. O processo inflamatório gerado juntamente com o crescimento descontrolado das células tumorais promove um estresse metabólico no microambiente tumoral levando ao acúmulo de adenosina extracelular decorrente da hipóxia tecidual. A adenosina gerada e seus efeitos mediados via receptor A_{2A} (A_{2A}R) interfere em vários subtipos celulares. Neste trabalho, avaliamos o papel do receptor A_{2A} na indução de uma resposta de células Th17 durante o carcinoma mamário experimental, visto que estas desempenham um importante papel no crescimento e na progressão do tumor de mama invasivo. Para isso, utilizamos o modelo de carcinoma mamário murino que desenvolve (4T-1) e o que não desenvolve metástase (67NR). Nossos resultados mostraram que o tumor mamário 4T-1 apresenta alta expressão do receptor A_{2A} comparado com o tumor 67NR. A deficiência do receptor A_{2A} preveniu o crescimento do tumor mamário 4T-1 e de colônias de células tumorais em sítios secundários da doença, concomitante com a diminuição da resposta de perfil Th17 e do recrutamento de neutrófilos para o sítio primário. Ainda, que as células tumorais 4T-1 apresentaram uma alta expressão dos receptores de adenosina e das ectonucleotidases (CD73 e CD39), sugerindo que a via de sinalização de adenosina exerce um efeito direto nessas células. A administração de adenosina ou AMP (trifosfato de adenosina) em culturas de células tumorais 4T-1 induziu

um aumento da expressão de IL-6, CCL20 e CXCL1, mediadores importantes para o recrutamento de linfócitos T produtores de IL-17 e de neutrófilos. Além disso, durante o crescimento do tumor 4T-1, observamos uma alta expressão da enzima ciclooxigenase 2 (Cox-2) comparado com o tumor 67NR. No entanto, os animais deficientes geneticamente do receptor A_{2A} apresentaram uma redução significativa da expressão de Cox-2 no microambiente tumoral comparados com os animais BALB/c. A inibição da enzima Cox-2 com indometacina ou celecoxib (inibidor seletivo) em animais com tumor 4T-1 preveniu o crescimento do tumor primário e, conseqüentemente, resultou na redução da expressão de moléculas relacionadas como o perfil de resposta de células Th17 tais como IL-6, CCL20, IL-17A e Ror γ t. Esses resultados indicam que o bloqueio da via de sinalização do receptor A_{2A} interfere na indução de resposta de células Th17, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias alternativas para o controle de tumores invasivos.

Palavras chaves: Receptor A_{2A} , câncer de mama, células Th17 e neutrófilos.

ABSTRACT

ABSTRACT

Rodríguez, G. R. **The A_{2A} receptor signaling pathway contributes to susceptibility to experimental mammary carcinoma.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2016.

Breast cancer is one of the most common and aggressive malignant tumors, affecting a large number of women in the worldwide population. The inflammatory process generated along with the uncontrolled growth of tumor cells promotes metabolic stress in the tumor microenvironment leading to the accumulation of extracellular adenosine due to the generation of tissue hypoxia. The generated adenosine and its effects mediated by A_{2A} (A_{2A}R) interfere in several cell subtypes. In this study, we evaluated the role of A_{2A} receptor in the induction of a Th17 cell response in experimental breast carcinoma, given that these cells play an important role in invasive breast tumor growth and progression. For this, we employed the murine mammary metastatic (4T-1) and nonmetastatic carcinoma (67NR) model. Our results showed that there is high expression of adenosine A_{2A} receptor in breast tumor 4T-1 compared to 67NR. The A_{2A}R deficiency prevented the growth of metastatic breast tumor 4T-1 and tumor cell colonies in secondary disease sites, together with a decrease in Th17 response profile and in the neutrophils recruitment to the primary site. The tumor cells 4T-1 presented high expression of adenosine receptors and ectonucleotidases (CD73 and CD39), suggesting that the adenosine signaling pathway has a direct effect on these cells. Adenosine or AMP (adenosine triphosphate) administration in tumoral 4T-1 cell cultures induced an increase in IL-6, CCL20 and CXCL1 expression, important mediators in the recruitment of IL-17 producing T lymphocytes and neutrophils.

Besides that, during 4T-1 tumor growth we observed high expression of cyclooxygenase 2 (Cox-2) compared to 67RN tumor. However A_{2A} deficient mice showed a significative reduction in Cox-2 expression in tumoral microenvironment compared to BALB/c mice. Cox-2 inhibition with indometacine or celecoxib (selective inhibitor) in mice with 4T-1 tumor prevented primary tumor growth and, consequently, resulted in reduction of the expression of molecules related to the Th17 profile, as IL-6, CCL20, IL-17A and Ror γ t. These results indicate that the blockade of the A_{2A} signaling pathway interfere on the induction of Th17 cells response, opening new perspectives for the development of alternative therapies to the control of invasive tumors.

Keywords: A_{2A} Receptor, breast cancer, Th17 cells and neutrophils.

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

A₁- Receptor de adenosina A₁
A_{2A}- Receptor de adenosina A_{2A}
A_{2B}- Receptor de adenosina A_{2B}
A₃- Receptor de adenosina A₃
ADO- Adenosina
ADP- Difosfato de adenosina do inglês, *adenosine diphosphate*
AMP- Monofosfato de adenosina do inglês, *adenosine monophosphate*
ATP- Trifosfato de adenosina do inglês, *adenosine triphosphate*
Bcl-2- do inglês, *B-cell lymphoma 2*
cAMP- AMP cíclico, do inglês *cyclic AMP*
CCL- Ligante de quimiocina CC
CD39- do inglês, ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, E-NTPDase1
CD73- do inglês, *ecto-5'-nucleotidase, Ecto5'NTase*
cDNA- do inglês, *complementary DNA*
Cox-2- Ciclooxigenase-2, do inglês, *Cyclooxygenase 2*
CTLA-4- do inglês, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*
CXCL- Receptor de quimiocinas CXC
DNA- do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*
dpi- Dias pós-inoculação das células tumorais
EDTA- do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*
Foxp3- do inglês, *Forkhead box*
H&E- Hematoxilina e Eosina
Hprt- do inglês, *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*
IFN- Interferon
IL- Interleucina
Kg- Quilograma
M2- Macrófagos do tipo 2
MAPK- do inglês, *Mitogen-activated protein kinases*
MDSC- do inglês, *myeloid derived suppressor cells*
µl- Microlitro

μ M- Micromolar
 Mg- Miligrama
 MHC- do inglês, *Major Histocompatibility Complex*
 mM- Milimolar
 MMP- do inglês, *Matrix Metaloproteinases*
 N2- Neutrófilo do tipo 2
 NK- do inglês, *natural killer*
 NKG2D- do inglês, *natural-killer group 2, member D*
 NKG2DL- do inglês, *NKG2D- ligands*
 PBS- Tampão salina fosfato, do inglês, *Phosphate Bufferded Saline*
 PD-1- do inglês, *Programmed Death 1*
 PD-1L- do inglês, *Programmed Death 1ligant*
 PGE2- Prostaglandina E2
 PKA- Proteína quinase A
 PKC- Proteína quinase C
 qPCR- do inglês, “Real-time quantitative polymerase chain reaction”
 RNA- Ácido ribonucleico, do inglês, *Ribonucleic Acid*
 SBF- Soro bovino fetal
 STAT- do inglês, *Signal transducer and activator of transcription*
 TAAs- Antígenos associados a tumores, do inglês *Tumor-Associated Antigens*
 TAM- do inglês *tumor-associated macrophages*
 TAN- Neutrófilos associados a tumores, do inglês *tumor-associated neutrophils*
 TCR- Receptor de célula T
 TGF- β - Fator de crescimento e transformação beta, do inglês *Transforming growth factor beta*
 Th- do inglês, *T helper*
 TNF- α - Fator de necrose tumoral
 Treg- Célula T reguladora
 VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *Vascular endothelial growth factor*

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo, e se desenvolve a partir de um conjunto de células com crescimento incontrolável que culmina com a invasão em tecidos adjacentes e a disseminação dessas células para outros tecidos (Sakaguchi et al., 1995). As alterações fisiológicas, como sinal de crescimento próprio, insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese contínua e invasão tecidual são características de células tumorais (Inohara et al., 2005).

O processo de formação do tumor é chamado de tumorigênese, sendo dividido em três fases principais, a iniciação, a promoção e a progressão do tumor (Hanahan and Weinberg, 2000). Durante a fase de iniciação do tumor, processos químicos ou físicos podem causar mutações no DNA das células e levar a ativação de oncogenes e/ou à inativação de genes supressores de tumor. A segunda fase, a promoção do tumor, é caracterizada pela expansão clonal das células com proliferação descontrolada e redução da morte celular. A inflamação tem papel importante durante essa fase, pois células inflamatórias produzem citocinas tais como IL-1 e IL-6 que favorecem o crescimento do tumor. A fase de progressão do tumor caracteriza-se pela invasão das células tumorais em locais distantes do sítio primário, denominado metástase, assim como a manutenção do crescimento do tumor primário. Durante esta fase, as mutações adicionais podem ser adquiridas, levando a obtenção de uma célula cancerígena (Hanahan and Weinberg, 2000; Karin and Greten, 2005).

O câncer de mama é o mais comum e mais agressivo dentre os tumores, com cerca de 1,7 milhões de novos casos diagnosticados em 2012, representando cerca de 12% de todos os

novos casos de câncer e 25% dos tumores nas mulheres (Ferlay et al., 2015). O carcinoma de mama é uma das principais causas de mortalidade relacionada ao câncer em mulheres, sendo responsável pela segunda causa de mortes no Brasil, correspondendo a 13% do total de óbitos. A taxa global de mortalidade da doença é de 70%. Em 2008 foram notificados, na América Latina, 115.000 novos casos desta neoplasia e, em 2010 foram notificados 49.000 novos casos, apenas no Brasil (Lee et al., 2012).

O carcinoma de mama são tumores sólidos, que podem ter origem nas glândulas mamárias (carcinoma lobular) ou nos ductos (carcinoma ductal). Quando as células tumorais se propagam para além do lóbulo ou túbulo, designa-se carcinoma invasivo, caso contrário ele é denominado carcinoma *in situ* (INCA, 2012).

O microambiente tumoral é composto por células tumorais, estromais, inflamatórias, além de uma variedade de células associadas ao tecido e vasos sanguíneos (Whiteside, 2008). As células que apresentam crescimento descontrolado, assim como a expressão de antígenos tumorais, podem ser reconhecidas e controladas pela resposta imune inata e/ou adaptativa (Dunn et al., 2002). O sistema imunológico não só protege o hospedeiro contra a formação do tumor, mas também aplica uma pressão seletiva para o desenvolvimento de tumores menos imunogênicos, que pode culminar com a evasão do tumor. (Dunn et al., 2002).

Durante o desenvolvimento das neoplasias acontece o processo de imunoedição dos tumores, resultando em uma relação bastante complexa entre o tumor e o sistema imunológico (Dunn et al., 2002). Esse fenômeno é composto por três fases: eliminação, equilíbrio e escape (Dunn et al., 2002). A primeira fase do processo de imunoedição dos tumores é a eliminação. A resposta imunológica durante essa etapa é mediada por macrófagos, células natural killer (NK), células dendríticas, linfócitos T e ocasionalmente por linfócitos B, que promovem rejeição e destruição das células tumorais (Whiteside, 2008).

As células NK são muito importantes na fase inicial de eliminação de tumores, pois essas células expressam receptores como NKG2D e reconhecem ligantes induzidos por estresse como NKG2DL (Gasser et al., 2005). Além disso, as células NK secretam IFN- γ que induz aumento da produção de proteínas citolíticas como as perforinas, (Smyth et al., 2004) assim como também promove a indução de ligantes apoptóticos como o Fas (Tsutsui et al., 1996). O IFN- γ desempenha um papel importante na indução de uma resposta imunológica, ativando as células dendríticas e consequentemente promovendo a geração de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos contra as células tumorais (Bach et al., 1997). O principal mecanismo imunológico para a eliminação das células tumorais ocorre por meio do reconhecimento de antígenos tumorais via MHC de classe I pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos capazes de eliminar as células tumorais (Vakkila and Lotze, 2004). Os linfócitos T CD4⁺ também desempenham importante papel na imunidade antitumoral, auxiliando a sobrevivência e indução de linfócitos T CD8⁺ de memória (Wesa et al., 2007).

A segunda etapa do processo de imunoedição é a fase de equilíbrio durante a qual o sistema imunológico é capaz de conter, mas não eliminar o tumor (Dunn et al., 2004). Essa etapa é a menos estudada das três, mais existem alguns estudos que demonstraram que durante essa fase, o sistema imunológico provoca uma pressão seletiva para o desenvolvimento de tumores menos imunogênicos (Dunn et al., 2002). Estudos mostraram que no microambiente tumoral, durante a fase de equilíbrio existe um aumento no número de linfócitos T CD8⁺ e células NK, mas se observa uma diminuição das populações de células T reguladoras (Treg Foxp3⁺) e de células supressoras mieloídes (MDSC, do inglês *myeloid derived suppressor cells*), o que indica um balanço entre células anti-tumorais e pró-tumorais (Wu et al., 2013).

Por último, a fase de evasão ou escape dos tumores, o que proporciona a sobrevivência e o crescimento ilimitado de células tumorais. Existem vários mecanismos que os tumores utilizam para escapar da resposta imunológica do hospedeiro, tais como a diminuição na expressão de moléculas de MHC classe I, o que impede o reconhecimento de TAAs (antígenos associados ao tumor) pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (Hulpke and Tampe, 2013), o aumento na expressão de moléculas inibidoras como CTLA-4 (do inglês, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) e PD-1 (do inglês *Programmed Death 1*), os quais são expressos na superfície de células T ativas, inibindo a sua atividade efetora (Downey et al., 2007; Gao et al., 2009; Inman et al., 2007; Mu et al., 2011) e a indução de células T reguladoras para o microambiente tumoral (Qin, 2009; Rabinovich et al., 2007). Outras células como MDSC e os macrófagos associados a tumores (TAM do inglês, *tumor-associated macrophages*) presentes no tumor produzem a citocina IL-10 criando um ambiente imunossupressor, inibindo as respostas imunológicas efetoras do hospedeiro e, conseqüentemente favorecem a progressão do tumor (Fridlender et al., 2012; Gabrilovich et al., 2012; Solinas et al., 2009).

Existe uma forte associação entre o câncer e a inflamação. A inflamação crônica resulta na remodelação do tecido e angiogênese, um processo que aumenta a probabilidade de recorrência do câncer de mama. (Pierce et al., 2009). A maioria dos tumores sólidos apresentam regiões de baixa concentração de oxigênio provocado por um desequilíbrio entre a disponibilidade e consumo de oxigênio (Hockel and Vaupel, 2001). Em condições fisiológicas, as concentrações dos mediadores purinérgicos (ATP e adenosina) presentes no espaço extracelular são baixas. Esses mediadores são liberados para o espaço extracelular por meio de proteínas de membrana celular e lisossomos (Fredholm et al., 2011). Durante o processo inflamatório crônico pode ocorrer hipóxia tecidual ocasionada por meio da

proliferação descontrolada de células tumorais, por exemplo, os níveis de ATP e adenosina extracelulares aumentam e podem atuar como um sinal de alarme, levando ao crescimento do tumor (Montesinos et al., 2004) (Decking et al., 1997).

As ectonucleotidasas CD39 e CD73 são as principais enzimas envolvidas com a geração de adenosina (Yegutkin, 2008). O CD39 (do inglês, *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1*, *E-NTPDase1*) metaboliza as moléculas de ATP e ADP, no espaço extracelular, e as converte em AMP. Após a formação do AMP, este é metabolizado pela molécula CD73 (do inglês *ecto-5'-nucleotidase*, *Ecto5'NTase*) resultando na geração de adenosina no espaço extracelular (Antonioli et al., 2013). Ambas enzimas podem atuar como moduladoras imunológicas que mudam a atividade pro-inflamatória das células imunológicas mediada pela existência de ATP, a um estado anti-inflamatório mediado por adenosina (Beavis et al., 2012). Diversos estudos têm apontado que CD39 e CD73 tem um papel importante na geração de um ambiente imunossupressor, caracterizado pelo aumento dos níveis de adenosina, favorecendo o desenvolvimento dos tumores (Bastid et al., 2013). Em vários tipos de tumores sólidos se observa uma elevada expressão e atividade de CD39 e CD73 (Bastid et al., 2013). O complexo CD39/CD73 contribui para o escape dos tumores, via inibição da ativação, expansão clonal e recrutamento de células T, em particular das células T citotóxicas (Schuler et al., 2012; Zhang, 2012). Além disso, estudos demonstraram que as células MDSCs promovem o crescimento do tumor por mecanismos mediados via CD39, devido a que MDSCs obtidas de pacientes com câncer colorectal apresentaram uma elevada expressão de CD39 exibindo um aumento do efeito inibidor sobre as células T citotóxicas em comparação com MDSCs de doadores saudáveis (Zhang et al., 2013).

A sinalização via adenosina ocorre por meio de quatro subtipos de receptores, A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Antonioli et al., 2008; Palmer and Trevethick, 2008) presentes na superfície celular,

os quais estão associados a proteínas G (ligantes de GTP intracelular) estimuladores (G_s) ou inibidores (G_i) de adenilato ciclase. Essa enzima é responsável pela catálise de AMP cíclico (cAMP do inglês, cyclic AMP) intracelular, e seus níveis podem variar de acordo com a proteína G associada ao receptor de adenosina. Os receptores A_1 e A_3 são acoplados à proteína G das famílias G_i , G_q e G_o . A estimulação desses receptores resulta na liberação de íons de cálcio intracelular (Hoskin et al., 2008) e manutenção dos níveis baixos de cAMP. Por outro lado, os receptores A_{2A} e A_{2B} são acoplados à proteína G_s ou G_{olf} , resultando na maior atividade de adenilato ciclase (Klinger et al., 2002) e aumento significativo dos níveis intracelulares de cAMP. O aumento de cAMP ativa a proteína quinase A (PKA) que, após ser fosforilada, ativa o fator de transcrição CREB (Nemeth et al., 2003), atuando diretamente na expressão e produção de citocinas pró-inflamatórias, ou indiretamente, por meio da competição com NF κ B por um importante co-fator, a proteína ligante de CREB (Fredholm et al., 2007). Outro fator de transcrição, o C/EBP, é responsável pela produção de IL-10 decorrente da estimulação do receptor A_{2A} (Csoka et al., 2007). Ressalta-se que estes efeitos são mediados via ativação de MAPK e PKC (Fredholm et al., 2007; Hasko and Pacher, 2008).

A adenosina é um nucleosídeo, com importante papel na regulação autócrina e parácrina das células. O seu acúmulo prolongado está associado com a imunossupressão e o desenvolvimento das neoplasias (Blay et al., 1997; Ohta et al., 2006; Sitkovsky et al., 2008). Esse nucleosídeo atua em diferentes subtipos celulares, como por exemplo, na inibição da ativação de macrófagos M1, via o receptor A_{2A} (Hasko and Cronstein, 2004). Por outro lado, a via de sinalização de adenosina pelos receptores A_{2A} e A_{2B} induz a ativação de macrófagos M2 (Hasko and Cronstein, 2004). Adicionalmente, a adenosina estimula a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em macrófagos, via receptor A_{2A} , favorecendo a angiogênese (Leibovich et al., 2002). A adenosina também inibe a função das células NK,

células efectoras do sistema imune inato envolvidas no controle do crescimento e a proliferação de diferentes tipos de tumores (Langers et al., 2012). Esse nucleosídeo reduz a capacidade de adesão das células NK às células neoplásicas, prejudicando a ação dos grânulos citotóxicos. A ativação do receptor A_{2A} nas células NK inibe a produção de perforina e CD95L (FASL) e inibe a lise das células tumorais (Raskovalova et al., 2005), além de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ , interleucina-2 (IL-2) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Lokshin et al., 2006). Nas células T efectoras, a sinalização de adenosina e seu receptor A_{2A} induz o aumento dos níveis de cAMP, causando a inibição da ativação destas células mediadas pelo TCR (Merighi et al., 2003) e induz a liberação de citocinas que neutralizam o crescimento do tumor (Deaglio et al., 2007).

A via de sinalização do receptor de A_{2A} também resulta na indução da ativação da enzima ciclo-oxigenase 2 (Cox-2), altamente expressa durante processos inflamatórios e tumorais (Chen and Smyth, 2011). O principal produto da atividade da Cox-2 é a prostaglandina E2 (PGE2), que atua na sobrevivência celular, induzindo a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Chen and Smyth, 2011), de metaloproteinases (MMP) e do VEGF (Fosslien, 2001). Alguns estudos demonstraram que a indução de Cox-2 mediada pelo receptor $A_{2A}R$ pode ocorrer de maneira direta via a estimulação de cAMP (Carregaro et al., 2011; Pouliot et al., 2002), entre tanto outros trabalhos demonstraram que tanto a PGE2 por meio de seus receptores EP2R e EP4R assim como a adenosina e seus receptores $A_{2A}R$ e $A_{2B}R$ podem ativar a adenilato ciclase de forma independente (Fredholm et al., 2007; Hata and Breyer, 2004).

Em células linfoides, a sinalização de cAMP induz um potente efeito imunossupressor e a magnitude desse efeito é proporcional à quantidade de cAMP produzido (Kundu et al., 2005; Raskovalova et al., 2005; Sitkovsky et al., 2004). A combinação de

PGE2 e adenosina pode amplificar a via de sinalização de cAMP-PKA (proteína quinase dependente de cAMP), provocando separadamente um efeito imunossupressor ainda maior (Su et al., 2008).

A PGE2 tem efeitos distintos sobre as células do sistema imune. Trabalhos anteriores demonstraram o seu papel imunossupressor, induzindo um perfil de macrófagos M2 e de células MDSC e consequentemente inibindo o perfil de macrófagos M1. Além disso, PGE2 tem a capacidade de induzir o aumento da proliferação e função de células Tregs (Chen and Smyth, 2011). Outros estudos mostraram que tanto PGE2 como adenosina inibem a resposta antitumoral mediada por células T (Ohta et al., 2006). Além disso, há relatos que PGE2 induz a produção de citocinas pro-inflamatórias como a IL-23 no microambiente do tumor, levando à expansão de células Th17 (Qian et al., 2013), um subtipo de linfócito T CD4⁺ caracterizado pela elevada produção de IL-17 (Qian et al., 2013).

A diferenciação das células Th17 é mediada pela combinação de citocinas como IL-6, TGF- β , IL-1 β e IL-23 que induzem a fosforilação e ativação de STAT3 e consequentemente do seu fator de transcrição específico, o Ror γ t (Basso et al., 2009; Iwakura and Ishigame, 2006). Essas células estão associadas principalmente com os processos inflamatórios crônicos, desempenhando um importante papel na indução e progressão de doenças autoimunes, assim como no controle de infecções bacterianas, fúngicas e de protozoários (da Matta Guedes et al., 2010; Khader et al., 2007).

Nosso grupo recentemente demonstrou que os linfócitos T produtores de IL-17 estão presentes no microambiente tumoral de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama (Benevides et al., 2013). Ainda, que a expressão de IL-17 está associada com o aumento de células Tregs e com o pior prognóstico da doença (Benevides et al., 2013). Em modelo de

tumor mamário que desenvolve metastase foi demonstrado que os linfócitos T infiltrantes do tumor produzem IL-17, enquanto que a neutralização dessa citocina *in vivo* reduziu o crescimento do tumor, prevenindo a migração de neutrófilos e de células tumorais para sítios secundários do tumor, demonstrando o seu papel pro-tumoral (Benevides et al., 2015). Além disso, a citocina IL-17 atua sobre as células tumorais e induz a produção de citocinas e quimiocinas, tais como IL-6, CXCL1 e CCL20, que são fundamentais para a manutenção do fenótipo Th17 e o recrutamento de neutrófilos tumorigênicos (Benevides et al., 2015).

Dessa forma, o bloqueio de IL-17 parece ser uma abordagem atrativa para o controle de tumores invasivos. Com o intuito de controlar a produção dessa citocina, a nossa hipótese foi que o bloqueio da via de sinalização de adenosina inibe o recrutamento de células Th17 para o microambiente tumoral, uma vez que durante o processo inflamatório gerado juntamente com o crescimento descontrolado das células tumorais promove um o acúmulo de adenosina extracelular decorrente da geração de hipóxia tecidual. A adenosina via receptor A_{2A} ($A_{2A}R$) induz a produção de citocinas relacionados com o perfil Th17, induzindo a expansão e migração dessas células. Nesse trabalho propusemos avaliar o papel do receptor A_{2A} na indução de resposta de células T produtores de IL-17 durante o carcinoma mamário. O entendimento dessa via de sinalização de adenosina e seu receptor A_{2A} pode proporcionar novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias para o controle de tumores invasivos.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Determinar o papel do receptor A_{2A} na indução de uma resposta de célula Th17 durante o carcinoma mamário experimental.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Determinar a cinética de expressão dos receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) durante o crescimento de tumor que induz ou não metástase.

2.2.2. Determinar o papel do receptor de A_{2A} durante o desenvolvimento do carcinoma mamário murino.

2.2.3. Determinar a participação do receptor A_{2A} na indução de uma resposta de células Th17 durante a progressão de carcinoma mamário murino.

2.2.4. Investigar se a via de sinalização de $A_{2A}R$ induz a expressão de Cox2 durante o crescimento de tumor mamário murino.

2.2.5. Determinar o efeito de adenosina e do seu receptor A_{2A} em células tumorais.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Os camundongos da linhagem BALB/c e geneticamente deficientes do receptor de adenosina A_{2A} ($A_{2A}R^{-/-}$), fêmeas de 8 a 10 semanas de idade, foram utilizados para a indução de tumor. Os camundongos foram obtidos do Biotério de criação de animais isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia desta Faculdade. Os experimentos foram realizados utilizando 5 a 8 camundongos por grupo experimental. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo comitê de ética para animais de experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP, n° 102/2014.

3.2. Linhagem de células de carcinoma mamário murino

As linhagens de células de carcinoma mamário murino 4T-1 (linhagem de célula tumoral que desenvolve metástase) e 67NR (linhagem de célula tumoral que não desenvolve metástase) foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma, St. Luis, EUA) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF), 1 mM L-glutamina, 1mM penicilina-streptomicina, 1mM aminoácido não essencial, 1mM piruvato de sódio (Sigma).

Para os experimentos *in vitro* e *in vivo*, as células foram dissociadas com PBS/EDTA 0,01%, lavadas duas vezes com PBS, e a viabilidade celular foi determinada utilizando azul de Tripan. Foram utilizadas somente as suspensões celulares com viabilidade acima de 95%.

3.3. Modelo de indução de tumor mamário murino e tratamento

Os camundongos BALB/c e A_{2A}R^{-/-} foram previamente anestesiados pela via intraperitoneal com Xilazina (12mg/Kg) + Ketamina (115 mg/Kg) e, em seguida, inoculados com 50 µl de uma suspensão celular de 5x10⁴ células tumorais 4T-1 ou 67NR dentro da quarta glândula mamária. O tamanho dos tumores foi mensurado a partir do 10º dia pós-inoculação das células tumorais utilizando um paquímetro eletrônico. O volume do tumor foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $V = D \times L^2/2$, enquanto D representa o diâmetro maior do tumor (mm) e L representa o diâmetro menor do tumor (Jovanovic et al., 2011). Os animais foram sacrificados nos dias 15, 25, 35 e 40 pós-inoculação das células tumorais dependendo do experimento realizado. O tumor primário e o órgão acometido pelo tumor (pulmão) foram coletados e acondicionados de maneira diferente dependendo do destino final.

A partir do 15º dia pós-inoculação das células 4T-1, um grupo de animais BALB/c foi tratado pela via intraperitoneal com inibidor geral de Cox (Indometacina - 5mg/kg), com inibidor seletivo de Cox-2 (Celecoxib - 5mg/kg) ou com veículo (PBS 1x + DMSO 10%) em dias alternados durante 3 semanas. Aos 40 dias pós-inoculação das células tumorais, os animais foram sacrificados para a coleta dos tecidos (tumor e pulmão).

3.4. Cultura de células tumorais

Para os experimentos de cultura de células tumorais *in vitro*, células tumorais 4T-1 (2 x 10⁵ células/ poço) foram cultivadas em placas de 24 poços (BD Biosciences) em meio RPMI-1640 suplementado com 5% de SBF, na presença ou não de diferentes concentrações (100 µM, 300 µM e 1mM) de monofosfato de adenosina (AMP) (Sigma), ou de adenosina

(ADO) (Sigma). Após 24 horas, as células foram coletadas para a extração do RNA. A expressão de IL-6, CCL-20 e CXCL1 foram avaliados por PCR em tempo real (qPCR).

3.5. Obtenção de leucócitos

Para a obtenção de células inflamatórias do microambiente tumoral, o tecido do tumor foi fragmentado em pedaços menores e incubado por 1 hora a 37°C em meio RPMI-1640 incompleto contendo 50 µg/mL de liberase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) para a digestão enzimática. Após este período, a suspensão celular foi coletada e filtrada com auxílio *cell strainer* de 70 µm (BD Biosciences). A viabilidade das células obtidas foi determinada utilizando azul de Tripan. As células foram colocadas em cultura (2×10^6 células/ poço) em placas de 48 poços (BD Biosciences) em meio RPMI-1640 suplementado com 5% de SBF. As células foram estimuladas com PMA (50 ng/mL) (Sigma) e ionomizina (500 ng/mL) (Sigma) na presença de Brefeldina A (Biolegend) para impedir a secreção de citocinas ao meio extracelular durante 4 horas.

3.6. Citometria de fluxo

Após o isolamento das células infiltrantes do tumor, foi realizada a caracterização do infiltrado inflamatório quanto à marcação de moléculas de superfície específicas de cada subtipo celular, pela técnica de citometria de fluxo. Resumidamente, as células foram incubadas com soro de coelho 10% por 30 minutos à 4°C. Após o período de incubação, para a marcação de moléculas de superfície, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos conjugados com fluorocromos FITC, PE, PERCP, PE-CY7, APC e APC-CY7. Para a identificação de populações de linfócitos T foram utilizados os anticorpos

anti-CD3 (145-2C11), anti-CD4 (01065B), anti-CD8 (53-6,7), anti-TCR $\gamma\delta$ (UC7-13D5). Para a caracterização das populações de neutrófilos, MDSC e monócitos inflamatórios foram utilizados anticorpos anti-CD11b (M1/70), anti-CD11c (AL3), anti-Ly6G (1A8), anti-Ly6C (AL-21), anti-MHC II (2G9) e os respectivos isotipos controles. Os anticorpos foram incubados por 30 minutos a 4°C. Para avaliar a expressão de ectonucleotidases nas células tumorais 4T-1, foram utilizados os anticorpos anti-CD73(TY/23) e anti-CD39 (Duha 59). Os anticorpos utilizados foram da BD Biosciences e da Biolegend. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto II e os dados foram analisados utilizando o *software* FlowJo (*TreeStar* Inc., EUA) de acordo com tamanho e granulosidade.

Para detecção de citocinas ou moléculas intracelulares, após o tempo de cultura as células foram fixadas com PBS/formol 4% durante 11 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram permeabilizadas (PBS contendo 1% SFB, 0,1% NaN₃ e 0,2% de saponina) e incubadas com soro de coelho 10% por 30 minutos à 4°C. Posteriormente, as células foram marcadas com os seguintes anticorpos de superfície e intracelular anti-CD3 (145-2C11), anti-CD4 (01065B), anti-CD8 (53-6,7), anti-TCR $\gamma\delta$ (UC7-13D5) e anti-IL-17 (TC11-18H10) por 30 minutos à 4°C. Todos os anticorpos empregados foram da BD Biosciences ou da Biolegend. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto II e os dados foram analisados utilizando o *software* FlowJo de acordo com tamanho e granulosidade.

3.7. Análise Histológica- Coloração pela Hematoxilina e Eosina

Para observação da morfologia e alterações patológicas, fragmentos de pulmão foram coletados no 40º dia pós-inoculação das células tumorais 4T-1 ou 67NR. Os fragmentos

foram coletados em formol tamponado 10% e, após 24 horas, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e xilol. Posteriormente, os fragmentos foram incluídos em parafina e cortes de 5 µM de espessura dos tecidos foram obtidos com auxílio de um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 59-60°C para fixação. As lâminas foram lavadas em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol (do absoluto ao 80%). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina, desidratados com concentrações crescentes de etanol e lavados com xilol. As lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá e cobertas com lamínula. A análise foi realizada em microscópio óptico acoplado a uma câmara digital (Olympus® America Inc., EUA).

3.8. Extração de RNA e síntese de cDNA

Os fragmentos de tecidos de tumor foram coletados e armazenados em Trizol (Invitrogen) à -20°C até o momento da extração do RNA total. O tecido foi homogeneizado com auxílio de uma haste de trituração autoclavada e tratada com dimetilpirocarbonato (DEPC) para a eliminação de RNase. À mistura foram adicionados 500 µl de Trizol e 200 µl de clorofórmio. Após a centrifugação (12 000 xg 15 minutos, 4°C), a fase aquosa contendo o RNA foi coletada e transferida para outro tubo contendo 200 µl de etanol 95%. O RNA foi purificado por meio do Kit *Promega RNA Extraction* (Promega, Madison, EUA), e quantificado por leitura em NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) à 260 nm de absorbância (A_{260}). A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se o Kit *High Capacity cDNA Reserve Transcription* (Applied, EUA) conforme instruções do fabricante. Brevemente, a 1 µg de RNA diluído em 15 µl de água Milli-Q estéril foram

adicionados 5 µl de mix composto por 2 µl de tampão (10x), 0,8 µl de dNTPs à 100 mM, 1 µl Oligo (dT) à 50 µM, 1 µl de enzima *MultiScribe Reverse Transcriptase* a 50 U/µl e 0,2 µl de água Milli-Q estéril. As amostras foram mantidas por 2 horas no termociclador (Modelo PTC-100, MJ Research, Watertown, MA, EUA). A ciclagem para a síntese do cDNA foi de 25°C por 10 minutos, 37°C durante 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 10°C por tempo indefinido. Após a ciclagem as amostras foram diluídas 8 vezes com água Milli-Q estéril e armazenadas à -20° C até o momento do uso.

3.9. Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)

A expressão relativa de genes foi analisada por meio das reações de qPCR, utilizando-se o sistema de intercalantes e o aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA). Esse sistema (*StepOne Software v2.2.2*) realiza as reações de amplificação, detecção e quantificação das amostras por meio da utilização de nucleases fluorogênicas, sendo a expressão normalizada com base do controle endógeno *Hprt* (do inglês, *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*). Iniciadores adequados para tais reações, também conhecidos por *primers*, foram criados a partir do programa *Primers Express* (Applied Biosystems). Em resumo, o cDNA de cada amostra (5 µl) foi adicionado à 7,65 µl de intercalantes qPCR (Promega, EUA), 0,5 µl do *primer sense* (1-2 µg/ reação), 0,5 µl do *primer antisense* (1-2 µg/ reação) e 1,35 µl de água Milli-Q estéril. A amplificação das sequências dos genes alvo e controle interno (*Hprt*) foram avaliados por meio da curva exponencial de amplificação após incubação do material a 95°C por 10 minutos para a desnaturação, 40 ciclos de repetição de 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos para o anelamento e, finalmente, 72 °C por 30 segundos. Os resultados foram analisados com base

no valor da linha de corte Ct (*cycle threshold*) definido após o término da reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu um dado limiar que permitiu a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Os cálculos para a determinação da expressão relativa dos genes alvo foram realizados de acordo com as instruções contidas no folheto *User's Bulletin* (P/N 4303859, Applied Biosystems). Os valores de ΔCt para cada uma das amostras avaliadas foram calculados da seguinte maneira:

$$\Delta Ct = CT_{\text{gene interesse}} - CT_{\text{gene referência (Hprt)}}$$

A expressão relativa do RNA mensageiro (RNAm) amostral em relação ao grupo controle foi calculada por meio da fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, sendo que

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{controle}}.$$

A lista dos primers utilizados durante as reações de qPCR

Gene	Sequência
<i>Adora 1</i>	F: ATG AAC CCC ATC GTC TAT GC R: GGA AGT GGT CGT TCC AAA TC
<i>Adora 2a</i>	F: TTC TTC GCC TGC TTT GTC CT R: ATA CCC GTC ACC AAG CCA TT
<i>Adora 2b</i>	F: CTG CTC ATA ATG CTG GTG ATC T R: ATC AGT TCC ATG CGC TGA
<i>Adora 3</i>	F: CTA CGC CTG CAA AAT AAA AAA G R: GTC CAA AGA ATC TGA GGT CTG A
<i>B2m</i>	F: CAC CCC CAC TGA GAC TGA TAC ATA R: TCA CAT GTC TCG ATC CCA GTA GA
<i>Ccl20</i>	F: AAC CTC CTC AGC CTA AGA GTC AAG R: CAG CTG TGA TCA TTT CCT CCT T
<i>Cox-2</i>	F: GTG GAA AAA CCT CGT CCA GA R: GTC CGG CTT CCA GTA TTG AG
<i>Cxcl1</i>	F: CTT CCC TTG GAC ATT TTG TGT C R: TTT GAA CGT CTC TGT CCC GAG
<i>Ifn-g</i>	F: CCT TTT TCG CCT TGC TGT TG R: GCA TCT TGG CTT TGC AGC T
<i>Il-1b</i>	F: TGA CAG GTG ATG AGA TGACCT GTTC R: TTG GAA GCA GCC CTT CAT CT

<i>Il-6</i>	F: TTC CTA CCC CAA TTT CCA AT R: CCT TCT GTC ACT CCA GCT TAT C
<i>Il-17a</i>	F: TGC CCT CCA CAA TGA AAA GA R: AAC ACG AAG CAG TTT GGG AC
<i>Hprt</i>	F: TGG AAA AGC CAA ATA CAA ACG R: CAA CAT CAA CAG GAC TCC TCG
<i>Rorc</i>	F: CAT TTT CTG CCT CTG CCT TC R: TCT TGG CCT TCA TTG TAC CC
<i>Tgf-β</i>	F: TCT GCT GAG GCT CAA GTT AAA R: ATC GCC AGG AAT TGT TGC

3.10. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, em experimentos com mais de dois grupos experimentais. Em experimentos com apenas dois grupos experimentais foi utilizado o “teste t” (não-pareado). Todos os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. A análise estatística e os gráficos foram feitos usando o *GraphPad prism* versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, USA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Aumento da expressão do receptor de adenosina A_{2A} ($A_{2A}R$) durante o desenvolvimento de tumor mamário que induz metástase

Para determinar se os receptores de adenosina (Adora1, Adora2a, Adora2b e Adora 3) são expressos em tumor mamário, camundongos da linhagem BALB/c foram inoculados com 5×10^4 células tumorais 4T-1 e 67NR e fragmentos do tumor foram coletados para avaliar a expressão dos mesmos por PCR em tempo real (qPCR) nos dias 15, 25 e 35 pós-inoculação (dpi). Aos 25 dpi das células 4T-1 observamos um aumento em torno de 4 vezes maior na expressão dos receptores A_{2A} (gene Adora2a) (Figura 1B) e A_3 (gene Adora3) (Figura 1D), comparado com os animais inoculados com as células 67NR. É importante observar que a expressão do receptor A_{2A} foi 10 vezes maior do que a do receptor A_3 no microambiente tumoral de animais que receberam as células 4T-1. No entanto, a expressão dos receptores A_1 (gene Adora1) e A_{2b} (gene Adora2b) foi similar em ambos os grupos (Figura 1A e C). Nossos dados mostram que o receptor A_{2A} é altamente expresso durante o desenvolvimento do tumor mamário 4T-1.

Figura 1. Expressão dos receptores de adenosina no tumor mamário. Camundongos BALB/c foram inoculados com 5×10^4 células tumorais que induz metástase (4T-1, círculo fechado) e que não induz metástase (67NR, círculo aberto) na quarta glândula mamária. Fragmentos do tumor foram coletados nos dias 15, 25 e 35 pós-inoculação (dpi) das células tumorais, submetidos à extração de RNA e a expressão relativa dos receptores Adora1 (A), Adora2a (B), Adora2b (C) e Adora3 (D) avaliada por qPCR. Os dados mostrados foram normalizados pela expressão do gene endógeno beta-2 microglobulina e são representativos de dois experimentos independentes. Os dados representam a média $\pm$ SEM de três camundongos por grupo experimental (* $p < 0.05$).

4.2. Deficiência do $A_{2A}R$ previne o crescimento do tumor mamário 4T-1

Para investigar o papel do $A_{2A}R$ durante o desenvolvimento do carcinoma mamário murino, camundongos BALB/c e deficientes do receptor de adenosina A_{2A} ($A_{2A}R^{-/-}$) foram inoculados com 5×10^4 células tumorais 4T-1 e 67NR e o volume dos tumores foi mensurado em dias alternados a partir do 10º dpi das células tumorais.

Os animais $A_{2A}R^{-/-}$ inoculados com as células 4T-1 apresentaram uma redução significativa do volume (Figura 2A) e do peso (Figura 2B) do tumor comparados com os animais BALB/c (controles). No entanto, não observamos diferença significativa no volume (Figura 2A) e no peso (Figura 2B) do tumor em animais BALB/c e $A_{2A}R^{-/-}$ inoculados com as células 67NR que não induz metástase. Esses dados indicam que a deficiência do $A_{2A}R$ previne o crescimento do tumor mamário 4T-1, sugerindo que a via de sinalização do receptor de adenosina A_{2A} favorece o crescimento do tumor mamário invasivo.

No dia 40 pós-inoculação das células tumorais 4T-1 é possível observar a presença de células tumorais distribuídos em sítios secundários, como por exemplo, nos pulmões dos animais BALB/c (Figura 2G). Além disso, nesse período evidenciamos um processo inflamatório intenso nos pulmões dos animais BALB/c inoculados com as células 4T-1 (Figura 2G) comparado com os dos animais deficientes do receptor A_{2A} (Figura 2H), que apresentaram uma redução do infiltrado inflamatório. Associado à redução da inflamação nos pulmões dos animais $A_{2A}R^{-/-}$ também observamos a diminuição de colônias de células tumorais (Figura 2H) quando comparados com animais BALB/c (Figura 2G). No entanto, ambos os grupos de animais que receberam as células tumorais 67NR apresentaram a arquitetura dos pulmões preservada com uma morfologia similar a dos animais *naive* (Figura 2E e 2F). Esses dados indicam que na ausência de $A_{2A}R$ há comprometimento do recrutamento de células inflamatórias para os sítios secundários do tumor, bem como no início do processo de metástase no tecido pulmonar.

Figura 2. Ausência de A₂AR reduz o crescimento do tumor mamário 4T-1. Camundongos BALB/c e A₂AR^{-/-} foram inoculados com 5x10⁴ células 4T-1 e 67NR na quarta glândula mamária e o volume (A) do tumor medido a partir do 10º dpi. O peso dos tumores (B) foi avaliado no 40º dpi. O pulmão dos animais BALB/c (C, E e G) e dos A₂AR^{-/-}

/- (D, F e H) foram coletados nos dias 0 (naive) e 40 dpi e processados e corados para visualização da histologia em microscopia óptica comum. Fotomicrografias representativas são mostradas em aumento de 100X. Os dados são representativos de dois experimentos independentes e representam a média $\pm$ SEM de cinco animais por grupo experimental (* $p < 0.05$).

4.3. Ausência de A_{2A}R promove uma redução da expressão de moléculas relacionadas com a resposta de células Th17 em tumor mamário 4T-1

Existem evidências que os processos inflamatórios estão associados com diferentes tipos de tumores. Para avaliar se a redução do crescimento do tumor nos animais deficientes de A_{2A}R é devido ao comprometimento de um perfil de resposta Th17, nossa próxima etapa foi determinar a expressão relativa dos genes relacionados com as populações de células produtoras de IL-17 durante o crescimento do tumor mamário. Para isso, os animais BALB/c e A_{2A}R -/- foram submetidos ao protocolo de indução de tumor - e após 25 dpi, fragmentos dos tumores foram coletados para avaliar a expressão de moléculas relacionadas com a indução e migração de células Th17 por qPCR.

Os resultados mostraram que existe uma redução significativa na expressão dos genes relacionados com o fenótipo das células Th17 como Il-6 (Figura 3A), Ccl20 (Figura 3B), Il-17a (Figura 3C) e Rorc (Figura 3D) nos animais A_{2A}R-/- em comparação com os animais BALB/c, mas não na expressão de Ifn- γ entre os dois grupos avaliados (Figura 3E).

Em seguida, para determinar as populações de linfócitos T produtores de IL-17 no microambiente tumoral, células isoladas do tumor foram colocadas em cultura durante 4 horas e estimuladas com PMA-ionomicina. Após esse período de cultura, o número absoluto de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e TCR $\gamma\delta$ ⁺ produtores de IL-17 foram avaliados por citometria de fluxo. Corroborando com os dados anteriores, observamos uma redução significativa do número absoluto de linfócitos T CD4⁺ (Figura 3F) e TCR $\gamma\delta$ ⁺ (Figura 3G) produtores de IL-

17 infiltrantes do tumor em animais $A_{2A}R^{-/-}$ comparados com os controles. No entanto, não há diferença do número de linfócitos T $CD8^{+}IL-17A^{+}$ (Figura 3H) entre os dois grupos experimentais analisados. Esses dados em conjunto indicam que a deficiência da via de sinalização do $A_{2A}R$ compromete a produção de IL-17A por linfócitos T no microambiente do tumor, sugerindo que a redução do crescimento tumor nos animais deficientes de $A_{2A}R$ é devido a diminuição de IL-17.

Figura 3. Ausência do $A_{2A}R$ compromete o número de linfócitos T produtores de IL-17 em tumor mamário 4T-1. Camundongos BALB/c e $A_{2A}R^{-/-}$ foram inoculados com 5×10^4 células tumorais que induz metástase (4T-1) e aos 25 dpi fragmentos do tumor foram coletados e submetidos à extração de RNA. A expressão relativa dos genes Il-6 (A), Ccl20 (B), Il-17a (C), Rorc (D) e Ifn-g (E) foi avaliada por qPCR. Os dados mostrados foram normalizados pela expressão do gene endógeno Hprt. Aos 25 dpi, células infiltrantes do tumor foram isoladas e estimuladas in vitro com PMA e ionomicina por 4 horas e a expressão intracelular de IL-17 avaliada por citometria de fluxo. O número total de células $CD4^{+}$ (F), $TCR\gamma\delta^{+}$ (G) e $CD8^{+}$ (H) produtoras de IL-17A foram avaliadas na população de células $CD3^{+}$ totais. Os dados são representativos de dois experimentos independentes, com

resultados semelhantes e estão apresentados como a média $\pm$ SEM de cinco camundongos por grupo experimental (* p <0,05).

4.4. A deficiência da expressão do A_{2A}R impede o recrutamento de neutrófilos para o microambiente tumoral

De acordo com resultados obtidos por Benevides em 2015 a presença de citocina IL-17 no microambiente tumoral favorece o recrutamento de neutrófilos com características pró-tumorais. Assim, avaliamos o infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral em animais BALB/c e A_{2A}R^{-/-} submetidos ao protocolo de indução de tumor mamário. No 25º dpi, células infiltrantes do tumor foram isoladas para a quantificação de neutrófilos, MDSC e monócitos inflamatórios por citometria de fluxo.

A frequência e o número absoluto de neutrófilos (Ly6G⁺Ly6C⁻) (Figura 4 A e B) e de MDSC (Ly6G⁺Ly6C⁺) (Figura 4A e C) provenientes do tumor de camundongos A_{2A}R^{-/-} apresentaram uma redução significativa em comparação com os animais controles. Em contraste, a frequência e o número de monócitos inflamatórios (Ly6G⁻ Ly6C⁺) infiltrantes do tumor de animais A_{2A}R^{-/-} (Figura 4 A e D) apresentaram um aumento significativo quando comparados com os controles. Esses resultados mostram que na ausência do A_{2A}R há o comprometimento do recrutamento de neutrófilos e de MDSC para o microambiente tumoral e consequentemente compromete o crescimento do tumor primário.

Figura 4. A inibição do A_{2A}R impede o recrutamento de neutrófilos para o microambiente do tumor mamário 4T-1. Camundongos BALB/c e A_{2A}R^{-/-} foram inoculados com 5×10⁴ células 4T-1 e aos 25 dpi, os leucócitos infiltrantes do tumor foram isolados e marcados com anticorpos específicos para avaliar as populações de células mieloides por citometria de fluxo. A frequência de neutrófilos, MDSC e monócitos inflamatórios foram avaliados quanto a expressão das moléculas LY6C e LY6G na população de células CD11b⁺MHCII⁺ conforme está representado na forma de dot plot (A). Os gráficos de barras representam o número absoluto de neutrófilos (B), MDSC (C) e de monócitos inflamatórios (D) presentes no tumor. Os dados representam a média ± SEM de cinco animais por grupo experimental (*p < 0.05).

4.5. Expressão dos receptores de adenosina e das ectonucleotidases em células tumorais 4T-1

Para avaliar se a via de sinalização de adenosina ocorre nas células tumorais, primeiramente investigamos se as células tumorais 4T-1 e 67NR expressam os receptores de adenosina. Para isso, o RNA foi extraído de cada linhagem de célula tumoral e a expressão dos receptores de adenosina (Adora1, Adora2a, Adora 2b e Adora3) foi avaliado por qPCR. As células 4T-1 apresentaram uma alta expressão dos receptores Adora1, Adora2a e Adora 2b comparados com as células 67NR (Figura 5A). No entanto, a expressão do gene Adora3 foi similar em ambas linhagens de células tumorais (Figura 5A). Em seguida, avaliamos a expressão do receptor A_{2A} e das ectonucleotidases CD73 e CD39 e em células tumorais 4T-1 por citometria de fluxo. De maneira interessante, as células tumorais 4T-1 além de expressarem os receptores de adenosina também expressam CD73 e CD39. Aproximadamente 96,5 % das células 4T-1 expressaram o receptor A_{2A} , 99% expressaram CD73, enquanto somente 3% delas expressaram o CD39 (Figura 5B). Nossos dados em conjunto sugerem que a via de sinalização de adenosina ocorre nas células tumorais 4T-1 e que estas células são capazes de metabolizar ATP e/ou AMP para a formação de adenosina.

Figura 5. Expressão dos receptores de adenosina e das ectonucleotidases em células tumorais. O RNA foi extraído das linhagens de células tumorais 4T-1 (barra preta) e 67NR (barra branca) e a expressão relativa dos receptores de adenosina Adora1, Adora2a, Adora2b e Adora3 foi avaliada por qPCR (A). Os dados mostrados foram normalizados pela expressão do gene endógeno Hprt e representam a média $\pm$ SEM de três amostras por grupo experimental (* $p < 0.05$). O Dot plot é um representativo da frequência de células 4T-1 quanto a expressão de A_2A R e das ectonucleotidases CD39 e CD73 (B) por citometria de fluxo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

4.6. A administração de AMP e / ou de adenosina in vitro promove o aumento da expressão de IL-6, CCL20 e CXCL1 em células tumorais 4T-1

Para avaliar se a via de sinalização de adenosina exerce algum efeito nas células tumorais 4T-1, as mesmas foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de AMP ou de adenosina (100 μ M, 300 μ M e 1 mM) durante 24 horas. Após esse período, foram coletadas, o RNA extraído e a expressão de IL-6, IL-1 β , CCL20 e CXCL-1 avaliado por qPCR. As células tratadas com AMP e ou adenosina na concentração de 1mM apresentaram uma alta expressão do gene de Il-6 (Figura 6A e 6E), Ccl20 (Figura 6B e 6F) e de Cxcl1 (Figura 6C e 6G) comparadas com as células não tratadas. A expressão do gene de Il-1b não foi alterado nas células tumorais em nenhuma das condições de cultura (Figura 6D e 6H). Esses dados indicam que via de sinalização de adenosina em células tumorais 4T-1 induz o

aumento da expressão de mediadores relacionados com um perfil de resposta de células T produtoras de IL-17.

Figura 6. A expressão de citocinas e quimiocinas em células 4T-1 tratadas ou não com AMP e / ou com adenosina. As células tumorais 4T-1 (2×10^5 células / poço) foram cultivadas em diferentes concentrações (100 µM, 300 µM e 1 mM) de AMP (A, B, C e D) e/ou adenosina (E, F, G e H) durante 24 horas. A expressão relativa de Il-6 (A e E), Ccl20 (B e F), Cxcl1 (C e G) e Il-1b (D e H) foram avaliadas por qPCR. Os dados mostrados foram normalizados pela expressão do gene endógeno Hprt e representam as médias $\pm$ SEM de três amostras por grupo experimental (* $p < 0,05$).

4.7. A deficiência do A_{2A}R promove uma redução da expressão de Cox-2 em tumor mamário que desenvolve metástase

De acordo com resultados obtidos por Carregaro em 2001 a indução de Cox-2 mediada pelo receptor A_{2A}R pode acontecer de maneira direta em células dendríticas. Para avaliar se a via de sinalização de adenosina e seu receptor (A_{2A}R) induz a expressão de ciclooxigenase-2 (Cox-2) durante o desenvolvimento de tumor mamário que desenvolve metástase, camundongos BALB/c foram submetidos ao protocolo de indução de tumor mamário e após 15°, 25° e 35° dpi das células tumorais 4T-1 e 67NR, um fragmento de cada tumor foi coletado, o RNA extraído e a expressão relativa de Cox-2 foi avaliada por qPCR. Aos 25° dpi das células 4T-1, observamos um pico da expressão de Cox-2 no microambiente tumoral de animais que receberam as células 4T-1 comparados com os que foram inoculados com as células 67NR (Figura 7A). Em seguida, avaliamos se a deficiência de A_{2A}R afetaria a expressão de Cox2 nos tumores. De maneira interessante, a expressão de Cox-2 foi significativamente reduzida nos tumores provenientes de animais A_{2A}R^{-/-} comparados com os animais BALB/c (Figura 7B). Esses dados indicam que durante o crescimento do tumor mamário 4T-1 a Cox-2 é altamente expressa e que a deficiência de A_{2A}R *in vivo* compromete a expressão dessa enzima no microambiente tumoral.

Figura 7. Expressão de Cox-2 no tumor mamário que desenvolve metástase. Camundongos BALB/c foram inoculados com 5×10^4 4T-1 ou 67NR. Os fragmentos do tumor foram coletados nos dias 15, 25 e 35 dpi das células tumorais, submetidos à extração de RNA e a expressão relativa de Cox-2 (A) avaliada por qPCR. Os dados mostrados foram normalizados pela expressão do gene endógeno Beta-2 microglobulina. Camundongos BALB/c e A_{2A}R^{-/-} foram submetidos ao protocolo de indução de tumor com células 4T-1 e no dia 25 dpi, os fragmentos do tumor foram coletados e submetidos à extração de RNA. A expressão relativa de Cox-2 (B) foi avaliada por qPCR. Os dados mostrados foram normalizados pela expressão do gene endógeno Hprt. Os dados mostrados são representativos de dois experimentos independentes e representam a média $\pm$ SEM de três camundongos por grupo experimental (* $p < 0.05$).

4.8. Inibição de Cox-2 promove a redução do crescimento do tumor mamário 4T-1

Para avaliar se o bloqueio de Cox-2 compromete o desenvolvimento do tumor mamário. Animais BALB/c foram submetidos ao protocolo de indução de tumor mamário e aos 15 dpi das células tumorais 4T-1, um grupo de animais foram tratados pela via intraperitoneal com inibidor geral de Cox (indometacina - 5mg/kg) ou com inibidor seletivo de Cox-2 (celecoxib - 5mg/kg) ou com veículo (PBS 1x + DMSO 10%) durante 3 semanas. Os volumes dos tumores foram mensurados durante todo o período de tratamento dos animais. Os animais tratados com indometacina (Figura 8A) ou celecoxib (Figura 8B) preveniu o crescimento dos tumores comparados com os animais que receberam somente o

veículo. Em seguida, avaliamos se a inibição de Cox-2 preveniu o crescimento do tumor devido ao comprometimento da resposta de linfócitos T produtores de IL-17. Os animais tratados com inibidor de Cox-2 no microambiente tumoral apresentaram uma redução da expressão de Il-6 (Figura 8C), Ccl20 (Figura 8D), Il-17a (Figura 8E) e Rorc (Figura 8F) comparado com os animais tratados com veículo. A expressão de Cxcl1 (Figura 8H), Ifn-g (Figura 8G) e Tgf-b (Figura 8I) foi similar em ambos os grupos experimentais. Os dados sugerem que a inibição de Cox-2 compromete o perfil de resposta de perfil Th17 e consequentemente previne o crescimento do tumor.

Figura 8. Inibição de Cox-2 previne o crescimento do tumor mamário 4T-1. Camundongos BALB/c foram inoculados com 5×10^4 4T-1 e após 15 dpi os animais foram tratados ou não com indometacina (inibidor geral de Cox) ou celecoxib (inibidor seletivo de Cox-2) pela via intraperitoneal (5 mg / kg) em dias alternados. Os volumes dos tumores foram mensurados durante o tratamento dos animais com indometacina (A) ou celecoxib (B). Fragmentos do tumor foram coletados no dia 40 dpi das células 4T-1 e submetidos à extração de RNA e a expressão relativa dos genes Il-6 (C), Ccl20 (D), Il-17a (E), Rorc (F), Ifn-g (G),

Cxcl1(H) e Tgf-b (I) foi avaliada por qPCR. Os dados mostrados foram normalizados pela expressão do gene endógeno Hprt. Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes e representam as médias $\pm$ SEM de quatro camundongos por grupo experimental (*p < 0,05).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O papel do receptor de adenosina A_{2A} no eixo Th17 durante o desenvolvimento de carcinoma mamário e a relação do mecanismo de indução desse subtipo celular com a presença de PGE-2, ainda não foram descritos. Altas concentrações de adenosina estão presentes no espaço extracelular de tumores sólidos, sugerindo assim, um papel dessa molécula no crescimento tumoral (Fredholm et al., 2001). Inicialmente, verificamos a expressão dos receptores de adenosina (Adora1, Adora2a, Adora2b e Adora 3) durante a progressão tumoral em camundongos BALB/c. Nesse contexto, nossos resultados mostraram uma alta expressão de Adora2a na fase inicial de desenvolvimento do tumor mamário que induz metástase. Outros estudos também mostraram que em diferentes tipos de câncer como leucemia linfocítica crônica humana (Serra et al., 2011), mieloma (Rickles et al., 2012) e em células de melanoma (Merighi et al., 2002) os receptores A_{2A} funcionais são expressos.

Em seguida, observamos que a ausência do $A_{2A}R$ previne o crescimento do tumor mamário, o qual induz metástase acompanhado de um menor peso tumoral, sugerindo que a via de sinalização através desse receptor de adenosina favorece a progressão do tumor. Estudos demonstram que a adenosina pode afetar o crescimento tumoral mediante sua ligação direta a receptores específicos que se encontram na superfície das células tumorais (Pages et al., 2005). Também evidenciamos uma redução do infiltrado inflamatório nos pulmões de camundongos deficientes do receptor A_{2A} , associado a uma diminuição nas colônias de células tumorais 4T-1. Estudos recentes mostraram que o bloqueio farmacológico ou com modelos de camundongos geneticamente deficientes da via de sinalização dos receptores de adenosina A_{2A} e A_{2B} , reduz o potencial de gerar metástase em modelo de melanoma (Beavis et al., 2013). Na ausência de $A_{2A}R$ e $A_{2B}R$ existe um

comprometimento no recrutamento de células inflamatórias para os sítios secundários do tumor, bem como o retardo no início do processo de metástase.

Nossos dados mostram que a deficiência do A_{2A}R leva a uma redução na expressão relativa dos genes relacionados com as subpopulações de linfócitos Th17, assim como uma diminuição do número total das populações de células produtoras de IL-17 durante a progressão tumoral. As células Th17 foram recentemente reconhecidas como outro subtipo de linfócitos T CD4⁺, as quais são caracterizadas pela produção de elevadas quantidades da citocina pró-inflamatória IL-17A (Fouser et al., 2008; Harrington et al., 2005; Park et al., 2005) e pela expressão do fator de transcrição ROR γ t (Ivanov et al., 2006). Além das células Th17, linfócitos T $\gamma\delta$ ⁺, embora constituam menos de 2% dos linfócitos T circulantes, representam uma importante fonte de produção de citocina IL-17A (Roark et al., 2008). Adicionalmente, em algumas neoplasias humanas, a citocina IL-17A também pode ser é secretada por diferentes células do sistema imune que infiltram tumores, tais como monócitos, macrófagos e linfócitos T CD8⁺ (Zhu et al., 2008).

Embora exista um reduzido número de células Th17 circulantes no sangue periférico de pacientes com câncer, elevadas quantidades de células Th17 são observados no microambiente tumoral. Existem diversos estudos que corroboram essa informação em variados tipos de neoplasias tais como: ovário (Miyahara et al., 2008), gástrico (Maruyama et al., 2010), mamário (Su et al., 2010), colorretal (Tosolini et al., 2011) e melanoma (Su et al., 2010), sugerindo que as células Th17 podem ser recrutadas, induzidas ou expandidas no tumor por meio do efeito de fatores produzidos tanto por células tumorais quanto do hospedeiro que infiltram no tumor. Estudos recentes demonstram que no estroma peritumoral de carcinoma hepatocelular, monócitos CD68⁺ e macrófagos podem promover a expansão das células Th17 mediante a secreção de um conjunto de citocinas pró-inflamatórias tais

como: IL-1 β , IL-6, e IL-23 (Kuang et al., 2010a). Estudos realizados em modelos experimentais de tumores murinos usando camundongos geneticamente deficientes da citocina IL-17 mostraram que existe uma diminuição no crescimento de tumor primário assim como acontece no modelo de melanoma murino B16 (Wang et al., 2009). As células Th17 apresentam como principal característica a indução de uma potente atividade pró-inflamatória, mediada fundamentalmente pela liberação de citocina IL-17A e de outras citocinas tais como: IL-17F, IL-22 e IL-23 (Codarri et al., 2011; Maniati et al., 2010).

A inflamação desempenha papéis importantes em diferentes estágios do desenvolvimento de tumores, incluindo a iniciação, promoção, invasão e metástase (Grivennikov et al., 2010). A inflamação que se gera no microambiente tumoral pela ação das células Th17, promove o crescimento do tumor primário e a formação de focos de metástase devido à estimulação da angiogênese e pela supressão da imunidade contra tumores (Maniati et al., 2010). Além disso, o processo de angiogênese pode ser mediado diretamente pela citocina IL-17A que induz o aumento na produção de fator VEGF e outros fatores pró-angiogênicos por células tumorais e fibroblastos (Numasaki et al., 2003). Outros estudos mostraram que a supressão da imunidade antitumoral pode ser gerada pelas células Th17, mediante a expressão em sua superfície das ectonucleotidases CD39 (metaboliza o ATP a AMP) e CD73 (transforma o AMP em adenosina). A expressão das ectonucleotidases não só foi observado em células Th17 diferenciadas na presença de TGF- β e IL-6 *in vitro*, mas também em células Th17 isoladas a partir de vários tumores experimentais *in vivo*, incluindo melanoma, carcinoma colorretal, linfoma do timo e carcinoma pulmonar onde a expressão das ectonucleotidases pode ser induzida por TGF- β produzido pelas células tumorais (Chalmin et al., 2012). A expressão de ectonucleotidase nas células Th17 aumenta os níveis de adenosina extracelular, inibindo a resposta imune no microambiente tumoral

(Stagg and Smyth, 2010). Em conjunto, nossos resultados sugerem que a deficiência da via de sinalização do A_{2A}R compromete o recrutamento das populações de linfócitos produtoras de citocina IL-17A em uma fase inicial de desenvolvimento do tumor primário. Desta forma, é possível que a via de sinalização do receptor de adenosina A_{2A} participe da progressão tumoral, mediante a indução de uma resposta pró-inflamatória mediada essencialmente por células do perfil Th17.

Além da diminuição da migração de linfócitos T produtores de IL-17A, nossos resultados mostraram ainda que a ausência do receptor de adenosina A_{2A} afeta também o recrutamento de neutrófilos ao microambiente tumoral. Observamos que camundongos deficientes de A_{2A}R apresentam uma redução na frequência e no número absoluto de neutrófilos (Ly6G⁺ Ly6C⁻) e MDSC (Ly6G⁺ Ly6C⁺) durante a progressão de tumores 4T-1, enquanto que observamos um aumento na frequência e no número total de monócitos inflamatórios (Ly6G⁻ Ly6C⁺) na ausência desse receptor. Diversos estudos realizados tanto em pacientes com câncer como em modelos experimentais murinos demonstraram que o tumor primário pode alterar o processo de mielopoiese, transformando células mieloides, em células com elevada capacidade imunossupressora (McKenna and Kapp, 2006). Nesse contexto, os neutrófilos patologicamente ativados, como é o caso dos neutrófilos associados a tumores, desenvolvem um fenótipo pró-tumorigênico, favorecendo a progressão das neoplasias (Mantovani et al., 2011). Estudos recentes mostraram que a citocina pró-inflamatória de IL-17 é um mediador fundamental para o recrutamento de neutrófilos no microambiente tumoral, encontrando-se envolvidos tanto em respostas inflamatórias assim como modulando a angiogênese (Kuang et al., 2011).

Por sua vez, as células MDSC, descritas em pacientes com câncer (Baron et al., 2007), representam uma população heterogênea de células mieloides progenitoras e células

mieloides imaturas (Gavin et al., 2006; Greten et al., 2011; von Boehmer, 2005). Existem diferentes evidências das potencialidades supressoras das MDSC sobre outras células do sistema imune. Estudos realizados em pacientes com carcinoma hepatocelular demonstraram que as MDSC são potentes supressoras das células NK, as quais possuem um importante papel na imunidade contra tumores (Hoechst et al., 2009). Além disso, outros estudos demonstraram que as MDSC podem induzir células Tregs Foxp3⁺ assim como diferentes subtipos de linfócitos T CD4⁺ como as células Th17 (Hoechst et al., 2011).

Monócitos também representam uma população de células com características imunossupressoras presentes no microambiente tumoral. Estudos do estroma peritumoral de pacientes com carcinoma hepatocelular demonstraram a supressão da resposta efetora de linfócitos T mediada pela expressão de PD-1L na superfície de monócitos e macrófagos (Kuang et al., 2009) além da capacidade destas células de induzir a produção de IL-17 por linfócitos T CD8⁺ (Kuang et al., 2010b) e Th17 (Kuang et al., 2010b). Nossos resultados em conjunto indicam que a ausência da via de sinalização do A_{2A}R compromete o recrutamento das populações de células produtoras de citocina IL-17A, fenômeno que pode ser acompanhado de uma redução no recrutamento dos neutrófilos e das MDSC no microambiente tumoral, afetando o desenvolvimento do tumor mamário que induz metástase.

Em seguida, avaliamos se a via de sinalização de adenosina ocorre diretamente nas células tumorais e observamos que os receptores de adenosina Adora1, Adora2a e Adora 2b se encontram expressos nas células 4T-1 e não nas células 67NR. No entanto, a expressão de Adora3 se apresenta diminuída em ambas as linhagens de células tumorais. Existem evidências que os receptores de adenosina se encontram expressos em outras linhagens tumorais como as células de tumor de cólon humano HT29, as quais apresentam os quatro subtipos de receptores de adenosina (Gessi et al., 2007). A presença dos receptores de

adenosina foi associada ao elevado aumento da expressão de fator induzido por hipoxia-1 (HIF-1 do inglês *hypoxia-inducible factor-1*) em células de melanoma humano A375 (Merighi et al., 2005a; Merighi et al., 2005b). Além disso, outros estudos demonstraram que em diferentes tipos celulares a expressão do VEGF é regulada mediante os receptores de adenosina, visto que esta desempenha um importante papel na promoção de angiogênese em neoplasias (Feoktistov et al., 2002; Feoktistov et al., 2003; Feoktistov et al., 2004; Leibovich et al., 2002).

Posteriormente, determinamos a presença das ectonucleotidases CD39 e CD73 nas células tumorais 4T-1. Evidenciamos um aumento na expressão de CD73 e baixa expressão de CD39 nas células tumorais que induzem metástase. Estudos recentes mostraram que CD73 é altamente expressa em diversas linhagens tumorais e em biópsias de pacientes, incluindo câncer de mama (Stagg and Smyth, 2010; Wang et al., 2008), câncer colorretal (Liu et al., 2012; Wu et al., 2012), câncer de ovário (Jin et al., 2010) e câncer gástrico (Lu et al., 2013), associado a características clínicas dos pacientes. Nossos dados, em conjunto, mostram que a via de sinalização de adenosina ocorre somente nas células tumorais que induzem metástase e que estas células conseguem metabolizar o AMP existente no espaço extracelular em adenosina, que se encontra em concentrações elevadas no tumor. Isso pode favorecer a captação da adenosina pelas próprias células tumorais e por outras células presentes no microambiente tumoral.

Depois pesquisamos se as próprias células tumorais 4T-1 apresentavam a capacidade de induzir mediadores que favorecem um perfil de resposta pró-inflamatória, mediada fundamentalmente pelo recrutamento de células Th17 e neutrófilos. Observamos que as células estimuladas com a maior concentração (1mM) tanto de AMP ou de adenosina, apresentam um aumento na expressão dos genes Il-6, Ccl20 e Cxcl1. Existem estudos que

mostram a capacidade da adenosina de modular os mediadores produzidos por diferentes tipos de células, por exemplo: em células dendríticas diferenciadas na presença de adenosina são altamente expressos fatores angiogênicos, pró-inflamatórios, imunossupressores e tolerogênicos, incluindo o VEGF, IL-8, IL-6, IL-10, Cox-2 e TGF- β (Novitskiy et al., 2008). Nossos resultados indicam que a via de sinalização mediada pelo receptor de adenosina A_{2A}, pode induzir o aumento de citocinas e quimiocinas relacionadas com um perfil de respostas pró-inflamatórias nas células tumorais que induzem metástase.

Posteriormente, verificamos a expressão de Cox-2 durante a progressão de tumor mamário em camundongos BALB/c. Observamos uma alta expressão de Cox-2 em uma fase inicial de desenvolvimento do tumor 4T-1. Em paralelo, observamos um comprometimento dessa expressão na ausência de A_{2A}R. Estudos mostram que mediadores inflamatórios podem ser produzidos por leucócitos que infiltram o tumor, ou diretamente pelas células tumorais. Um dos mediadores que se encontra em elevadas concentrações no tumor é o lipídeo PGE₂, sendo associado com o aumento da sobrevivência das células tumorais, crescimento, migração, invasão, angiogênese e imunossupressão (Wang and Dubois, 2010). As enzimas Cox-1 e Cox-2 são críticas para a produção de PGE₂, encontrando-se muitas vezes altamente expressas em diferentes tipos de tumores tais como: colorretal, mama, estômago, do pulmão (Dannenberg and Subbaramaiah, 2003; Wang and Dubois, 2010). Portanto, nossos resultados sugerem que a via de sinalização mediada pelo A_{2A}R no microambiente tumoral pode levar ao aumento da expressão de Cox-2, e, consequentemente dos produtos gerados por esta enzima, como a PGE₂. Tudo isso em conjunto pode favorecer a progressão da doença.

Quando avaliamos o efeito da inibição de Cox durante o desenvolvimento do tumor mamário que induz metástase, observamos uma redução no volume tumoral nos animais

tratados tanto com a indometacina assim como com o celecoxib. Depois determinamos a expressão de diferentes moléculas relacionadas com um perfil de resposta pró-inflamatória após a inibição seletiva de Cox-2. Observamos uma tendência na diminuição da expressão de Il-6, Ccl20, Il-17a, Rorc e Cxcl1 nos camundongos tratados com celecoxib, enquanto observamos uma tendência de aumento na expressão de Ifn-g e Tgf-b. Estudos recentes demonstraram que inflamação é um importante fator de promoção das neoplasias (Coussens et al., 2013; Grivennikov et al., 2010). A inflamação promotora de tumores é caracterizada pela presença de diferentes subtipos de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T que sustentam a progressão tumoral (Coussens et al., 2013; Sica et al., 2008). Os mediadores secretados por estas células que promovem diretamente ou indiretamente o crescimento de células tumorais incluem: citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, tais como VEGF-A, CSF, IL-1, IL-6, IL-8, ou CXCL1 (Coussens et al., 2013). Nossos dados sugerem que Cox-2 e seus produtos podem ser muito importantes durante a progressão tumoral, favorecendo o aumento de citocinas e quimiocinas que estão relacionados com um perfil de resposta inflamatória.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A deficiência do receptor de adenosina A_{2A} previne o crescimento do tumor mamário que desenvolve metástase. A redução do crescimento do tumor é associada à diminuição do número de linfócitos T produtores de IL-17 e de neutrófilos no microambiente tumoral.
2. A via de sinalização de adenosina ocorre em células tumorais 4T-1 e induz um aumento da expressão de mediadores essenciais para o recrutamento e acúmulo de linfócitos T produtores de IL-17.
3. A ausência de A_{2A} reduz a expressão de Cox-2 no tumor primário e a inibição de Cox-2 previne o crescimento do tumor e a expressão de moléculas relacionadas com a resposta Th17 no microambiente tumoral.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Antonioli, L., Fornai, M., Colucci, R., Ghisu, N., Tuccori, M., Del Tacca, M., and Blandizzi, C. (2008). Regulation of enteric functions by adenosine: pathophysiological and pharmacological implications. *Pharmacology & therapeutics* 120, 233-253.

Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., and Hasko, G. (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine* 19, 355-367.

Bach, E.A., Aguet, M., and Schreiber, R.D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15, 563-591.

Baron, U., Floess, S., Wieczorek, G., Baumann, K., Grutzkau, A., Dong, J., Thiel, A., Boeld, T.J., Hoffmann, P., Edinger, M., *et al.* (2007). DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 37, 2378-2389.

Basso, A.S., Cheroutre, H., and Mucida, D. (2009). More stories on Th17 cells. *Cell research* 19, 399-411.

Bastid, J., Cottalorda-Regairaz, A., Alberici, G., Bonnefoy, N., Eliaou, J.F., and Bensussan, A. (2013). ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* 32, 1743-1751.

Beavis, P.A., Milenkovski, N., Stagg, J., Smyth, M.J., and Darcy, P.K. (2013). A blockade enhances anti-metastatic immune responses. *Oncoimmunology* 2, e26705.

Beavis, P.A., Stagg, J., Darcy, P.K., and Smyth, M.J. (2012). CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol* 33, 231-237.

Benevides, L., Cardoso, C.R., Tiezzi, D.G., Marana, H.R., Andrade, J.M., and Silva, J.S. (2013). Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. *Eur J Immunol* 43, 1518-1528.

Benevides, L., da Fonseca, D.M., Donate, P.B., Tiezzi, D.G., De Carvalho, D.D., de Andrade, J.M., Martins, G.A., and Silva, J.S. (2015). IL17 Promotes Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. *Cancer Res* 75, 3788-3799.

Blay, J., White, T.D., and Hoskin, D.W. (1997). The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res* 57, 2602-2605.

Carregaro, V., Sa-Nunes, A., Cunha, T.M., Grespan, R., Oliveira, C.J., Lima-Junior, D.S., Costa, D.L., Verri, W.A., Jr., Milanezi, C.M., Pham, V.M., *et al.* (2011). Nucleosides from *Phlebotomus papatasi* salivary gland ameliorate murine collagen-induced arthritis by impairing dendritic cell functions. *J Immunol* 187, 4347-4359.

Chalmin, F., Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Vegran, F., Hichami, A., Ladoire, S., Derangere, V., Vincent, J., Masson, D., *et al.* (2012). Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 36, 362-373.

Chen, E.P., and Smyth, E.M. (2011). COX-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer. *Prostaglandins & other lipid mediators* 96, 14-20.

Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011). RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12, 560-567.

Coussens, L.M., Zitvogel, L., and Palucka, A.K. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* 339, 286-291.

Csoka, B., Nemeth, Z.H., Selmeczy, Z., Koscsó, B., Pacher, P., Vizi, E.S., Deitch, E.A., and Hasko, G. (2007). Role of A(2A) adenosine receptors in regulation of opsonized *E. coli*-induced macrophage function. *Purinergic signalling* 3, 447-452.

da Matta Guedes, P.M., Gutierrez, F.R., Maia, F.L., Milanezi, C.M., Silva, G.K., Pavanelli, W.R., and Silva, J.S. (2010). IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e604.

Dannenberg, A.J., and Subbaramaiah, K. (2003). Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. *Cancer cell* 4, 431-436.

Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., *et al.* (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* 204, 1257-1265.

Decking, U.K., Schlieper, G., Kroll, K., and Schrader, J. (1997). Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. *Circulation research* 81, 154-164.

Downey, S.G., Klapper, J.A., Smith, F.O., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Allen, T.E., Levy, C.L., *et al.* (2007). Prognostic factors related to clinical response in patients with metastatic melanoma treated by CTL-associated antigen-4 blockade. *Clin Cancer Res* 13, 6681-6688.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 3, 991-998.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology* 22, 329-360.

Feoktistov, I., Goldstein, A.E., Ryzhov, S., Zeng, D., Belardinelli, L., Voyno-Yasenetskaya, T., and Biaggioni, I. (2002). Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res* 90, 531-538.

Feoktistov, I., Ryzhov, S., Goldstein, A.E., and Biaggioni, I. (2003). Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circ Res* 92, 485-492.

Feoktistov, I., Ryzhov, S., Zhong, H., Goldstein, A.E., Matafonov, A., Zeng, D., and Biaggioni, I. (2004). Hypoxia modulates adenosine receptors in human endothelial and smooth muscle cells toward an A2B angiogenic phenotype. *Hypertension* 44, 649-654.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.

Fosslien, E. (2001). Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Annals of clinical and laboratory science* 31, 325-348.

Fouser, L.A., Wright, J.F., Dunussi-Joannopoulos, K., and Collins, M. (2008). Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol Rev* 226, 87-102.

Fredholm, B.B., AP, I.J., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., and Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53, 527-552.

Fredholm, B.B., AP, I.J., Jacobson, K.A., Linden, J., and Muller, C.E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev* 63, 1-34.

Fredholm, B.B., Chern, Y., Franco, R., and Sitkovsky, M. (2007). Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog Neurobiol* 83, 263-276.

Fridlender, Z.G., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Cheng, G., Kapoor, V., Horng, W., Fridlender, G., Bayuh, R., Worthen, G.S., *et al.* (2012). Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS One* 7, e31524.

Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12, 253-268.

Gao, Q., Wang, X.Y., Qiu, S.J., Yamato, I., Sho, M., Nakajima, Y., Zhou, J., Li, B.Z., Shi, Y.H., Xiao, Y.S., *et al.* (2009). Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 15, 971-979.

Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186-1190.

Gavin, M.A., Torgerson, T.R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W.Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E.L., Greenberg, P.D., Ochs, H.D., and Rudensky, A.Y. (2006). Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6659-6664.

Gessi, S., Merighi, S., Varani, K., Cattabriga, E., Benini, A., Mirandola, P., Leung, E., Mac Lennan, S., Feo, C., Baraldi, S., *et al.* (2007). Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A(3) adenosine subtype. *J Cell Physiol* 211, 826-836.

Greten, T.F., Manns, M.P., and Korangy, F. (2011). Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol* 11, 802-807.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132.

Hasko, G., and Cronstein, B.N. (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in immunology* 25, 33-39.

Hasko, G., and Pacher, P. (2008). A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *Journal of leukocyte biology* 83, 447-455.

Hata, A.N., and Breyer, R.M. (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 103, 147-166.

Hockel, M., and Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93, 266-276.

Hoechst, B., Gamrekelashvili, J., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2011). Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. *Blood* 117, 6532-6541.

Hoechst, B., Voigtlaender, T., Ormandy, L., Gamrekelashvili, J., Zhao, F., Wedemeyer, H., Lehner, F., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2009). Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* 50, 799-807.

Hoskin, D.W., Mader, J.S., Furlong, S.J., Conrad, D.M., and Blay, J. (2008). Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *International journal of oncology* 32, 527-535.

Hulpke, S., and Tampe, R. (2013). The MHC I loading complex: a multitasking machinery in adaptive immunity. *Trends Biochem Sci* 38, 412-420.

INCA. Instituto Nacional do câncer. (2012).

Inman, B.A., Frigola, X., Dong, H., and Kwon, E.D. (2007). Costimulation, coinhibition and cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 7, 15-30.

Inohara, Chamaillard, McDonald, C., and Nunez, G. (2005). NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 74, 355-383.

Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.

Iwakura, Y., and Ishigame, H. (2006). The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of clinical investigation* 116, 1218-1222.

Jin, D., Fan, J., Wang, L., Thompson, L.F., Liu, A., Daniel, B.J., Shin, T., Curiel, T.J., and Zhang, B. (2010). CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res* 70, 2245-2255.

Jovanovic, I., Radosavljevic, G., Mitrovic, M., Juranic, V.L., McKenzie, A.N., Arsenijevic, N., Jonjic, S., and Lukic, M.L. (2011). ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol* 41, 1902-1912.

Karin, M., and Greten, F.R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews Immunology* 5, 749-759.

Khader, S.A., Bell, G.K., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G.E., Shen, F., Eaton, S.M., Gaffen, S.L., Swain, S.L., *et al.* (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 8, 369-377.

Klinger, M., Freissmuth, M., and Nanoff, C. (2002). Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cellular signalling* 14, 99-108.

Kuang, D.M., Peng, C., Zhao, Q., Wu, Y., Chen, M.S., and Zheng, L. (2010a). Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma promote expansion of memory T helper 17 cells. *Hepatology* 51, 154-164.

Kuang, D.M., Peng, C., Zhao, Q., Wu, Y., Zhu, L.Y., Wang, J., Yin, X.Y., Li, L., and Zheng, L. (2010b). Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8+ T cells in hepatocellular carcinoma patients. *J Immunol* 185, 1544-1549.

Kuang, D.M., Zhao, Q., Peng, C., Xu, J., Zhang, J.P., Wu, C., and Zheng, L. (2009). Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med* 206, 1327-1337.

Kuang, D.M., Zhao, Q., Wu, Y., Peng, C., Wang, J., Xu, Z., Yin, X.Y., and Zheng, L. (2011). Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 54, 948-955.

Kundu, N., Walser, T.C., Ma, X., and Fulton, A.M. (2005). Cyclooxygenase inhibitors modulate NK activities that control metastatic disease. *Cancer Immunol Immunother* 54, 981-987.

Langers, I., Renoux, V.M., Thiry, M., Delvenne, P., and Jacobs, N. (2012). Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics : targets & therapy* 6, 73-82.

Lee, B.L., Liedke, P.E., Barrios, C.H., Simon, S.D., Finkelstein, D.M., and Goss, P.E. (2012). Breast cancer in Brazil: present status and future goals. *The lancet oncology* 13, e95-e102.

Leibovich, S.J., Chen, J.F., Pinhal-Enfield, G., Belem, P.C., Elson, G., Rosania, A., Ramanathan, M., Montesinos, C., Jacobson, M., Schwarzschild, M.A., *et al.* (2002). Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A(2A) receptor agonists and endotoxin. *Am J Pathol* 160, 2231-2244.

Liu, N., Fang, X.D., and Vadis, Q. (2012). CD73 as a novel prognostic biomarker for human colorectal cancer. *J Surg Oncol* 106, 918-919; author reply 920.

Lokshin, A., Raskovalova, T., Huang, X., Zacharia, L.C., Jackson, E.K., and Gorelik, E. (2006). Adenosine-mediated inhibition of the cytotoxic activity and cytokine production by activated natural killer cells. *Cancer research* 66, 7758-7765.

Lu, X.X., Chen, Y.T., Feng, B., Mao, X.B., Yu, B., and Chu, X.Y. (2013). Expression and clinical significance of CD73 and hypoxia-inducible factor-1alpha in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 19, 1912-1918.

Maniati, E., Soper, R., and Hagemann, T. (2010). Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene* 29, 5653-5662.

Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11, 519-531.

Maruyama, T., Kono, K., Mizukami, Y., Kawaguchi, Y., Mimura, K., Watanabe, M., Izawa, S., and Fujii, H. (2010). Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-

infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer Sci* 101, 1947-1954.

McKenna, K.C., and Kapp, J.A. (2006). Accumulation of immunosuppressive CD11b+ myeloid cells correlates with the failure to prevent tumor growth in the anterior chamber of the eye. *J Immunol* 177, 1599-1608.

Merighi, S., Benini, A., Mirandola, P., Gessi, S., Varani, K., Leung, E., MacLennan, S., Baraldi, P.G., and Borea, P.A. (2005a). A3 adenosine receptors modulate hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human A375 melanoma cells. *Neoplasia* 7, 894-903.

Merighi, S., Benini, A., Mirandola, P., Gessi, S., Varani, K., Leung, E., MacLennan, S., and Borea, P.A. (2005b). A3 adenosine receptor activation inhibits cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells. *J Biol Chem* 280, 19516-19526.

Merighi, S., Mirandola, P., Milani, D., Varani, K., Gessi, S., Klotz, K.N., Leung, E., Baraldi, P.G., and Borea, P.A. (2002). Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 119, 923-933.

Merighi, S., Mirandola, P., Varani, K., Gessi, S., Leung, E., Baraldi, P.G., Tabrizi, M.A., and Borea, P.A. (2003). A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacology & therapeutics* 100, 31-48.

Miyahara, Y., Odunsi, K., Chen, W., Peng, G., Matsuzaki, J., and Wang, R.F. (2008). Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15505-15510.

Montesinos, M.C., Shaw, J.P., Yee, H., Shamamian, P., and Cronstein, B.N. (2004). Adenosine A(2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *Am J Pathol* 164, 1887-1892.

Mu, C.Y., Huang, J.A., Chen, Y., Chen, C., and Zhang, X.G. (2011). High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol* 28, 682-688.

Nemeth, Z.H., Leibovich, S.J., Deitch, E.A., Sperlagh, B., Virag, L., Vizi, E.S., Szabo, C., and Hasko, G. (2003). Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. *Biochemical and biophysical research communications* 312, 883-888.

Novitskiy, S.V., Ryzhov, S., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A.E., Huang, Y., Tikhomirov, O.Y., Blackburn, M.R., Biaggioni, I., Carbone, D.P., Feoktistov, I., *et al.* (2008). Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* 112, 1822-1831.

Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., and Lotze, M.T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101, 2620-2627.

Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S.J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M.K., Huang, X., Caldwell, S., Liu, K., Smith, P., *et al.* (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13132-13137.

Pages, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., *et al.* (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353, 2654-2666.

Palmer, T.M., and Trevethick, M.A. (2008). Suppression of inflammatory and immune responses by the A(2A) adenosine receptor: an introduction. *British journal of pharmacology* 153 Suppl 1, S27-34.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6, 1133-1141.

Pierce, B.L., Ballard-Barbash, R., Bernstein, L., Baumgartner, R.N., Neuhouser, M.L., Wener, M.H., Baumgartner, K.B., Gilliland, F.D., Sorensen, B.E., McTiernan, A., *et al.* (2009). Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 3437-3444.

Pouliot, M., Fiset, M.E., Masse, M., Naccache, P.H., and Borgeat, P. (2002). Adenosine up-regulates cyclooxygenase-2 in human granulocytes: impact on the balance of eicosanoid generation. *J Immunol* 169, 5279-5286.

Qian, X., Gu, L., Ning, H., Zhang, Y., Hsueh, E.C., Fu, M., Hu, X., Wei, L., Hoft, D.F., and Liu, J. (2013). Increased Th17 cells in the tumor microenvironment is mediated by IL-23 via tumor-secreted prostaglandin E2. *Journal of immunology* 190, 5894-5902.

Qin, F.X. (2009). Dynamic behavior and function of Foxp3+ regulatory T cells in tumor bearing host. *Cell Mol Immunol* 6, 3-13.

Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E.M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual review of immunology* 25, 267-296.

Raskovalova, T., Huang, X., Sitkovsky, M., Zacharia, L.C., Jackson, E.K., and Gorelik, E. (2005). Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *J Immunol* 175, 4383-4391.

Rickles, R.J., Tam, W.F., Giordano, T.P., 3rd, Pierce, L.T., Farwell, M., McMillin, D.W., Necheva, A., Crowe, D., Chen, M., Avery, W., *et al.* (2012). Adenosine A2A and beta-2 adrenergic receptor agonists: novel selective and synergistic multiple myeloma targets discovered through systematic combination screening. *Mol Cancer Ther* 11, 1432-1442.

Roark, C.L., Simonian, P.L., Fontenot, A.P., Born, W.K., and O'Brien, R.L. (2008). gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* 20, 353-357.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.

Schuler, P.J., Schilling, B., Harasymczuk, M., Hoffmann, T.K., Johnson, J., Lang, S., and Whiteside, T.L. (2012). Phenotypic and functional characteristics of CD4⁺ CD39⁺ FOXP3⁺ and CD4⁺ CD39⁺ FOXP3^{neg} T-cell subsets in cancer patients. *Eur J Immunol* 42, 1876-1885.

Serra, S., Horenstein, A.L., Vaisitti, T., Brusa, D., Rossi, D., Laurenti, L., D'Arena, G., Coscia, M., Tripodo, C., Inghirami, G., *et al.* (2011). CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood* 118, 6141-6152.

Sica, A., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett* 267, 204-215.

Sitkovsky, M.V., Kjaergaard, J., Lukashev, D., and Ohta, A. (2008). Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 5947-5952.

Sitkovsky, M.V., Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C., Ohta, A., and Thiel, M. (2004). Physiological control of immune response and inflammatory tissue

damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* 22, 657-682.

Smyth, M.J., Swann, J., Kelly, J.M., Cretney, E., Yokoyama, W.M., Diefenbach, A., Sayers, T.J., and Hayakawa, Y. (2004). NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer. *J Exp Med* 200, 1325-1335.

Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., and Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86, 1065-1073.

Stagg, J., and Smyth, M.J. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29, 5346-5358.

Su, X., Ye, J., Hsueh, E.C., Zhang, Y., Hoft, D.F., and Peng, G. (2010). Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunol* 184, 1630-1641.

Su, Y., Huang, X., Raskovalova, T., Zacharia, L., Lokshin, A., Jackson, E., and Gorelik, E. (2008). Cooperation of adenosine and prostaglandin E2 (PGE2) in amplification of cAMP-PKA signaling and immunosuppression. *Cancer Immunol Immunother* 57, 1611-1623.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.H., Pages, F., *et al.* (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 71, 1263-1271.

Tsutsui, H., Nakanishi, K., Matsui, K., Higashino, K., Okamura, H., Miyazawa, Y., and Kaneda, K. (1996). IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J Immunol* 157, 3967-3973.

Vakkila, J., and Lotze, M.T. (2004). Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nature reviews Immunology* 4, 641-648.

von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6, 338-344.

Wang, D., and Dubois, R.N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 181-193.

Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D.M., Zeng, D., and Yu, H. (2009). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* 206, 1457-1464.

Wang, L., Zhou, X., Zhou, T., Ma, D., Chen, S., Zhi, X., Yin, L., Shao, Z., Ou, Z., and Zhou, P. (2008). Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 134, 365-372.

Wesa, A., Kalinski, P., Kirkwood, J.M., Tatsumi, T., and Storkus, W.J. (2007). Polarized type-1 dendritic cells (DC1) producing high levels of IL-12 family members rescue patient TH1-type ant melanoma CD4⁺ T cell responses in vitro. *J Immunother* 30, 75-82.

Whiteside, T.L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27, 5904-5912.

Wu, X., Peng, M., Huang, B., Zhang, H., Wang, H., Xue, Z., Zhang, L., Da, Y., Yang, D., Yao, Z., *et al.* (2013). Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer Lett* 340, 124-133.

Wu, X.R., He, X.S., Chen, Y.F., Yuan, R.X., Zeng, Y., Lian, L., Zou, Y.F., Lan, N., Wu, X.J., and Lan, P. (2012). High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. *J Surg Oncol* 106, 130-137.

Yegutkin, G.G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783, 673-694.

Zhang, B. (2012). CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncoimmunology* 1, 67-70.

Zhang, B., Wang, Z., Wu, L., Zhang, M., Li, W., Ding, J., Zhu, J., Wei, H., and Zhao, K. (2013). Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. *PLoS One* 8, e57114.

Zhu, X., Mulcahy, L.A., Mohammed, R.A., Lee, A.H., Franks, H.A., Kilpatrick, L., Yilmazer, A., Paish, E.C., Ellis, I.O., Patel, P.M., *et al.* (2008). IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 10, R95.