UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA CLÍNICA, CÉLULAS-TRONCO
E TERAPIA CELULAR

Progressão tumoral de melanoma B16 em camundongos
sobreviventes à sepse. Possível papel de macrófagos associados ao
tumor através da via CXCR4/CXCL12

JOSÉ MAURÍCIO SEGUNDO CORREIA MOTA

Ribeirão Preto

2015

JOSÉ MAURICIO SEGUNDO CORREIA MOTA

**Progressão tumoral de melanoma B16 em camundongos sobreviventes à
sepse. Possível papel de macrófagos associados ao tumor através da via
CXCR4/CXCL12**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Doutor em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular.

Área: Diferenciação celular e neoplásica.

Orientador: Eduardo Magalhães Rego

Co-orientador: Fernando de Queiroz Cunha

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Mota, José Mauricio.

PROGRESSÃO TUMORAL DE MELANOMA B16 EM CAMUNDONGOS SOBREVIVENTES À SEPSE. POSSÍVEL PAPEL DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR ATRAVÉS DA VIA CXCR4/CXCL12. Ribeirão Preto, 2015. 208 p; il ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP –

Área de concentração: Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular. Orientador: Rego, Eduardo Magalhães. Co-orientador: Cunha, Fernando de Queiroz.

1. Macrófagos associados ao tumor; 2. Microambiente tumoral; 3. Melanoma; 4. Sepsis; 5. Imunossupressão.

FOLHA DE APROVAÇÃO

José Maurício Segundo Correia Mota

Progressão tumoral de melanoma B16 em camundongos sobreviventes à sepse. Possível papel de macrófagos associados ao tumor através da via CXCR4/CXCL12.

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Medicina.

Programa: Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular

Área de Concentração: Diferenciação celular e neoplásica

Data da Aprovação: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Enilza Maria Spreafico

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Roger Chammas

Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Ana Paula Lepique

Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo

Trabalho realizado no Laboratório de Hematologia do Departamento de Clínica Médica e Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da FAPESP (Processo 2013/14228-3).

Dedicatória especial

“Cada um deixa a vida como se estivesse acabado de começá-la”

Epicuro

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque
Ribeiro (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu agradecimento por permitir o milagre da vida.

Ao Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego, por ter aceitado me orientar em uma nova linha de pesquisa, tendo-me provido de autonomia na medida certa e de meios adequados para desenvolver esse projeto. Agradeço por suas sábias intervenções no intercurso deste trabalho, e sobretudo por ter me dado a honra de sua convivência e amizade.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, por ter seguidamente aberto as portas do seu laboratório e de sua casa desde há muito tempo, e por ter contribuído para o surgimento em mim de fascinação pela Ciência e admiração pela Academia. Ter a sua amizade e aprender com seu exemplo é algo que me enaltece e prestigia.

Ao meu primeiro orientador, amigo e padasto, Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*), por seu exemplo de brilhantismo ético e profissional, por sua amizade incondicional, por todas as oportunidades que me deu e por ter influenciado decisivamente nas minhas escolhas. Você fará muita falta.

Ao Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho, por ter dado importantes contribuições ao longo desse trabalho, pelas conversas esclarecedoras e sobretudo por sua amizade.

Ao Prof. Dr. Florêncio Figueiredo, da Universidade de Brasília, por sua amizade sempre muito gentil e por ter se disposto a realizar as análises histológicas deste trabalho.

À minha mãe, Cynthia Loiola Ponte de Souza por ter me dado exemplos de perseverança e luta no sentido de alcançar seus objetivos.

Ao meu pai, José Maurício Correia Mota, por ter me fornecido elementos morais e exemplos externos à Medicina, os quais foram determinantes à minha formação.

À Marcela Vendrúscolo Ambiel, por me honrar com seu amor. À toda família Vendrúscolo, especialmente à Elizabeth Vendrúscolo por todo o apoio em Ribeirão Preto.

À minha família, pelo constante apoio em todas as fases da minha vida.

Ao Dr. Lucas Eduardo Botelho Souza, por ter realizado com precisão parte dos ensaios de bioluminescência e por sempre estar disposto a sanar qualquer possível dúvida metodológica.

Ao Dr. Caio Abner Vitorino Gonçalves Leite, por sua grande amizade e seu imprescindível auxílio em várias etapas desse trabalho.

À Dra. Priscila Sheucher, por sua disponibilidade e prontidão de passar incontáveis tubos para citometria de fluxo e para *sortings*, e sobretudo pela amizade e momentos prazerosos no Laboratório de Hematologia Experimental. Agradecimento extensivo ao Dr. Guilherme Santos, pela amizade e pelas muitas conversas que tivemos a respeito desse trabalho.

À Dra. Virgínia Mara de Deus Wagatsuma, por sua amizade, disponibilidade e por sua participação fundamental na realização de muitos ensaios presentes neste trabalho, principalmente no preparo do RNA e nas análises de *microarray*.

Aos pesquisadores do Laboratório de Bioinformática da FMRP-USP, em especial à Jéssica Temporal, Tarcísio Bertolio e ao Prof. Dr. Houtan Noushmer, por terem contribuído nas análises dos dados de *microarray* gerados neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Inflamação e Dor: Dra. Daniele Nascimento, Dr. Raphael Ferreira Gomes, Dr. Paulo Henrique Melo, Dra. Leticia Nascimento, Dr. Kalil, Dr. Jonilson Berlink, Dr. Jhimmy Talbot, Dr. Rafael França, pela amizade, inúmeras conversas sobre ciência, e ajuda indispensável em diversas fases da execução desse trabalho.

Ao amigo Dr. Vicente de Paulo Martins Coelho Júnior, pela convivência nesses últimos 14 anos, com quem aprendi exemplos de serenidade, honestidade, perseverança e inegável brilhantismo profissional.

À Giuliana Bertozi por seu bom humor, amizade e competência na dosagem de citocinas por ELISA.

Ao Sr. Tadeu Franco Vieira e a Sra. Eleni Luiza Tamburu Gomes pela disposição no preparo de lâminas para histopatologia;

À Ana Kátia dos Santos, Diva Amáble Montanha de Sousa, Sérgio Roberto Rosa, Ieda Regina dos Santos Schivo e Marco Antônio de Carvalho pela amizade e pelo auxílio técnico em diversas fases desse trabalho; à Amélia Góes de Araújo, por ter me ajudado com tanto empenho no preparo do material para o *microarray*;

À Eliana Beatriz Castrechini de Barros por seu cuidado com o manejo diário dos animais de experimentação.

À Dalva Tereza Catto, por sua amizade, diligência e por seu fundamental apoio em todas as fases da realização deste projeto.

À Sandra Navarro Bresciani, pela competência profissional na edição de imagens e impressão de pôsteres frutos deste trabalho.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia celular, Adriana Fuzaro e Raquel Botelho, por terem se prestado a fornecer informações e auxílio sempre presente.

Aos amigos da Unidade de Emergência, Prof. Dr. Antônio Pazin Filho, Prof. Dr. Marcos de Carvalho Borges, Abel de Barros Araújo Filho, Rômulo Rebouças Lobo, Valéria Okino, Gustavo Frezza, Leonardo Zancaner, Pedro Gonçalves, Edwards Silveira (*in memoriam*), Gustavo Volpe, Daniel Zoppi, Pedro Swartzmann, e a todos os residentes de Clínica Médica com quem diretamente convivi nos últimos anos, por sua amizade e por me servirem de exemplo de grandes médicos.

Aos animais de experimentação, que honrosamente morreram no decorrer deste projeto, permitindo que realizássemos pequenas descobertas, na esperança de contribuir futuramente para o tratamento dos vitimados pelo câncer.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

“(…) O verdadeiro homem de ciência aposta sempre em todos os cavalos e aplaude incondicionalmente o vencedor, qualquer que seja. A isenção não é desinteresse, distanciamento frio: é paixão pela verdade desconhecida, é amor à ideia mesma da verdade, sem pressupor qual seja o conteúdo dela em cada caso particular.”

Olavo de Carvalho

“A pesquisa básica é realizada sem fins práticos em vista. Ela resulta no conhecimento geral, na compreensão da natureza e de suas leis. Esse conhecimento geral nos fornece os meios para responder a um grande número de importantes problemas práticos, muito embora talvez não nos dê uma resposta específica completa para nenhum deles.(…) A pesquisa básica leva ao conhecimento. Ela fornece capital científico.”

Vanevar Bush

RESUMO

Introdução: Indivíduos sobreviventes à sepse apresentam maior mortalidade à longo prazo e maior risco de apresentar infecções oportunistas. Existem evidências clínicas e experimentais de desregulação imune no estado pós-sepse. Essas alterações apresentam semelhança com aquelas encontradas no microambiente tumoral, estando relacionadas à imunossupressão. O presente trabalho avaliou o papel de macrófagos associados ao tumor (TAM) em modelo de progressão tumoral em camundongos sobreviventes à sepse. **Materiais e Métodos:** Camundongos C57/BL6 foram submetidos a ligadura e punção cecal (CLP) e tratados com ertapenem (20 mg/kg, i.p., 6 horas após CLP e 12/12 h por 3 dias). Os animais sobreviventes de sepse eram inoculados com células de melanoma B16-F10 (30 mil, s.c., 15 dias após a CLP). Animais naïve foram usados como controle. Foram avaliadas a progressão tumoral, sobrevida e formação de metástases espontâneas à distância. No D+14, animais foram sacrificados para mensuração do acúmulo de TAM por citometria de fluxo ($CD45^{+}F4/80^{+}CD206^{+}$) e de citocinas no soro e no tumor por ELISA (IFN- γ , IL-10, TNF- α , TGF- β , CCL2, CXCL12). Macrófagos derivados de medula óssea de animais pós-CLP ou naïve foram coinoculados com células B16 para avaliação de progressão tumoral e sobrevida. TAM de animais naïve ou pós-CLP foram isolados através de gradiente de Percoll seguido de adesão seletiva e o RNA foi isolado para análise diferencial de expressão gênica por *microarray*. Para avaliação da participação da via CXCL12/CXCR4 foi realizada sua inibição com o AMD3100, antagonista de CXCR4 (5 mg/kg, i.p., D+10 e D+14). Foi avaliada a progressão tumoral, sobrevida, acúmulo de TAM e proliferação extramedular de TAM no D+14. **Resultados:** Animais sobreviventes de sepse apresentaram aumento de progressão tumoral (após 15, 30 e 60 dias da CLP), aumento da carga de metástases (após 15 dias da CLP) e redução de sobrevida. Foi detectado o aumento de TAM nos animais pós-CLP, associado a maior marcação de Ki67, em comparação com animais naïve no D+14. Verificamos aumento das concentrações séricas de TGF- β , CXCL12, CCL2 e TNF- α . Camundongos naïve que coinoculados com macrófagos derivados de medula óssea de animais pós-CLP apresentaram aumento de progressão tumoral e redução de sobrevida em comparação com o grupo controle. TAM de animais pós-CLP apresentaram menor expressão de genes relacionados ao MHC-II e genes relacionados à ativação leucocitária. A inibição de CXCL12/CXCR4 preveniu a progressão tumoral induzida por sepse, com menor acúmulo de TAM e menor presença de TAM Ki67⁺. **Conclusões:** O estado pós-sepse promove a progressão tumoral de melanoma B16 em camundongos, o qual foi associado a aumento de

TAM. A via CXCL12/CXCR4 participa do processo de acúmulo de TAM nesse modelo experimental.

ABSTRACT

Background: Survivors from sepsis present higher long-term mortality and increased risk of opportunistic infections. There is clinical and experimental evidence for an immunosuppressive immune dysregulation in post-sepsis. These alterations are similar to those found in tumor microenvironment. The present work assessed the role of tumor-associated macrophage (TAM) in a model of tumor progression in sepsis-surviving mice.

Materials and Methods: C57/BL6 mice were submitted to cecal ligation and puncture (CLP) and treated with ertapenem (20 mg/kg, ip. - 6 h after CLP and then each 12 h for 3 days). Sepsis surviving mice were inoculated with B16-F10 melanoma cells (30,000, sc., 15 days after CLP). Naïve mice were used as controls. Tumor progression, survival and distant spontaneous metastasis were evaluated. Mice were killed at D+14 for TAM measurement through flow cytometry ($CD45^{+}F4/80^{+}CD206^{+}$) and for cytokines (IFN- γ , IL-10, TNF- α , TGF- β , CCL2, CXCL12) quantification by ELISA. Bone marrow-derived macrophage (BMDM) were isolated and co-inoculated together with B16 melanoma cells for tumor progression and survival evaluation. TAM from naïve or post-sepsis mice were isolated through Percoll gradient (70/30) followed by selective adhesion. The RNA was isolated for gene expression analysis using microarray assay. To evaluate the role of CXCL12/CXCR4, we used the specific antagonist AMD3100 (5 mg/kg, ip., at D+10 and D+14) and assessed tumor progression, survival and TAM accumulation at D+14.

Results: Sepsis-surviving mice showed increased tumor progression (15, 30 or 60 days after CLP), higher metastatic burden (15 days after CLP), and less overall survival. TAM were increased in post-sepsis mice at D+14. We found increased serum levels of TGF- β , CXCL12, CCL2 e TNF- α . Naïve mice inoculated with BMDM from post-sepsis and B16 cells showed higher tumoral progression and less survival, when compared to the control group. TAM from post-sepsis showed decreased expression of MHC-II related genes and genes related to leukocyte activation. The inhibition of CXCL12/CXCR4 prevented the post-sepsis-induced tumor progression, with less TAM accumulation and reduced expression of Ki67 in TAM.

Conclusions: The post-sepsis state promotes the progression of B16 melanoma in mice, which was associated with an increase in TAM accumulation. CXCL12/CXCR4 mediates TAM accumulation in this experimental model.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise da Pega Tumoral no D+42	90
Tabela 2 - Análise de alterações histológicas em lâminas de melanoma B16 no D+14 (inóculo tumoral de 30 mil células).....	92
Tabela 3 – Análise da presença de metástases microscópicas por animal no D+21 (inóculo tumoral de 30 mil células).....	93
Tabela 4 - Comparação entre expressão gênica de TAM pós-sepse com TAM naïve - genes relacionados à ativação de leucócitos.....	107
Tabela 5 - Comparação entre expressão gênica de TAM pós-sepse com TAM naïve - genes relacionados ao complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC-II)	108
Tabela 6 - Comparação entre expressão gênica de TAM pós-sepse com TAM naïve - genes relacionados à polarização ou função macrofágica.....	111
Tabela 7 - Comparação entre expressão gênica de TAM pós-sepse com TAM naïve - genes relacionados à via de sinalização Wnt.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo das funções de TAM no microambiente tumoral e possibilidades terapêuticas.	36
Figura 2 - Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular ativadas pelo eixo CXCL12/CXCR4.	40
Figura 3 - Paralelos entre câncer e infecção sistêmica.	44
Figura 4 - Demonstração do procedimento de ligadura e punção cecal (CLP).	57
Figura 5 - Inoculação de B16 após 15 dias de CLP.	60
Figura 6 - Inoculação de B16 após 30 dias de CLP.	61
Figura 7 - Coleta de amostras para anatomopatológico de animais pós-sépticos inoculados com B16.	63
Figura 8 - Ensaio de mortalidade por metástases espontâneas.	65
Figura 9 - Experimentos para coleta de material para citometria de fluxo para avaliação de TAM e Tregs.	66
Figura 10 - Coinoculação de macrófagos derivados de animais sobreviventes à sepse ou naïve com melanoma B16 em animais naïve.	72
Figura 11 - Isolamento de macrófagos por gradiente de Percoll 70/30 seguido de adesão em placa por 1 hora.	74
Figura 12 - Inibição do eixo CXCR4/CXCL12 por AMD3100.	80
Figura 13 - Avaliação de alterações em TAM e Tregs após inibição de CXCR4/CXCL12 por através de AMD3100.	81
Figura 14 - Padronização do Modelo de sepse por CLP.	84
Figura 15 - Padronização do Modelo de Pós-sepse.	85

Figura 16 - Aumento da progressão tumoral pós-sepse com inóculo tumoral de 100 mil células.....	86
Figura 17 - Aumento da progressão tumoral pós-sepse com inóculo tumoral de 30 mil células.	87
Figura 18 - Aumento da progressão tumoral pós-sepse com inóculo tumoral de 10 mil células.	88
Figura 19 - Redução de sobrevida em animais pós-sépticos inoculados com melanoma B16.	89
Figura 20 - Aumento de progressão tumoral e redução de sobrevida em animais inoculados com células B16 30 e 60 dias após sepse.	91
Figura 21 - Cortes histológicos de tumor primário no D+21.	92
Figura 22 - Aumento da quantidade de lesões metastáticas espontâneas pulmonares em animais previamente submetidos a CLP.	94
Figura 23 - Aumento de mortalidade por metástases espontâneas em animais pós-CLP.	95
Figura 24 - Aumento da carga tumoral nos pulmões de animais pós-CLP em ensaio de colonização pulmonar.	96
Figura 25 - Acúmulo de leucócitos totais (células CD45 ⁺) no microambiente tumoral de animais pós-sepse no D+14.	97
Figura 26 - Aumento de Tregs no baço de animais previamente submetidos a CLP inoculados com B16.	98
Figura 27 - Aumento de Tregs nos linfonodos inguinais ipsilaterais (LNI) ao tumor em animais pós-CLP inoculados com B16.	99
Figura 28 - Análise da infiltração por Tregs no microambiente tumoral de animais pós-CLP inoculados com B16.	100
Figura 29 - Acúmulo de TAM no microambiente tumoral no D+14 em animais pós-sépticos.	101
Figura 30 - Acúmulo de TAM no microambiente tumoral no D+21 em animais pós-sépticos.	102

Figura 31 - Acúmulo de TAM no microambiente tumoral no D+14 em animais pós-sépticos, <i>gate</i> CD45 ⁺	103
Figura 32 - Imunofluorescência para TAM mostrando aumento de infiltração nos tumores de animais sobreviventes à sepse.	104
Figura 33 - Comparação da análise de expressão gênica global entre M0 naïve, M0 pós-sepse, M1, M2, TAM naïve e TAM pós-sepse através de <i>Principal Component Analysis</i> (PCA).	105
Figura 34 - <i>Volcano Plot</i> com genes diferencialmente expressos na comparação entre TAM de animais pós-sepse e TAM de animais naïve.	106
Figura 35 - <i>Heat map</i> de todos os grupos analisados (TAM naïve, TAM pós-sepse, M0 naïve, M0 pós-sepse, M1 e M2) com genes relacionados à ativação leucocitária, citocinas e angiogênese.	109
Figura 36 - <i>Heat map</i> dos grupos TAM naïve e TAM Pós-sepse com genes relacionados à ativação leucocitária, citocinas e angiogênese.	110
Figura 37 - <i>Heat map</i> de todos os grupos analisados (TAM naïve, TAM pós-sepse, M0 naïve, M0 pós-sepse, M1 e M2) com genes relacionados à polarização macrofágica.	112
Figura 38 - <i>Heat map</i> dos grupos TAM naïve e TAM Pós-sepse com genes relacionados à ativação leucocitária, citocinas e angiogênese.	113
Figura 39 - Hiperexpressão em TAM Pós-sepse de genes relacionados à via Wnt não-canônica de polarização celular num plano.....	114
Figura 40 - Padrão de citocinas/quimiocinas no soro de animais pós-CLP portadores de tumor.	116
Figura 41 - Padrão de citocinas/quimiocinas no sobrenadante de linfonodo estimulado de animais pós-CLP portadores de tumor.	117
Figura 42 - Padrão de citocinas/quimiocinas em tumores de animais naïve e sobreviventes à sepse.	118
Figura 43 - Morfologia e fenotipagem de macrófagos derivados de medula óssea de animais naïve e CLP15d.	119

Figura 44 - Coinoculação de melanoma B16 com macrófagos derivados de medula óssea de animais pós-CLP acarretou aumento de progressão tumoral.	120
Figura 45 - Coinoculação de melanoma B16 com macrófagos derivados de medula óssea de animais pós-CLP acarretou redução de sobrevida.	121
Figura 46 - Meio condicionado de macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) não alterou o tempo de duplicação celular de células B16.	122
Figura 47 - Meio condicionado de macrófagos derivados de medula óssea de animais pós-CLP não altera migração de células B16.	123
Figura 48 - Inibição da via CXCR4/CXCL12 através do inibidor AMD3100 acarretou reversão do fenótipo de aumento de progressão tumoral em animais sobreviventes à sepse.	124
Figura 49 - Inibição de CXCR4/CXCL12 preveniu o aumento de leucócitos totais induzido pelo estado pós-sepse.	125
Figura 50 - AMD3100 preveniu acúmulo de TAM induzido pelo estado pós-sepse.	126
Figura 51 - Não houve diferença na expressão de CXCR4 nos TAM de animais naïve e pós-CLP.	127
Figura 52 - Inibição de CXCL12/CXCR4 preveniu o aumento de proliferação extramedular de TAM induzida pelo estado pós-sepse.	128
Figura 53 - Análise da proliferação extramedular de TAM analisada na <i>gate</i> CD45 ⁺ também evidenciou que o tratamento com AMD3100 preveniu o aumento induzido pelo estado pós-sepse.	129
Figura 54 - Não houve diferença de expressão do marcador de proliferação celular entre os grupos analisados.	130
Figura 55 - Inibição de CXCR4 não provocou redução de Tregs no baço.	131
Figura 56 - Redução de Tregs nos linfonodos de drenagem após inibição de CXCR4.	132
Figura 57 - O aumento da progressão tumoral em camundongos sobreviventes à sepse está associado a aumento da população de TAM e é dependente da via CXCL12/CXCR4.	144

LISTA DE ABREVIATURAS

μL - microlitro

μg - micrograma

B7-H1 - B7 homólogo 1

bFGF - fator de crescimento básico de fibroblastos

CCL - ligante quimiocina com motivo C-C

cm - centímetro

CSF-1 - fator estimulador de colônia de macrófagos 1

CSF1R - receptor do fator estimulador de colônia 1 1

CTLA4 - receptor proteína 4 associada a linfócito T citotóxico

CXCL - ligante quimiocina com motivo CXC

EGF - fator de crescimento epidérmico

Foxp3 - fator de transcrição supressor *foxhead box* 3

GITR - *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene*

IL - interleucina

IFN-γ - interferon γ

MAPK - proteína cinase ativada por mitógenos

MCP-1 - proteína quimiotática de monócitos 1

MDSC - célula supressora de origem mielóide

MIF - fator inibidor de migração macrofágica

mm - milímetro

MMP - metaloproteinase

NF- κ B - fator nuclear κ B

NK - célula *natural killer*

nTregs - Treg de ocorrência natural

PD1 - receptor de morte celular programada

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas

PDL1 - ligante do receptor de morte celular programada 1

PI3K - fosfatidilinositol-3-cinase

RR - risco relativo

SDF-1 - fator derivado de estroma

TAM - macrófago associado ao tumor

TCR - receptor de células T

TGF- β - fator de crescimento de transformação β

TNF- α - fator de necrose tumoral α

TRAIL - receptores sinalizadores de morte celular ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

Treg - linfócitos T reguladores

VEGF - fator de crescimento de endotélio vascular

VHL - produto do gene supressor tumoral von-Hippel Lindau

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. Melanoma.....	27
1.1.1. Epidemiologia e relevância	27
1.1.2. Câncer, inflamação e microambiente tumoral	27
1.1.3. Macrófagos associados ao tumor	31
1.1.4. Macrófagos associados ao tumor como potenciais alvos no tratamento do câncer ...	35
1.1.5. Papel da via CXCR4/CXCL12 no câncer	36
1.2. SEPSE E PÓS-SEPSE.....	41
1.3. ASSOCIAÇÕES ENTRE CÂNCER, SEPSE E PÓS-SEPSE	43
2. HIPÓTESE	46
3. OBJETIVOS.....	48
3.1. OBJETIVO GERAL	48
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1. ANIMAIS.....	50
4.2. PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES	50
4.2.1. Meio RPMI incompleto	50
4.2.2. Meio RPMI completo.....	50
4.2.3. Tampão salina-fosfato (PBS) 10 X (para estoque)	51
4.2.4. PBS 1 X (para uso).....	51
4.2.5. Tampão 1 de MPO	51
4.2.6. Tampão 2 de MPO	52
4.2.7. Tampão de citometria de fluxo	52
4.2.8. PBS/EDTA (1mM)	52
4.2.9. Tampão de lise celular	52
4.2.10. Formaldeído 1%.....	53
4.2.11. Formaldeído 10%.....	53
4.2.12. Etanol 70%.....	53
4.2.13. Solução de congelamento	53
4.2.14. Solução de Ketamina e Xilazina	53
4.2.15. Paraformaldeído 4%.....	54
4.2.16. Glicina 0,1 M	54

4.2.17.	BSA 2%	54
4.2.18.	Meio L929.....	54
4.2.19.	Solução de digestão.....	55
4.2.20.	Hank's Balanced Salt Solution (HBBS) 10X	55
4.2.21.	HBBS 1X	55
4.2.22.	Percoll (solução mãe).....	56
4.2.23.	Percoll 70%.....	56
4.2.24.	Percoll 30%.....	56
4.3.	LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR	56
4.4.	MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE POLIMICROBIANA	57
4.4.1.	Modelo de Ligadura e Punção Cecal	57
4.4.2.	Contagem de polimorfonucleares no lavado peritoneal.....	58
4.4.3.	Dosagem de Mieloperoxidase (MPO) no pulmão.....	58
4.4.4.	Contagem de bactérias no lavado peritoneal e sangue.....	59
4.5.	MODELO EXPERIMENTAL DE sobreviventes à sepse	59
4.5.1.	Sobrevida após infecção por <i>Legionella pneumophila</i>	59
4.6.	AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO TUMORAL DE MELANOMA B16-F10 EM ANIMAIS PÓS-SÉPTICOS.....	60
4.6.1.	Inoculação de animais.....	61
4.6.2.	Mensuração do volume tumoral por paquímetro	61
4.6.3.	Mensuração da carga tumoral Bioluminescência.....	62
4.6.4.	Sobrevida.....	63
4.6.5.	Histopatologia	63
4.7.	AVALIAÇÃO DE METÁSTASES ESPONTÂNEAS E COLONIZAÇÃO PULMONAR EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE	64
4.7.1.	Avaliação de Metástases espontâneas no D+21	64
4.7.2.	Ensaio de colonização pulmonar.....	64
4.7.3.	Ensaio de mortalidade por metástases espontâneas precoces	65
4.8.	CITOMETRIA DE FLUXO	65
4.8.1.	Preparo da Suspensão Celular Simples.....	66
4.8.2.	Quantificação de TAM por Citometria de Fluxo	67
4.8.3.	Determinação da expressão de CXCR4 em TAM	68
4.8.4.	Quantificação de proliferação extramedular de TAM	68
4.8.5.	Quantificação de Tregs por Citometria de Fluxo.....	68

4.8.6. Análise.....	69
4.9. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA	69
4.10. IMUNOFLUORESCÊNCIA	70
4.11. EFEITO DA COINOCULAÇÃO DE B16 COM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS PÓS-SEPSE NA PROGRESSÃO TUMORAL.....	71
4.11.1. Extração de Medula Óssea e Diferenciação de Macrófagos.....	72
4.11.2. Coinoculação.....	73
4.11.3. Mensuração da progressão tumoral	73
4.12. ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MACRÓFAGOS ASSOCIAOS AO TUMOR E MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS PÓS-SEPSE E NAÏVE.....	73
4.12.1. Isolamento de macrófagos associados ao tumor.....	74
4.12.2. Isolamento de macrófagos derivados de medula óssea e polarização para M1 ou M2	75
4.12.3. Extração de RNA	75
4.12.4. Confecção do cDNA, cRNA, marcação com Cy3, hibridização e preparo das lâminas de <i>microarray</i>	76
4.12.5. Análise da expressão gênica por <i>microarray</i>	78
4.13. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	79
4.13.1. Proliferação celular	79
4.13.2. Ensaio de cicatrização.....	79
4.14. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA CXCR4/CXCL12 NA PROGRESSÃO TUMORAL EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE	80
4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA	81
5. RESULTADOS	84
5.1. MODELO DE SEPSE E MODELO DE PÓS-SEPSE.....	84
5.2. CAMUDONGOS SOBREVIVENTES À SEPSE APRESENTARAM MAIOR PROGRESSÃO TUMORAL EM COMPARAÇÃO AOS NAÏVE	85
5.3. AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS TUMORAIS (NECROSE E HEMORRAGIA)	92
5.4. O ESTADO PÓS-SEPSE RESULTARAM EM MAIOR CARGA TUMORAL DE METÁSTASES	93
5.5. TUMORES DE ANIMAIS PÓS-SEPSE APRESENTARAM MAIOR INFILTRAÇÃO por LEUCÓCITOS TOTAIS	96

5.6. AUMENTO DE CÉLULAS T REGULADORAS NO BAÇO E LINFONODO, MAS NÃO NO MICROAMBIENTE TUMORAL DE ANIMAIS PÓS-SEPSE PORTADORES DE TUMOR.....	97
5.7. ACÚMULO PRECOCE DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR NO MICROAMBIENTE TUMORAL DE ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE	100
5.8. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR.....	105
5.9. ALTERAÇÃO DO PADRÃO DE LIBERAÇÃO DE CITOCINAS EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE INOCULADOS COM MELANOMA B16.....	114
5.10. COINOCULAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS COM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS PÓS-SEPSE ACARRETOU AUMENTO DE PROGRESSÃO TUMORAL.....	119
5.11. MEIO CONDICIONADO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS PÓS-SÉPTICOS NÃO ALTERA A PROLIFERAÇÃO NEM A MIGRAÇÃO CELULAR <i>IN VITRO</i>	121
5.11.1. Proliferação Celular	121
5.11.2. Ensaio de cicatrização (<i>Scratch assay</i>)	122
5.12. INIBIÇÃO DE CXCR4 ACARRETA REDUÇÃO DA PROGRESSÃO TUMORAL EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE.....	123
5.13. INIBIÇÃO DE CXCR4 PREVENIU AUMENTO DO ACÚMULO DE LEUCÓCITOS TOTAIS E DE TAM NO MICROAMBIENTE TUMORAL DE ANIMAIS PÓS-SEPSE.....	125
5.14. INIBIÇÃO DE CXCR4/CXCL12 PREVENIU O ACÚMULO DE TAM EM ANIMAIS PÓS-SEPSE POR REDUZIR A PROLIFERAÇÃO EXTRAMEDULAR DE TAM.....	127
5.15. INIBIÇÃO DE CXCR4 PROMOVE REDUÇÃO DE TREGS NO LINFONODO DE DRENAGEM, MAS NÃO NO BAÇO, EM ANIMAIS SOBREVIVENTES DE SEPSE PORTADORES DE TUMOR.....	130
6. DISCUSSÃO.....	134
7. CONCLUSÕES.....	146
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148
9. APÊNDICES	161
9.1. TABELA DE QUALIDADE DOS RNA ISOLADOS E RNA ESCOLHIDOS	161

9.2. TABELA DE POSICIONAMENTO DOS RNA SELECIONADOS NAS LÂMINAS PARA ANÁLISE DE <i>MICROARRAY</i>	163
9.3. TABELA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA ANÁLISE DE <i>MICROARRAY</i> (GRUPO TAM PÓS-SEPSE <i>VERSUS</i> TAM NAÏVE)	164
10. ANEXOS.....	172
10.1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL...	172
11. MANUSCRITO.....	174

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. MELANOMA

1.1.1. Epidemiologia e relevância

O melanoma maligno ocupa a quinta posição entre as neoplasias mais frequentes (4,6%), tendo incidência de 21,3 novos casos por 100 mil habitantes por ano, com taxa de mortalidade global de 2,7 por 100 mil habitantes (91,3% sobrevivem em 5 anos). Entretanto, quando analisada a mortalidade por estágio da doença, constata-se que sobrevivem ao menos cinco anos apenas 62,6% dos pacientes com melanoma localmente avançado e 16,1% daqueles com melanoma metastático. Por outro lado, estima-se que 2,1% das pessoas desenvolvam melanoma em algum momento de suas vidas. A incidência de melanoma em 1975 era de apenas 7,9 casos por 100 mil habitantes por ano, mostrando que vem ocorrendo um expressivo aumento de novos casos ao longo dos anos. Enquanto isso, a taxa de mortalidade permanece a mesma, traduzindo um aumento do número total de óbitos pela doença (HOWLADER et al., 2013).

No Brasil, a incidência de câncer em homens é de 309,53 e em mulheres é de 269,35 casos por 100 mil habitantes por ano. A incidência de melanoma em homens é de 3,03 e em mulheres é de 2,85, com taxa de mortalidade de 0,13 óbitos por 100 mil habitantes por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2013, 2014). Apesar de ser a quinta causa de câncer nos Estados Unidos, no Brasil esse tipo de neoplasia não aparece entre as dez causas mais frequentes de câncer.

Tendo em vista as altas incidência e mortalidade, trata-se de uma condição de grande relevância médica. Entendemos que a compreensão dos mecanismos e mediadores envolvidos em sua gênese e progressão pode auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

1.1.2. Câncer, inflamação e microambiente tumoral

A relação entre inflamação e câncer é conhecida há longa data, tendo sido o médico alemão Virchow o primeiro a descrever a presença de células inflamatórias no interior de neoplasias, ainda em meados do século XIX. Inicialmente, aventou-se que a presença

dessas células era um marcador da ocorrência de câncer em sítios de inflamação crônica (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). De fato, fração significativa das neoplasias malignas encontra na inflamação crônica o seu fator etiológico fundamental. Como exemplo, podem ser citados adenocarcinoma de cólon, hepatocarcinoma, adenocarcinoma de estômago, adenocarcinoma de pâncreas, câncer de ovário, câncer de pulmão, carcinoma espinocelular de cavidade oral, entre outros (ELINAV et al., 2013).

O mecanismo através do qual a inflamação promove a iniciação de câncer é variado e complexo. Espécies reativas de oxigênio, assim como demais radicais livres, podem acarretar mutações e instabilidade genômica, favorecendo a formação de câncer. Além disso, há descrição de diversas citocinas inflamatórias gerando regulações epigenéticas no sentido de aumentar a proliferação celular (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Por outro lado, é sabido que tumores em estágios iniciais adquirem a capacidade de recrutar células inflamatórias, cooptando-as e pervertendo-as no sentido de auxiliar a progressão tumoral (COUSSENS; WERB, 2010), funcionando claramente como mecanismo em alça promotora.

Independentemente da causa, o câncer tem como via final comum a alteração na sequência ou estrutura do DNA, ou alterações na transcrição gênica ou tradução proteica em determinado tipo celular, levando ao acúmulo de características que *per se* definem a célula tumoral. A histórica revisão de Hanahan e Weinberg, inicialmente publicada em 2000 e revisada em 2011, enfatizou algumas propriedades como essenciais do câncer. O crescimento autônomo, independente de sinais de crescimento, a perda de sensibilidade aos fatores anti-crescimento, o escape à apoptose, o potencial replicativo ilimitado, a capacidade de induzir angiogênese e a invasão tecidual e metastização foram elevados à categoria de marcos do processo de carcinogênese. Naquela ocasião em 2010, os autores já levantaram diversas evidências de que algumas dessas características seriam mediadas pelos componentes presentes no microambiente tumoral (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011, 2000).

O microambiente tumoral é o conjunto celular e acelular fundamentalmente não constituído de células de origem neoplásica. Compõe-se, assim, de células não-inflamatórias (pericitos, endotélio e fibroblastos), células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, mastócitos, progenitores mielóides, células supressoras de origem mielóide e células dendríticas) e matriz extracelular (CAVALLO et al., 2011; PIETRAS; OSTMAN, 2010).

O componente inflamatório do microambiente tumoral é capaz de induzir vários processos relacionados à progressão do câncer (COUSSENS; WERB, 2010). Os processos de

mediação podem dar-se por via direta ou indireta, através da produção de quimiocinas, citocinas ou outras substâncias. Por exemplo, a citocina pró-inflamatória fator inibitório de migração macrofágica (MIF) inibe a atividade de p53 das células neoplásicas, ampliando assim sua resistência à morte celular (HUDSON et al., 1999). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), outra importante citocina inflamatória relacionada ao processo de cicatrização, foi descrita como capaz de induzir fenótipo neoplásico em queratinócitos (SKOBE; FUSENIG, 1998). De fato, é feliz a comparação feita por Dvorak de que tumores são “feridas que não cicatrizam”, haja vista a constante atuação do microambiente tumoral inflamatório liberando mediadores para fomentar a progressão tumoral (DVORAK, 1986 *apud* RISS et al., 2006; SCHÄFER; WERNER, 2008).

O processo de neoangiogênese, crucial para a continuidade da progressão tumoral, também é intimamente relacionado com o microambiente inflamatório. A formação de novos vasos é importante para o suporte nutricional ao tumor em fase de expansão, assim como para a retirada de metabólitos tóxicos, o aumento do potencial invasivo e de metastização (JOYCE; POLLARD, 2009). Células de origem mielóide - macrófagos (LIN et al., 2006), neutrófilos (NOZAWA; CHIU; HANAHAN, 2006) e mastócitos (COUSSENS et al., 1999) - produzem mediadores, tais como o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e metaloproteinases, que induzem neoangiogênese. O *crosstalk* entre células tumorais e o microambiente tumoral é também importante nesse sentido. Cho e colaboradores (2012) mostraram experimentalmente a interação existente entre células de linhagem 4T1 de câncer de mama com macrófagos ativados por via alternativa na indução de mecanismos relacionados à angiogênese e linfangiogênese, culminando no aumento de progressão tumoral (CHO et al., 2012). Além disso, é evidente a participação do microambiente tumoral em mecanismos de resistência a drogas (DITTMER; LEYH, 2014).

Se a inflamação local é componente essencial para o estabelecimento de muitas variedades de câncer, por outro lado os mecanismos anti-inflamatórios também tem sua importância. A resposta Th1 específica contra o tumor pode levar à morte celular e inibição da progressão tumoral. Linfócitos CD4⁺ Th1, através da produção de interferon- γ (IFN- γ), estimulam a ativação macrofágica no sentido M1. Macrófagos ativados M1, além de sua capacidade de eliminar diretamente células tumorais, produzem mediadores como a interleucina (IL)-1 β e a IL-6, que aumentam a atividade de células T efectoras, e CXCL9 e CXCL10, que reduzem a angiogênese. Agentes pró-inflamatórios como IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6 podem influenciar negativamente a progressão tumoral, através de ação direta nas

células do câncer (HAABETH; BOGEN; CORTHAY, 2012). A primeira tentativa de a imunoterapia foi a administração das chamadas “toxinas de Coley” com o objetivo de ativar imunidade antitumoral específica (MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011; NAUTS; SWIFT; COLEY, 1946). O emprego de TNF- α em tumores sólidos (por exemplo, no tratamento do melanoma) ancora-se na ativação de linfócitos T efetores, apesar de apresentar fraca citotoxicidade direta (BALKWILL, 2009). Da mesma forma, a ativação macrofágica através do emprego de agonista do coreceptor de estímulo CD40 mostrou eficácia no câncer de pâncreas experimental (BEATTY et al., 2011). A estratégia mais bem sucedida na imunoterapia clínica foi a inibição de receptores coinibitórios causando a estimulação de linfócitos T efetores. Podemos citar como exemplo, o ipilimumabe, anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 (HODI et al., 2010); e o nivolumabe, anticorpo monoclonal anti-PD1. Ambos são tratamentos promissores contra o melanoma metastático (WOLCHOK et al., 2013) e o câncer de pulmão de células não pequenas (LANGER, 2014).

Sendo assim, depreende-se que para a iniciação e progressão tumoral importa mais o tipo do que apenas a presença de inflamação. A iniciação de muitos tumores é relacionada a inflamação do tipo citotóxica, ou seja, padrão Th1/M1. Já a progressão, é dependente da formação do complexo microambiente inflamatório, em que as vias de ativação alternativas, ou seja, relacionadas a supressão imune e reparo, levam ao aumento de progressão tumoral (COUSSENS; WERB, 2010).

Determinados subtipos celulares estão bem associados ao aumento da progressão tumoral. Linfócitos T reguladores (Tregs), por exemplo, inibem a atividade e induzem a apoptose de linfócitos T efetores mediada pelo contato célula-célula, além de produzir citocinas supressoras como fator β de crescimento de transformação (TGF- β) (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; GALLIMORE; SIMON, 2008), produzindo assim a imunotolerância ao câncer. Ainda, o aumento de Tregs está associado a pior prognóstico de câncer de variadas origens (CURIEL, 2008). Outro tipo celular de importância crescente é a célula supressora de origem mielóide (MDSC), haja vista acarretar redução da ativação de células T efectoras e células *natural killer* (NK), além de induzir aumento de Tregs e de TGF- β (BIERIE; MOSES, 2010; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; MELLMAN; COUKOS; DRANOFF, 2011).

Nesse contexto, a ativação do microambiente inflamatório no sentido Th2 tem relevância para o escape imune e progressão tumoral (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN,

2010). O aumento da presença Th2 está claramente associado a pior prognóstico e redução de sobrevida de câncer de pâncreas (DE MONTE et al., 2011). Também, o aumento da relação Th2/Th1 em linfonodos de drenagem está associado ao pior prognóstico de pacientes com câncer de mama (KOHRT et al., 2005). Células Th2, através de mediadores como IL-10, IL-4 e IL-13 são capazes de ativar macrófagos em um sentido alternativo, conhecido como M2 (SICA et al., 2008). A maioria dos macrófagos associados ao tumor (TAM) apresentam polarização no sentido M2 (SICA et al., 2008), ou seja, apresentam alta produção de citocinas tipo 2 (ou anti-inflamatórias, como IL-10), tendo baixa expressão na membrana celular de complexo principal de histocompatibilidade (MHC)-II, alta expressão de arginase, do receptor de manose (CD206 ou MR) e do CD163 (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013). É sabido, porém, que a ação de macrófagos polarizados no sentido M2 é dupla, haja vista ter efeito supressor na iniciação do adenocarcinoma de cólon (BERG et al., 1996).

1.1.3. Macrófagos associados ao tumor

Os macrófagos associados ao tumor (TAM) são elementos do microambiente com função regulatória chave na progressão tumoral. Agem como estimuladores da progressão, invasividade, do remodelamento de tecidos circunvizinhos, da neoangiogênese e metástase (SOLINAS et al., 2009). A maior infiltração dos tumores por TAM está associada a mau prognóstico em grande parte das neoplasias. A revisão sistemática da correlação entre a infiltração por TAM e o prognóstico em pacientes com câncer, estimou o risco relativo (RR) em 1,15 com intervalo de confiança de 95% (IC95%) entre 1,05 e 1,25. As análises de subgrupo mostraram aumento do RR ainda mais relevante em tumores de origem urogenital - RR = 1,95 (IC95%: 1,32-2,86) e de cabeça e pescoço - RR = 2,09 (IC95%: 1,53-2,87). Entretanto, não se mostrou aumento significativo do RR em câncer de cólon e de pulmão (ZHANG et al., 2012). Críticas relevantes a esta metanálise foram a não padronização entre os diversos estudos do que foi considerada alta ou baixa infiltração, além da não avaliação da polarização dos macrófagos. Adicionalmente, também no melanoma, a maior presença de TAM está associada a pior prognóstico. A alta presença de células CD68⁺ em melanomas foi associada ao aumento de mortalidade com RR de 2,8 (IC95%: 1,2-6,8), independente de outros fatores de mau prognóstico, como índice de Breslow ou ulceração (JENSEN et al., 2009).

É descrito que os TAM originam-se de monócitos da circulação recrutados através de fatores quimiotáticos produzidos pelo tumor ou derivados da matriz extracelular. A quimiocina CCL2, anteriormente denominada proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1 está envolvida no recrutamento de monócitos para o microambiente tumoral (LOBERG et al., 2007; SOLINAS et al., 2009). Aparentemente, não exerce papel em diferenciar, polarizar ou modificar a função de macrófagos (BRAULT; KURT, 2005). Uma vez presentes no microambiente tumoral, os monócitos passam por processo de diferenciação para macrófagos e polarização em direção M2. Isso ocorre em função da relativa ausência de fatores que orientam para o fenótipo M1, tal como IFN- γ , associado à presença em grande quantidade de IL-4 e IL-13 secretadas por linfócitos Th2; e TGF- β e IL-10 produzidos por linfócitos T reguladores (SOLINAS et al., 2009).

Por outro lado, quimiocinas como CCL7, M-CSF, CXCL8, VEGF, PDGF e fibronectinas também são agentes atraentes de monócitos liberados por células tumorais (MANTOVANI et al., 2010; SOLINAS et al., 2009). CXCL12 também é descrito como importante mediador da infiltração por TAM no microambiente tumoral, sendo sua concentração regulada, entre outros fatores, pela hipóxia tecidual. A hipóxia induz aumento de fator induzido por hipóxia (HIF)-1 α e HIF-2 α nos TAM, o que leva ao aumento de CXCR4 e consequente manutenção de TAM nos locais próximos à hipóxia (IMTIYAZ et al., 2010; KNOWLES; HARRIS, 2007; SCHIOPPA et al., 2003; TEICHER; FRICKER, 2010). Acredita-se que esse mecanismo seja importante para concentrar os TAM em áreas mais necessitadas de angiogênese. Os TAM tendem a acumular-se e formar um gradiente em áreas de hipóxia como a região central necrótica dos tecidos tumorais, possivelmente via fatores induzidos pela hipóxia produzidos pelo próprio tumor, tais como VEGF, CXCL12 e seu receptor CXCR4 (KNOWLES; HARRIS, 2007; LEWIS; MURDOCH, 2005).

Além de monócitos circulantes derivados de medula óssea, foi descoberto que o baço também contribui como fonte de monócitos para a formação de TAM (CORTEZ-RETAMOZO et al., 2012). Recentemente, porém, evidenciou-se que a reserva esplênica contribui muito pouco como forma primária de TAM (SHAND et al., 2014). Outro mecanismo que contribui com o acúmulo de TAM no microambiente tumoral é a proliferação extramedular *in situ*. Mahoney e Heppner (1987) evidenciaram pela primeira vez esse mecanismo, tendo descrito que linhagens tumorais mais invasivas e metastáticas apresentavam maior índice de proliferação de TAM (MAHONEY; HEPPNER, 1987). Evidências posteriores confirmaram em modelo de câncer de mama que um dos principais

mecanismos da presença de TAM no microambiente é a proliferação local, mostrada através da presença do antígeno nuclear Ki67, um marcador de fases G1/S/G2 do ciclo celular (TYMOSZUK et al., 2014). Foi mostrado que a proliferação extramedular de macrófagos é intensamente associada a presença de inflamação Th2 (JENKINS et al., 2011). Entretanto, os mecanismos e mediadores associados a esta aparentemente importante via de acúmulo de TAM ainda não são completamente elucidados.

Uma vez presente no interior do microambiente tumoral, os TAM assumem funções biológicas importantes para a manutenção do crescimento do tumor. Em geral, os TAM de tumores estabelecidos vinculam-se à indução de proliferação, angiogênese, linfangiogênese, resistência a fatores anti-crescimento, resistência à apoptose e inibição do sistema imune adaptativo (SOLINAS et al., 2009). Muitos desses processos são mediados através da via do fator nuclear de transcrição κ B (NF- κ B), a qual está usualmente hiperativada nos TAM (KARIN, 2006; SACCANI et al., 2006). Através da liberação de moléculas como EGF, M-CSF, PDGF, metaloproteinases, TGF- β e VEGF, podem estimular diretamente a proliferação celular de células neoplásicas (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013; SOLINAS et al., 2009). Entretanto, a variedade e plasticidade desses macrófagos faz com que tenham diferentes ações a depender da fase de progressão tumoral. Por exemplo, em tumores mais indolentes, os TAM assumem perfil diferente, com reduzida expressão de NF- κ B e aumento de ativação de IRF3/STAT-1 (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005; BISWAS et al., 2006).

Os TAM são reguladores chave do importante processo de angiogênese. Através da produção de mediadores como VEGF-A, metaloproteinases de matriz (MMP), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), ativador de plasminogênio semelhante à uroquinase (uPA), entre outros, induzem a proliferação de células endoteliais e a formação de neovasos. Por meio de liberação de VEGF-C, VEGF-D e MMP9, induzem também a formação de neovasos linfáticos (linfangiogênese). Dessa forma, atuam diretamente no estabelecimento da massa tumoral em ascensão (RIABOV et al., 2014; SOLINAS et al., 2009). Além disso, contribuem para o processo de metástase por diferentes mecanismos. Através da angiogênese e linfangiogênese aproximam células tumorais de vasos, facilitando o processo de intravasação (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013). Produzem também mediadores que promovem características invasivas e aumentam a capacidade de migração das células tumorais; produzem ainda metaloproteinases que remodelam a matriz extracelular e aumentam o potencial de invasividade. Além disso, facilitam o processo de

colonização à distância (CONDEELIS; POLLARD, 2006). Por exemplo, é descrito que macrófagos podem emigrar em conjunto com células neoplásicas, facilitando a colonização metastática através de um mecanismo de ativação recíproca. As células tumorais produzem fator estimulador de colônia de macrófagos (CSF)-1, que estimula a formação de podossomos nos TAM, assim como os TAM produzem fator de crescimento epidérmico (EGF) que estimula a formação de *invadopods* nas células tumorais (WANG et al., 2005; YAMAGUCHI; PIXLEY; CONDEELIS, 2006).

Neoplasias bem sucedidas na progressão tumoral apresentam mecanismos de evasão imune ainda não totalmente compreendidos. É sabido, entretanto, que os TAM participam ativamente nesse processo através de complexas e variadas formas. Por exemplo, TAM expressam altas quantidades de ligante do receptor de morte programada (PD-L)1, PD-L2, B7 homólogo 1 (B7-H1 ou CD80) e B7-H2 (CD86). Os dois primeiros ligam-se aos receptores proteína de morte celular programada (PD)-1 e os dois últimos aos receptores proteína 4 associada a linfócito T citotóxico (CTLA)-4, presentes em vários tipos de células efectoras, como linfócitos T, linfócitos B e células NK. A ativação dessas vias leva à redução da ativação dessas células, facilitando o escape dos tumores à imunidade adaptativa (NOY; POLLARD, 2014). Além disso, os TAM são capazes de produzir grande quantidade de citocinas e quimiocinas. A produção de TGF- β e IL-10, por exemplo, induz a formação de Tregs a partir de linfócitos T CD4⁺, assim como o aumento da expressão do fator de transcrição supressor *foxhead box 3* (Foxp3) e o aumento da expressão de CTLA4 em células efectoras (NOY; POLLARD, 2014; ZOU, 2005). Já a produção de CCL20, CCL22 e CCL5, aumenta o recrutamento de Tregs de ocorrência natural (nTregs) para o microambiente tumoral. Por exemplo, CCL22 secretada por TAM leva ao aumento de nTregs CCR4⁺ em câncer de ovário e está relacionada a aumento de progressão tumoral (CURIEL et al., 2004). Também, os TAM através da liberação de arginase I, reduzem a disponibilidade de L-arginina ao metabolizá-la em uréia e L-ornitina. Além de diminuir a função de *killing* dos próprios TAM, pela baixa produção de óxido nítrico, esse mecanismo também leva à redução da expressão de receptor de células T (TCR) pelas células T, reduzindo sua função efetora (BISWAS; MANTOVANI, 2010).

1.1.4. Macrófagos associados ao tumor como potenciais alvos no tratamento do câncer

Dessa forma, depreende-se a grande pleiotropia dos diferentes mecanismos pró-tumorais dependentes de TAM. Mais do que apenas marcadores de mau prognóstico (ZHANG et al., 2012) ou participantes da fisiopatologia da iniciação e progressão tumoral, os TAM são potenciais alvos do seu tratamento. De fato, uma das principais estratégias em desenvolvimento é tentar aproveitar-se da plasticidade dos macrófagos e modificá-los genética ou farmacologicamente no sentido de levá-los à polarização no sentido M1. Essa modificação levaria ao aumento de função citotóxica e de apresentação antigênica, além de redução das ações pró-tumorais dos TAM (COUSSENS; ZITVOGEL; PALUCKA, 2013). Nesse contexto, Hagemann e colaboradores (2008) mostraram que a inibição da sinalização pela via NF- κ B acarreta modificação do fenótipo de TAM em direção à polarização M1. Isso levou a adquirirem um perfil citotóxico, culminando na regressão tumoral (HAGEMANN et al., 2008). Ainda, foi mostrado que a inibição do receptor de estimulação de colônia fator 1 (CSF1R) leva os TAM a um estado antitumoral (NOY; POLLARD, 2014).

Outra estratégia importante é a redução da quantidade de TAM no microambiente tumoral, implicando, assim, na redução de seus efeitos pró-tumorais. A administração de lipossomos de clodronato (clodrolip) induz a morte celular de TAM por apoptose, acarretando redução de neoangiogênese e da progressão tumoral (ZEISBERGER et al., 2006). Também, Germano e colaboradores (2013) mostraram que grande parte da ação antitumoral da trabectedina é dependente da depleção seletiva de monócitos e macrófagos tumorais por apoptose dependente de caspase-8 (via extrínseca da apoptose). Mostraram ainda que o mecanismo através do qual a trabectedina reduz TAM é através de ativação de vias ligadas aos receptores sinalizadores de morte celular ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) (GERMANO et al., 2013). Provavelmente, a alta concentração desses receptores em monócitos e macrófagos é responsável pela seletividade da droga em induzir apoptose apenas de TAM, mas não de outros componentes do microambiente inflamatório (ALLAVENA et al., 2005; D'INCALCI et al., 2014). Evidências recentes comprovam o benefício clínico do uso da trabectedina em pacientes com câncer de ovário avançado e refratário a outras linhas de tratamento (MASCILINI et al., 2014).

Figura 1 - Esquema representativo das funções de TAM no microambiente tumoral e possibilidades terapêuticas. Adaptado de SICA; ALLAVENA; MANTOVANI (2008).

1.1.5. Papel da via CXCR4/CXCL12 no câncer

Quimiocinas compõem uma classe de citocinas com várias características em comum. São pequenas proteínas (7-14 kDa) capazes de estimular a migração de leucócitos, células endoteliais, células mesenquimais e células neoplásicas (MURPHY et al., 2000). Há pelo menos 50 quimiocinas já descobertas. São classificadas e nomeadas de acordo com o número e a posição dos resíduos de cisteína na porção N-terminal, seguindo o padrão: C, CC, CXC e CXXC. O grupo mais representativo é o de quimiocinas CXC, sendo presente apenas em vertebrados mais evoluídos, de acordo com análises filogenéticas (MURPHY et al., 2000). Até o presente momento, 22 receptores de quimiocinas foram descritos. As quimiocinas usualmente ligam-se a vários receptores diferentes, assim como cada receptor pode reconhecer diversas quimiocinas, gerando um possível pleiotropismo e redundância de função entre essas vias (BACON; HARRISON, 2000). Usualmente, os receptores de quimiocinas são receptores de superfície ligados à proteína G, com 7 domínios transmembrana. Após

acoplamento da quimiocina ao receptor, ativam diversas vias de sinalização intracelular e levam habitualmente a sua dessensibilização via internalização mediada por β -arrestinas, como mecanismo regulador (TEICHER; FRICKER, 2010).

CXCL12, previamente nomeado fator derivado de estroma (SDF-1), é uma quimiocina homeostática de baixo peso molecular (8 kDa) com 68 aminoácidos. Inicialmente, seu cDNA foi clonado por Tashiro e colaboradores (1993) a partir de linhagem de células estromais da medula óssea (TASHIRO et al., 1993). Foram caracterizadas três isoformas em decorrência de *splicing* alternativo de mRNA. As moléculas isoformas de CXCL12, SDF-1 α , SDF-1 β e SDF-1 γ , diferenciam-se em termos de estabilidade. Porém estudos adicionais são necessários para verificar se diferem nas ações biológicas (COJOC et al., 2013). CXCL12 ativa primariamente o receptor denominado CXCR4, o qual é largamente expresso em diversos tipos celulares, como células hematopoiéticas, endoteliais, estromais e neuronais (MURPHY et al., 2000).

Crump e colaboradores (1997) sugeriram que a ligação da CXCL12 ao receptor CXCR4 dá-se em dois passos. Há um ancoramento ao CXCR4 através dos aminoácidos 12-17 (motivo RFFESH). Após, o receptor é ativado através da ligação dos oito primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal, o que acarreta sua ativação (CRUMP et al., 1997). Após ativação do CXCR4, ocorrem modificações na conformação da proteína G trimérica, levando à sua liberação do receptor e clivagem entre as subunidades $G\alpha$ (ligada ao nucleotídeo trifosfato de guanina) e o dímero $G\beta/\gamma$. Ambos acarretam ativação de diversas vias de sinalização intracelular, como fosfolipase C, adenilato ciclase, MAPK, JNK e PI3K, assim como acarretam aumento do influxo de cálcio intracelular (COJOC et al., 2013). Posteriormente foi mostrado também haver a ligação de CXCL12 com o receptor CXCR7, o qual não é ligado à proteína G. Acredita-se que o CXCR7 tenha função primariamente reguladora ao sequestrar a CXCL12, agindo assim como *decoy* ligado a membrana (THELEN; THELEN, 2008). CXCR7, após ligação ao CXCL12, associa-se a β -arrestinas de forma independente da mobilização intracelular de cálcio, levando à internalização do receptor e do ligante (ZABEL et al., 2009).

A via CXCL12/CXCR4 participa de etapas do desenvolvimento e também da regulação de muitas atividades fisiológicas. Por exemplo, é crucial para a formação do embrião, haja vista a deleção do gene do receptor CXCR4 acarretar diversas malformações, principalmente vasculares e imunológicas, causando morte embrionária. Por isso, o CXCR4 é

tido como o único receptor de quimiocinas essencial à vida, pelo menos de camundongos (MA et al., 1998). Foi descrito também o CXCR4 como coreceptor do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (FENG et al., 2011). Além disso, CXCL12 tem importantes papéis na inflamação, vigilância imunológica, angiogênese, migração neuronal e reparo tecidual. A secreção local de CXCL12 causa o recrutamento de progenitores mielóides e linfóides CXCR4⁺ para tecidos em regeneração (BURGER; PELED, 2009; KAHN et al., 2004), além de exercer função quimiotática em diversos tipos celulares, entre eles, linfócitos, monócitos, neutrófilos, células mesenquimais, endoteliais e tumorais (COJOC et al., 2013). Promove sobrevivência celular através da ativação de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), protegendo contra a apoptose. Pode levar ao aumento da transcrição de genes relacionados à sobrevivência celular, assim como contribui para a inativação pós-translacional da maquinaria de morte celular. Ainda, a ativação de PI3K pode levar ao aumento de AKT, ativando vias de proliferação celular (TEICHER; FRICKER, 2010). Kahn e colaboradores (2004) evidenciaram que a hiper-expressão de CXCR4 acarreta aumento de proliferação e migração de progenitores mielóides CD34⁺, mostrando o papel da via CXCL12/CXCR4 como mecanismo de acúmulo dessas células em órgãos periféricos (KAHN et al., 2004).

Um número crescente de dados reforça a importância da via CXCL12/CXCR4 como importante para vários aspectos do desenvolvimento e progressão do câncer, como proliferação celular, angiogênese, transição epitélio-mesenquimal e metástase (COJOC et al., 2013; TEICHER; FRICKER, 2010). Foi mostrada a correlação entre o aumento de CXCL12 e aumento de neoangiogênese em adenocarcinoma pancreático (CUI et al., 2011). Da mesma forma, a expressão de CXCR4 é aumentada em câncer de mama, cabeça e pescoço e glioblastoma, em comparação aos tecidos normais (COJOC et al., 2013). Müller e colaboradores (2001) mostraram aumento de CXCR4 em várias linhagens celulares de câncer de mama. Descreveram também que o CXCL12 é importante regulador do processo de metástase (MÜLLER et al., 2001). Além disso, a expressão de CXCR4 está correlacionada com pior prognóstico de vários tipos histológicos de câncer. Também já foi previamente mostrado que a ativação do eixo CXCL12/CXCR4 aumenta a proliferação, invasividade e metástase de câncer de próstata, esôfago, cérebro, cólon, rim e melanoma (COJOC et al., 2013; HIRBE; MORGAN; WEILBAECKER, 2010).

É descrito que a hipóxia tissular é um dos principais reguladores da expressão da via CXCL12/CXCR4. Em condições de normóxia, o produto do gene supressor tumoral von-

Hippel Lindau (VHL) degrada o fator de transcrição induzido por hipóxia 1 (HIF-1). Já a baixa concentração tecidual de oxigênio induz a redução do VHL, levando ao aumento de HIF-1, que acarreta o aumento da expressão de CXCR4 (BURGER; KIPPS, 2006; SCHIOPPA et al., 2003; ZAGZAG et al., 2006). Por outro lado, o acúmulo de TAM é fortemente regulado pela diminuição da disponibilidade de oxigênio tissular, acompanhando um gradiente de hipóxia. O VEGF, induzido por hipóxia, aumenta o recrutamento de monócitos para o microambiente tumoral. Entretanto, também foi evidenciado que o aumento de CXCL12 e de seu receptor CXCR4 também participam desse efeito (KNOWLES; HARRIS, 2007; LEWIS; MURDOCH, 2005; SOLINAS et al., 2009). A hipóxia, através da indução de MIF, pode atuar como mecanismo de aprisionamento de TAM, induzindo também seu acúmulo nessas regiões. Ainda, é descrito que a hipóxia aumenta o potencial angiogênico e imunossupressor de TAM (KNOWLES; HARRIS, 2007). Imtiyaz e colaboradores (2010) mostraram que o HIF-2 α induzido por hipóxia também regula o acúmulo de TAM no microambiente tumoral através de indução de M-CSFR e CXCR4 (IMTIYAZ et al., 2010). CXCL12 também é descrito como mecanismo relacionado ao recrutamento de macrófagos associados ao tumor que expressam Tie2, importantes no processo de angiogênese (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013).

Rigo e colaboradores (2010) descreveram a existência de uma alça de estimulação entre TAM e células neoplásicas dependente dessa via: CXCL12 aumenta a liberação de EGF por parte dos TAM, que por sua vez traduzem sinais de proliferação, sobrevivência e aumentam a produção de GM-CSF por parte das células tumorais, aumentando o acúmulo de TAM (RIGO et al., 2010). Aventa-se também que a via CXCL12/CXCR4 pode colaborar no mecanismo de proliferação extramedular no microambiente tumoral (JOHNS; CHRISTOPHER, 2012). Nesse contexto, Ceradini e colaboradores (2004) mostraram que o tráfico de células progenitoras é dependente da indução de CXCL12 através de HIF-1 induzido por hipóxia (CERADINI et al., 2004).

Dessa forma, o eixo CXCL12/CXCR4 é alvo potencial para o tratamento do câncer. Pequenas moléculas antagonistas do receptor, anticorpos voltados contra CXCR4 ou contra o ligante CXCL12 estão sendo investigados (TEICHER; FRICKER, 2010). São descritas quatro classes de inibidores da via: pequenos peptídeos antagonistas de CXCR4 (como o T140 e seus análogos); antagonistas do CXCR4 não peptídeos (como o AMD3100); anticorpos contra o CXCR4; e análogos do CXCL12 (BURGER; PELED, 2009). O plexirafor (AMD3100), o mais estudado até o presente, é um derivado bicíclico simétrico inicialmente estudado como

anti-HIV (CRUMP et al., 1997), específico contra o CXCR4. O AMD3100 é desde 2008 utilizado como mobilizador de células tronco hematopoiéticas para o sangue periférico para transplante autólogo de pacientes com linfoma e mieloma múltiplo (COJOC et al., 2013). AMD3100 reduziu a progressão tumoral e metástase em modelos experimentais de câncer de mama, ovário, melanoma, gliomas, câncer de cabeça e pescoço e cólon (COJOC et al., 2013). Diversos ensaios clínicos estão sendo conduzidos para avaliar melhor o papel da inibição dessa via no tratamento do câncer (DEBNATH et al., 2013).

Figura 2 - Esquema ilustrativo das vias de sinalização intracelular ativadas pelo eixo CXCL12/CXCR4. Abreviações: ER, retículo endoplasmático; GTP, Guanosine-5'-trifosfato; RTK, receptor de tirosina quinase; CXCL, ligante quimiocina (motivo C-X-C); CXCR, C-X-C receptor de quimiocina; cAMP, adenosina monofosfato cíclico; PKA, proteína quinase A; JAK, Janus quinase; STAT, sinal transdutor e ativador da transcrição; Cdc42, homólogo 42 proteína de divisão celular; Rac, substrato relacionado ao Ras de C3 toxina botulínica; Rho, família de genes homólogos ao Ras; GRK, receptor quinase acoplado à proteína G; FOXO, proteína *Forkhead box*; NFkB, fator nuclear ativador de cadeia leve kappa de células B ativadas; PIP2, fosfatidilinositol difosfato; FAK, quinase de adesão focal; PLC, fosfolipase C; PKC, proteína quinase C; Ras, família da proteína de sarcoma de rato; ERK, quinase regulada por sinal extracelular. Adaptado de COJOC et al. (2013).

1.2. SEPSE E PÓS-SEPSE

O termo sepse define um estado de resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro a uma infecção localizada ou sistêmica (BONE, 1992; LEVY et al., 2003). Trata-se de uma condição de crescente importância clínica, com incidência estimada de um milhão de casos por ano e mortalidade anual de 250.000 casos nos Estados Unidos. Um em cada quatro pacientes evolui a óbito por complicações agudas, tais como choque circulatório por queda da resistência vascular associado à depressão miocárdica, e insuficiência respiratória por síndrome do desconforto respiratório (ANGUS; WAX, 2001; DOMBROVSKIY et al., 2007). Ainda, os custos associados à doença são elevados (CHALUPKA; TALMOR, 2012). No Brasil, estudo incluindo pacientes sépticos internados em Unidades de Terapia Intensiva registraram mortalidade de aproximadamente 50% (SALES-JÚNIOR et al., 2006; SILVA et al., 2004). De acordo com o estudo PROGRESS, o Brasil apresentou a maior mortalidade por sepse entre vários países analisados (BEALE et al., 2009).

Clinicamente, define-se sepse como uma síndrome complexa multissistêmica, em decorrência de infecção diagnosticada ou presumida (VINCENT; MARTINEZ; SILVA, 2009). Recentes avanços baseados em metas hemodinâmicas e administração precoce de antibioticoterapia tem sido estabelecidos no manejo da sepse (DELLINGER et al., 2013). Essas estratégias promoveram significativa queda da mortalidade (LEVY et al., 2010), sendo esta, porém, ainda bastante elevada.

Dados epidemiológicos indicam que os pacientes sobreviventes de sepse apresentam expressivo aumento de mortalidade após alta hospitalar (QUARTIN et al., 1997; WEYCKER et al., 2003). O achado de que o pós-sepse aumenta o risco de infecção por germes oportunistas e fungos (OTTO et al., 2011), além de citomegalovírus (OSAWA; SINGH, 2009), contribui no entendimento de que este é um estado de imunossupressão. Em face disso, aventa-se que as consequências tardias da sepse possam esconder um verdadeiro problema de saúde pública (ANGUS, 2010).

Os mecanismos e mediadores envolvidos na imunossupressão do pós-sepse ainda não estão completamente elucidados. Foi mostrado que o aumento de IL-10 nas fases iniciais da sepse acarreta maior suscetibilidade à infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, uma vez que o tratamento com anticorpo anti-IL-10 reduziu a mortalidade secundária à infecção secundária (STEINHAUSER et al., 1999). Por outro lado, mostrou-se que após a sepse, as células

dendríticas encontram-se em número reduzido (HOTCHKISS et al., 2002), o que foi fortemente associado à imunossupressão. Benjamin e colaboradores (2005) mostraram que a transferência de células dendríticas de indivíduos naïve reverteu a imunossupressão induzida pela sepse (BENJAMIM et al., 2005).

Nascimento e colaboradores (2010) mostraram experimentalmente que animais previamente submetidos à sepse polimicrobiana apresentavam mortalidade absoluta após exposição a inóculo não letal de *Legionella pneumophila*. Tregs encontram-se em maiores quantidades e com função imunossupressora anti-CD8 mais ativa em animais pós-sepse. Adicionalmente, verificaram que o tratamento com anticorpo anti-GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene*), que inibe a função imunossupressora de Tregs, preveniu esse fenótipo (NASCIMENTO et al., 2010). Neste período, também surgiu a primeira descrição experimental do aumento de progressão tumoral no período pós-sepse, realizada por Cavassani e colaboradores (2010). Neste estudo, os autores descreveram aumento da progressão de carcinoma de pulmão de Lewis implantado heterotopicamente no subcutâneo de animais pós-sepse. Avaliaram também o papel de Tregs nesse período, verificando que o transplante de Tregs de animais sobreviventes de sepse acarretava aumento de progressão tumoral (CAVASSANI et al., 2010). Adicionalmente, Nascimento e colaboradores (2012) mostraram que no pós-sepse há uma maior polarização de macrófagos no sentido da ativação alternativa, ou seja, M2. Verificaram ainda que este efeito é dependente de IL-33, uma defensina produzida em grande quantidade após estados de agressão celular, como a sepse (NASCIMENTO, 2012). Estes processos foram determinantes para a ocorrência de imunossupressão e suscetibilidade a pneumonia por *Legionella sp* (NASCIMENTO, 2012).

A ocorrência de modificações epigenéticas é tida como um dos mecanismos através do qual o sistema imune é comprometido após a resolução da sepse. Por exemplo, as alterações AcH4 e H3k4me3 são relacionadas à tolerância de macrófagos ao desafio com LPS. Além disso, o aumento da atividade da desmetilase de histona KDM6B é associado à remoção da hipermetilação H3K27, que tem ação repressora nas regiões promotoras para diferenciação para macrófago M2. Além disso, é descrito também o aumento da acetilação da histona 3 na posição da lisina 9 (H3K9ac), o que potencialmente facilitaria a transcrição de Foxp3 e a consequente conversão de células T CD4⁺ em Tregs (CARSON et al., 2011). Ainda, é descrito que a sepse gera um perfil característico de microRNA detectado no soro (com

aumento de miR-21 e miR-181b), estando associado à expansão da população de MDSC e, ao aumento do estado de imunossupressão (MCCLURE et al., 2014).

1.3. ASSOCIAÇÕES ENTRE CÂNCER, SEPSE E PÓS-SEPSE

Willians e colaboradores (2004) mostraram que o risco relativo de pacientes com câncer apresentarem sepse é em torno de 3,96, a depender do tipo de neoplasia. Entre as neoplasias sólidas, os sítios que mais aumentaram o risco relativo foram pulmão (RR = 13,76) e cérebro (RR = 6,5) (WILLIAMS et al., 2004). Danai e colaboradores (2006) publicaram a análise de uma grande coorte referente ao período de 1979 a 2001, em que avaliaram 854 milhões de internações hospitalares através das base de dados norte-americanas. Destas, 76,6 milhões eram pacientes portadores de algum tipo de neoplasia maligna. Puderam constatar que o risco relativo do paciente com câncer internar por sepse é 9,77 vezes maior que o risco de pacientes sem câncer. Apesar de a incidência de sepse em pacientes com câncer vir caindo ao longo do tempo, espera-se mais casos em termos absolutos, haja vista a incidência crescente de câncer na população (DANAI et al., 2006). Entretanto, até o presente momento, não há estudos epidemiológicos que evidenciem que pacientes sobreviventes de sepse apresentam aumento do risco de desenvolver câncer.

Trabalhos prévios mostram que pacientes imunossuprimidos por outros motivos, tais como os receptores de órgãos sólidos em uso de terapia imunossupressora, apresentam risco três a cinco vezes maior de desenvolver câncer, em comparação a controles saudáveis (SHERSTON et al., 2014). Portanto, é possível supor que o estado de imunossupressão pós-sepse esteja relacionado ao possível aumento da incidência de câncer. Os mesmos pacientes sobreviventes à sepse que comprovadamente encontram-se sob risco aumentado de contrair infecções por germes oportunistas, fungos e CMV, podem ter também maior risco de desenvolver câncer. Por outro lado, este raciocínio leva-nos ao questionamento se indivíduos já portadores de neoplasias, uma vez desenvolvendo sepse, podem ter aumentado risco de progressão tumoral, metastização e morte secundária ao câncer. Não há até o presente estudos clínicos ou epidemiológicos que comprovem essa hipótese ou que tenham associações ou inferências entre essas duas variáveis. Como descrito anteriormente, há apenas um estudo experimental que testou essa associação. Nesse estudo, foi evidenciado aumento de progressão tumoral em camundongos sobreviventes à sepse, por mecanismo dependente de Tregs (CAVASSANI et al., 2010).

Nesse contexto, é sabido que o estado pós-sepse apresenta vários mecanismos de imunossupressão semelhantes aos presentes no microambiente tumoral de neoplasias sólidas diversas. Habitualmente, a constituição do microambiente tumoral fornece papel anti-inflamatório e promotor de progressão local, invasividade e metástases, como já previamente discutido. Hotchkiss e Moldawer (2014) recentemente traçaram um paralelo entre os mecanismos imunológicos presentes no microambiente tumoral e em infecções protraídas (Figura 3), clarificando a grande quantidade de semelhanças entre as duas situações.

Figura 3 - Paralelos entre câncer e infecção sistêmica. Em ambas situações, encontramos atividade pronunciada de Tregs, macrófagos polarizados no sentido M2 e linfócitos Th2. O efeito final é tido como imunossupressivo, levando à anergia de células T efetoras, além de secreção de vários fatores relacionados à progressão tumoral, angiogênese e linfangiogênese. Adaptado de HOTCHKISS; MOLDAWER (2014).

Dessa forma, consideramos de importância discriminar as relações entre o desenvolvimento/progressão tumoral e estado pós-sepse, focando em possíveis alterações presentes no microambiente inflamatório e tentando estabelecer quais mecanismos são subjacentes a esses processos.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

Nossa hipótese é que indivíduos sobreviventes à sepse apresentam condições e fatores que facilitam a progressão tumoral, assim como a ocorrência de metástases. Possivelmente, essa alteração está envolvida com modificações inflamatórias do microambiente tumoral. Tendo em vista a importância de macrófagos tumorais na mediação da progressão tumoral, nossa hipótese é que a expansão de tumores no pós-sepse pode estar relacionada a aumento de infiltração por TAM ou alterações da função dos TAM possivelmente derivadas de modificações da expressão gênica.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a progressão tumoral de melanoma B16 em camundongos C57 sobreviventes de sepse e a possível participação de macrófagos associados ao tumor nesse processo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se ocorre aumento de progressão tumoral de melanoma B16 em camundongos sobreviventes à sepse;
- Investigar a ocorrência de metástases espontâneas de melanoma B16 e lesões pulmonares em modelo de colonização em animais sobreviventes à sepse;
- Investigar o padrão de acúmulo de TAM em animais pós-sepse;
- Quantificar a expressão de CXCR4 em TAM de animais pós-sepse;
- Analisar se o possível acúmulo de TAM em animais sobreviventes à sepse pode ocorrer, pelo menos em parte, em decorrência de proliferação extramedular;
- Determinar possíveis diferenças no perfil de citocinas de animais portadores de tumor no período pós-sepse, em comparação aos naïve;
- Analisar o perfil de expressão gênica de macrófagos associados ao tumor de animais pós-sepse em comparação com aqueles derivados de animais naïve, no sentido de correlacioná-lo com a progressão tumoral;
- Investigar se a inibição da via CXCR4/CXCL12 pode induzir alteração do fenótipo de aumento de progressão tumoral em animais sobreviventes à sepse, avaliando se esse efeito pode ser, pelo menos em parte, secundário à inibição do acúmulo de macrófagos associados ao tumor.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos isogênicos, entre 6 e 8 semanas, provenientes do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e alojados no Biotério do Departamento de Farmacologia. Os animais eram mantidos em gaiolas climatizadas, com ciclo de claro/luz de 12 horas e água e ração *ad libitum*. Foram seguidas todas as normas preconizadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O Protocolo de Pesquisa foi previamente aprovado por este comitê (Protocolo para Uso de Animais em Experimentação número 141/2012, Anexo 1).

4.2. PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES

4.2.1. Meio RPMI incompleto

RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, EUA).....	01 frasco
HEPES (Sigma, St. Louis, MO, EUA).....	26 mM
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃ , Vetec)	25 mM
Água Milli-Q q.s.p.	1000 mL

O pH foi ajustado para 7,2. A solução foi filtrada e estocada a 4° C.

4.2.2. Meio RPMI completo

Soro Bovino Fetal Inativado (Gibco)	10 mL
Penicilina (Gibco)	100 U/mL
Estreptomicina (Gibco)	100 µg/mL
Anfotericina B (Gibco)	2 µg/mL
L-glutamina (Sigma)	2 mM

Meio RPMI incompleto q.s.p. 100 mL

O pH foi ajustado para 7,2. A solução foi filtrada e estocada a 4° C.

4.2.3. Tampão salina-fosfato (PBS) 10 X (para estoque)

Cloreto de sódio (NaCl, Merck, Whitehouse station, NJ, EUA) 80 g

Cloreto de potássio (KCl, Merck) 2 g

Fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) 11,5 g

Fosfato de Potássio monobásico (KH₂PO₄, Merck)..... 20 g

Água deionizada Milli-Q q.s.p. 1000 mL

A solução foi estocada a 4° C.

4.2.4. PBS 1 X (para uso)

Solução PBS 10 X 100 mL

Água Milli-Q q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 7,2. A solução foi filtrada e estocada a 4° C.

4.2.5. Tampão 1 de MPO

Cloreto de sódio (NaCl, Merck) 5,84 g

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) sal dissódico (Merck) 5,58 g

Fosfato de sódio (NaPO₄, Sigma) 0,02 M 1 L

O pH foi ajustado para 4,7. A solução foi estocada a 4° C.

4.2.6. Tampão 2 de MPO

Brometo de Hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio (H-TAB, Sigma) 1 g

Fosfato de sódio (NaPO_4 , Sigma) 0,05 M 200 mL

O pH foi ajustado para 5,4. A solução foi estocada a 4° C.

4.2.7. Tampão de citometria de fluxo

Soro Bovino Fetal inativado (Gibco) 2 mL

Solução PBS 1 X q.s.p. 100 mL

O pH foi ajustado para 7,2. A solução foi filtrada e estocada a 4° C.

4.2.8. PBS/EDTA (1mM)

EDTA sal dissódico (Merck) 37,2 mg

PBS 1 X q.s.p. 100 mL

O pH foi ajustado para 7,2. A solução foi filtrada e estocada a 4° C.

4.2.9. Tampão de lise celularCloreto de amônio (NH_4Cl , Merck) 8 g

EDTA sal dissódico (Merck) 0,36 g

Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 0,84 g

Água Milli-Q q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 7,2. A solução foi filtrada e estocada a 4° C.

4.2.10. Formaldeído 1%

Formaldeído em solução 37% (Merck).....1 mL

PBS 1 X q.s.p.100 mL

A solução foi estocada a 4° C.

4.2.11. Formaldeído 10%

Formaldeído em solução 37% (Merck)..... 100 mL

PBS 1 X q.s.p.1000 mL

A solução foi estocada a temperatura ambiente.

4.2.12. Etanol 70%

Etanol absoluto (Synth).....70 mL

Água destilada q.s.p.100 mL

A solução foi estocada à temperatura ambiente.

4.2.13. Solução de congelamento

Soro Bovino Fetal inativado (Gibco)90 mL

DMSO (Sigma)10 mL

A solução foi estocada a -20° C.

4.2.14. Solução de Ketamina e Xilazina

Ketamina 10% (Agener, União Química, Brasil) 1,25 mg/mL

Xilazina 2% (Agener, União Química)..... 0,5 mg/mL

Salina 0,9% q.s.p. 100 mL

A solução foi estocada a 4° C.

4.2.15. Paraformaldeído 4%

Paraformaldeído (Sigma) 4 g

PBS 1 X q.s.p. 100 mL

O pH foi ajustado para 7,2 e a solução estocada a 4° C.

4.2.16. Glicina 0,1 M

Glicina (Sigma) 0,75 g

PBS 1 X 100 mL

A solução foi estocada a 4° C.

4.2.17. BSA 2%

Albumina sérica bovina (BSA, Sigma) 2 g

PBS 1 X 100 mL

A solução foi estocada a 4° C.

4.2.18. Meio L929

Sobrenadante de sarcoma L929 20 mL

Soro bovino fetal inativado (Gibco) 20 mL

Penicilina (Gibco) 100 U/mL

Estreptomicina (Gibco) 100 µg/mL

Anfotericina B (Gibco)2 µg/mL

L-glutamina (Sigma) 2 mM

Meio RPMI incompleto q.s.p.100 mL

A solução foi estocada a 4° C.

4.2.19. Solução de digestão

Colagenase tipo II (Sigma)..... 100 mg

Desoxirribonuclease tipo I (DNase, Sigma)..... 10 mg

Soro Bovino Fetal inativado (Gibco)5 mL

RPMI incompleto q.s.p.100 mL

A solução foi estocada a 4° C.

4.2.20. Hank's Balanced Salt Solution (HBBS) 10X

HBBS (Sigma) 1 frasco

Água Milli-Q q.s.p.100 mL

O pH foi ajustado para 7,2. A solução foi estocada a 4° C.

4.2.21. HBBS 1X

HBBS 10X10 mL

Água Milli-Q q.s.p.100 mL

A solução foi estocada a 4° C.

4.2.22. Percoll (solução mãe)

Percoll (Sigma).....90 mL

HBBS 100X10 mL

A solução foi estocada a 4° C.

4.2.23. Percoll 70%

Percoll (solução mãe).....70 mL

HBBS 1X30 mL

A solução foi estocada a 4° C.

4.2.24. Percoll 30%

Percoll (solução mãe).....30 mL

HBBS 1X70 mL

A solução foi estocada a 4° C.

4.3. LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR

Células de melanoma murino B16-F10-luc-G5 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, MA, EUA) eram cuidadosamente descongeladas em meio RPMI completo. Após centrifugação (400 g, 8 min, 4° C), o sobrenadante era desprezado e o *pellet* de células suspenso em meio RPMI completo. O conteúdo era introduzido em garrafa de cultura para células aderentes, deixada posteriormente em estufa a 37° C com atmosfera de CO₂ a 5%. Os repiques eram realizados com tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) antes da formação de camada confluenta. Após a primeira passagem, as células foram centrifugadas, suspensas em solução de congelamento e colocadas em frascos criogênicos e estocadas em nitrogênio líquido a aproximadamente -196° C.

4.4. MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE POLIMICROBIANA

4.4.1. Modelo de Ligadura e Punção Cecal

Para indução de sepse polimicrobiana, os animais foram submetidos ao procedimento de ligadura e punção cecal (CLP), previamente descrito (RITTIRSCH et al., 2009). Brevemente, os camundongos eram anestesiados com solução de ketamina (12,5 mg/kg, 200 µL, i.p.) e xilazina (5 mg/kg, 200 µL, i.p.) e colocados em posição dorsal em mesa cirúrgica apropriada. Era realizada incisão mediana de aproximadamente 0,8 cm. Posteriormente à exposição do ceco, era realizada a ligadura com fio de algodão abaixo da junção ileocecal e transfixação da porção distal com agulha estéril 18G X 1 ½'' para induzir CLP grave/letal (Figura 4). Após, era realizada discreta compressão de modo a permitir a visualização direta da saída do bolo fecal proveniente do lúmen intestinal. Era realizada a devolução à cavidade peritoneal e sutura em camadas com fio Nylon 4.0. Imediatamente após o término do procedimento, os animais recebiam solução fisiológica (1 mL por via subcutânea) e eram posicionados em leitos apropriados aquecidos para recuperação pós-anestésica. O tempo médio de recuperação da anestesia era de cerca de 30 minutos. Na fase de padronização realizamos também o procedimento de “CLP não letal”, em que eram realizadas três perfurações no ceco com agulha 26G X ½''.

Figura 4 - Demonstração do procedimento de ligadura e punção cecal (CLP). (A) Ligadura com fio de algodão abaixo da válvula ileocecal. (B) Transfixação do ceco com agulha 18G. Todos os procedimentos foram realizados com os animais anestesiados.

Durante a sepse grave ocorre falência de migração de neutrófilos com acúmulo de neutrófilos no pulmão, ausência de controle da infecção bacteriana no foco e bacteremia

importantes (ALVES-FILHO; SPILLER; CUNHA, 2010). Dessa forma, de modo a confirmar a ocorrência de sepse grave no nosso modelo, fizemos experimento com três grupos: *sham*, CLP não letal e letal. Os animais foram sacrificados 6 horas após a cirurgia através de dose excessiva de anestésicos, tendo sido coletado amostras de lavado peritoneal, sangue e pulmão.

4.4.2. Contagem de polimorfonucleares no lavado peritoneal

Amostras de lavado peritoneal foram coletadas através da infusão de 3 mL de PBS-EDTA seguida da rápida coleta. A contagem de leucócitos totais foi realizada através de contador automático de células (COULTER AC T, Coulter Corporation, Miami, FL, EUA). Após, foram preparadas lâminas para contagem diferencial por meio de citocentrifugação (Citospin, Shandon Lipshaw Inc., EUA) As lâminas foram coradas seguindo protocolo do corante panótico rápido (LaborClin). As lâminas foram analisadas no aumento de 1000X em microscopia óptica convencional (Zeiss, Jena, Alemanha). Realizamos a contagem de 100 células em um campo representativo da lâmina. Obteve-se assim a porcentagem de polimorfonucleares, permitindo o cálculo da contagem de polimorfonucleares em termos absolutos por cada amostra. Os resultados foram expressos em número de neutrófilos/animal.

4.4.3. Dosagem de Mieloperoxidase (MPO) no pulmão

Para avaliar a infiltração por neutrófilos no pulmão as amostras foram coletadas em tampão 1 de MPO, maceradas em Polytron e centrifugadas (3000 rpm, 15 min, 4° C). O sobrenadante era descartado e era adicionado 1 mL de tampão de lise para MPO (NaCl 0,2%). Após homogeneização por vórtex, as amostras eram novamente centrifugadas (3000 rpm, 15 min, 4° C). Posteriormente, era adicionado 500 µL de tampão 2 de MPO para nova maceração em Polytron. Em seguida, as amostras passavam por nova centrifugação (10000 rpm, 15 min, 4° C) e o sobrenadante era plaqueado (50 µL por poço) e adicionado 25 µL de Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma, 3,845 mg/mL em dimetilsufóxido - DMSO) e 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM). As placas eram incubadas a 37° C por 5 min e a reação era interrompida após adição de 75 µL H₂SO₄ (4 M). As amostras eram lidas em leitor de ELISA (Spectra Max 190, Molecular Devices) a 450 nm. A quantidade de neutrófilos era determinada conforme curva previamente estabelecida. Os resultados foram expressos em neutrófilos/µg de tecido.

4.4.4. Contagem de bactérias no lavado peritoneal e sangue

Para determinação da carga de bactérias, foram coletados 10 µL de lavado peritoneal e 10 µL de sangue proveniente de punção cardíaca. As amostras foram plaqueadas sem diluição em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (Difco Laboratories). As placas foram incubadas overnight a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂ para quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os resultados foram expressos em Log de UFC/animal.

4.5. MODELO EXPERIMENTAL DE SOBREVIVENTES À SEPSE

Em nosso modelo de CLP letal é esperado que haja mortalidade de 100% em torno do terceiro dia de evolução. Para que a obtenção de indivíduos sobreviventes à sepse (doravante denominados pós-sepse ou pós-CLP) na amostra de animais operados, instituímos antibioticoterapia com ertapenem (Merck Sharp&Dome) 20 mg/kg por via intraperitoneal 6 horas após o procedimento e de 12 em 12 horas por 3 dias (total de 7 doses), conforme previamente descrito (NASCIMENTO et al., 2010). Dessa forma, pudemos observar sobrevida em cerca de 40-50% nos animais tratados.

4.5.1. Sobrevida após infecção por *Legionella pneumophila*

Na fase de padronização, realizamos a infecção de animais pós-sépticos e naïve (controles) com inóculo não letal de *Legionella pneumophila* sorogrupo 1 (1×10^7 , por via intranasal), de modo a confirmar o estado de imunossupressão, conforme previamente descrita (NASCIMENTO et al., 2010).

A bactéria *L. pneumophila* da cepa 1326 foi incubada em meio sólido (ágar) de extrato de levedura com carvão ativado (1 % de extrato de levedura; 1 % de ácido N-(2 acetoamido)-2- aminoetanosulfônico (ACES), pH 6.9; 3.3mM L-cisteína; 0,33mM de Fe(NO)₃; 1.5 % de ágar bacteriológico e 0.2 % de carvão ativado). A leitura da densidade óptica a 600 nm das bactérias diluídas em PBS estéril foi utilizada para estimar a concentração da suspensão bacteriana.

Para a instilação nasal, os animais eram anestesiados por via i.p. com solução de ketamina e xilazina e recebiam por via intranasal 40 µL da suspensão contendo 1×10^7 de bactérias. Posteriormente, avaliamos a sobrevida dos animais infectados naïve e pós-CLP.

4.6. AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO TUMORAL DE MELANOMA B16-F10 EM ANIMAIS PÓS-SÉPTICOS

Para determinar se ocorre aumento de progressão tumoral em animais previamente submetidos à sepse, realizamos a inoculação de células tumorais de melanoma B16 em animais naïve (controles) ou animais sobreviventes previamente submetidos à CLP no 15º dia após a cirurgia. Foram utilizados diferentes inóculos tumorais em quantidades decrescentes (100 mil, 30 mil e 10 mil), de modo a avaliar qual seria a menor quantidade de células capaz de promover iniciação tumoral de modo diferencial entre animais naïve e pós-sépticos. Dessa forma, seguimos o esquema a seguir:

Figura 5 - Inoculação de B16 após 15 dias de CLP. ATB significa: ertapenem 20 mg/kg 12/12 h.

A fim de determinar o efeito mais tardio do estado pós-séptico na progressão tumoral, realizamos também a inoculação de melanoma B16 em animais sobreviventes 30 e 60 dias após a indução de sepse, conforme esquema abaixo:

Figura 6 - Inoculação de B16 após 30 dias de CLP. Adicionalmente, foi também avaliada a inoculação de B16 após 60 dias de CLP.

As técnicas utilizadas para inoculação e para avaliação da progressão tumoral estão abaixo descritas.

4.6.1. Inoculação de animais

As células previamente colocadas em cultura celular eram repicadas com tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) quando estavam com aproximadamente 80% de confluência e lavadas com meio RPMI completo para inativação da tripsina. Após, eram novamente lavadas e suspensas em PBS 1X. As células eram contadas em câmara de Neubauer e diluídas em PBS 1X para que em cada animal fosse administrado o volume de 200 μ L. Antes da inoculação, uma pequena alíquota de 10 μ L era adicionada a azul de Trypan 0,4% (Sigma) 1:1 e contada em câmara de Neubauer para avaliar a viabilidade celular. Em todas as análises a viabilidade celular foi maior que 95%.

Após preparo das células, os animais eram anestesiados em capela de isoflurano 1mL/mL (Cristália), tricotomizados com lâmina apropriada e injetados no dorso direito por via subcutânea com os inóculos tumorais previamente determinados (JACOB; DAVIS; FANG, 2004).

4.6.2. Mensuração do volume tumoral por paquímetro

Diariamente os animais eram inspecionados até o aparecimento de uma pequena nodulação hiperocrômica palpável no dorso direito. A partir de então, fazia-se o seguimento do

animal três vezes por semana até a morte do primeiro animal de qualquer grupo. Através de paquímetro digital (Marberg), media-se o diâmetro maior e o menor. Calculava-se indiretamente o volume tumoral por meio da fórmula abaixo descrita (JACOB; DAVIS; FANG, 2004):

$$\frac{\text{Diâmetro maior} \times \text{Diâmetro menor}^2 \times \pi}{6}$$

Os resultados foram expressos em mm³.

4.6.3. Mensuração da carga tumoral Bioluminescência

As células utilizadas (B16-F10-luc, ATCC) carregam a enzima luciferase de vagalume, que, na presença de trifosfato de adenosina (ATP), O₂ e Mg²⁺, catalisa a conversão de D-luciferina em oxiluciferina, CO₂, adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato inorgânico (PPi), gerando emissão de fótons no comprimento de onda de 560 nm (GREER; SZALAY, 2002).

Animais naïve ou CLP inoculados com melanoma B16 (inóculos tumorais de 100 mil, 30 mil e 10 mil células) foram submetidos a quantificação da carga tumoral por bioluminescência nos dias D0, D+3, D+7, D+14, e D+21. Para a mensuração, os animais eram anestesiados com isoflurano 2,5% (Cristália) e recebiam injeção de luciferina (Caliper Lifesciences) na dose de 150 mg/kg por via intraperitoneal cerca de 15 a 20 minutos do início. Após, os animais eram posicionados no interior da câmara escura do aparelho IVIS Lumina System (Caliper Lifesciences) e mantidos sob sedação com isoflurano a 1,5%.

A emissão de fótons gerada através da reação de oxidação da luciferina catalisada pela luciferase presente das células tumorais vivas era captada pelo aparelho IVIS Lumina System operado por meio do *software* Living Image 3.0. Após captação do sinal bioluminescente, a região de interesse (do inglês, *Region of Interest*, ROI) era desenhada para mensuração da intensidade de bioluminescência medida pelo fluxo de fótons. Para cada animal, utilizamos as medidas obtidas no pico da curva enzimática. Os resultados foram expressos em fluxo de fótons (fótons/segundo).

4.6.4. Sobrevida

Para análise de sobrevida, os animais eram inspecionados diariamente por um período máximo de 42 dias. Os animais que sobreviveram após esse período eram sacrificados por meio de CO₂. Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevida (%) em curva de sobrevida de Kaplan Meier.

4.6.5. Histopatologia

Para realização de análise histopatológica, grupos de animais naïve ou pós-CLP foram inoculados 15 dias após a cirurgia com B16 30 mil células e sacrificados no D+14 após inoculação tumoral através de dose excessiva de analgésicos, conforme descrito na Figura 7.

Figura 7 - Coleta de amostras para anatomopatológico de animais pós-sépticos inoculados com B16. No D+14 da inoculação, os animais eram sacrificados para coleta de amostras de tumor, as quais eram posteriormente analisadas quanto à presença de necrose ou hemorragia.

Amostras de tumor com musculatura adjacente foram coletadas e fixadas em formol 10%. Após 24 horas, as amostras eram transferidas para etanol 70% e submetidas a bateria de etanol para desidratação e de xilol para diafanização, com posterior inclusão em parafina. Para confecção das lâminas, foram obtidos 4 cortes por amostra de 5 µm de espessura cada. A coloração foi realizada com hematoxilina e eosina (HE). Após, o material foi analisado em microscópio óptico convencional (Zeiss) e fotografado (LeicaDMI6000B, Leica

microsystems, Buffalo Grove, IL, EUA). Amostras de tumor primário foram analisadas quanto a presença de áreas de necrose e hemorragia.

4.7. AVALIAÇÃO DE METÁSTASES ESPONTÂNEAS E COLONIZAÇÃO PULMONAR EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE

4.7.1. Avaliação de Metástases espontâneas no D+21

Para avaliação de metástases espontâneas, animais foram submetidos a CLP e 15 dias depois foram inoculados com B16 30 mil células. No D+21, foram sacrificados e tiveram pulmões, cérebro, fígado e linfonodo inguinal ipsilateral coletados. As amostras foram fixadas em formol, processadas, coradas com HE e fotografadas conforme previamente citado na seção 2.6.5. Antes do preparo para histologia, os pulmões foram analisados com auxílio de lupa de magnificação (10X) e contados o número de nódulos enegrecidos (metástases) em sua superfície. Os resultados foram expressos em número de metástases/pulmões. Todo o material foi analisado quanto à presença ou não de lesões compatíveis com metástases. Os resultados foram expressos em tabela de contingência contendo as porcentagens de indivíduos com metástases por órgão acometido.

4.7.2. Ensaio de colonização pulmonar

Avaliamos a colonização pulmonar de melanoma B16-F10 em animais previamente submetidos a sepse. Para isso, realizamos experimento com dois grupos: naïve e pós-CLP, ambos recebendo por via intravenosa (i.v.) inóculo tumoral de 30 mil células B16-F10. Animais no D+18 da inoculação tumoral receberam luciferina (150 mg/kg, i.p.). 10 minutos depois, foram sacrificados e tiveram seus pulmões excisados. Os órgãos foram mantidos em luciferina (300 µg/mL em PBS) e levados ao IVIS Lumina System para quantificação de carga tumoral por bioluminescência. Os resultados foram expressos em fluxo de fótons (fótons/segundo).

4.7.3. Ensaio de mortalidade por metástases espontâneas precoces

Para determinar a mortalidade por metástases espontâneas precoces, realizamos experimento em que foram inoculados animais CLP_{15d} e naïve. No D+14 da inoculação, os animais foram operados sob efeito de anestesia (ketamina/xilazina) para exérese do tumor primário subcutâneo. Após procedimentos de antissepsia, foi realizada uma incisão em L, seguindo-se da retirada da massa tumoral após exploração de todo o subcutâneo do dorso direito. Após a excisão, o subcutâneo exposto era lavado por 3 vezes com solução salina morna para maximizar a retirada de todas as células neoplásicas presentes. Após, era realizada sutura com Nylon 4.0 e os animais eram observados a fim de determinar a sobrevivência (KETCHAM et al., 1961). Apenas um animal do grupo CLP_{15d} apresentou recidiva local do tumor e foi excluído das análises. A Figura 8 esquematiza a sequência de eventos do experimento.

Figura 8 - Ensaio de mortalidade por metástases espontâneas. Camundongos pós-CLP ou naïve recebiam inóculo tumoral de B16 30 mil e após 14 dias eram submetidos à cirurgia para exérese do tumor. A sobrevivência era acompanhada.

4.8. CITOMETRIA DE FLUXO

Para analisar os macrófagos tumorais associados ao tumor (TAM) e linfócitos T reguladores presentes no microambiente tumoral e as quantidades de linfócitos T reguladores no baço e linfonodo inguinal (macroambiente tumoral), utilizamos a citometria de fluxo como ferramenta. Para isto, realizamos experimentos em que utilizamos quatro grupos: animais

naïve sem tumor, naïve com B16, sobreviventes de CLP sem tumor e sobreviventes de CLP com B16. Naturalmente, a presença de TAM foi possível apenas de ser avaliada nos grupos inoculados com B16. Os animais inoculados receberam melanoma B16 por via subcutânea no flanco direito. Os linfonodos estudados foram necessariamente os linfonodos inguinais do lado da lesão tumoral. Em alguns indivíduos, não foi possível a exérese do linfonodo, haja vista extensa infiltração tumoral com severo comprometimento da região anatômica. O esquema abaixo é ilustrativo dos experimentos realizados (Figura 9).

Figura 9 - Experimentos para coleta de material para citometria de fluxo para avaliação de TAM e Tregs. Animais naïve ou pós-sepse no D+14 e D+21 da inoculação tumoral eram sacrificados para coleta de baço, linfonodos inguinais e tumor (D+14) e apenas tumor (D+21). No D+14, eram avaliados Tregs ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) e TAM ($F4/80^+CD206^+$). No D+21, avaliamos apenas TAM.

As etapas de preparo das amostras, marcação com anticorpos e análise são detalhadamente descritas a seguir.

4.8.1. Preparo da Suspensão Celular Simples

4.8.1.1. Baço e linfonodos

Após sacrifício dos animais, era realizada a remoção do baço e linfonodo inguinal direito (linfonodo de drenagem do tumor). O baço era posicionado em placa de 24-wells contendo 3 mL de meio RPMI incompleto. Após homogeneização mecânica, o material era passado contra peneira de células de 100 μ m. As amostras eram centrifugadas a 400 G, 8 min,

4° C e lavadas com tampão de lise para remoção das hemácias. Após, era realizada nova lavagem com tampão de FACS. Era realizada a contagem de células (Coulter) e correção do volume para a quantidade 1 milhão de células por tubo de citometria. Foram seguidas as mesmas etapas para preparo de suspensão celular simples de linfonodos.

4.8.1.2. Tumor

Foi realizada a exérese do tumor intacto sem rompimento da cápsula e fragmentação manual até a obtenção de fragmentos menores que 5 mm. Para digestão, os fragmentos eram incubados em solução de digestão (RPMI incompleto com 5% de soro bovino fetal inativado, collagenase tipo II 1 mg/mL e DNase tipo I 0,1 mg/mL) a 37° C por 40 minutos sob agitação (Incubadora Shaker, SL 222, SoLab). Após digestão, as amostras eram centrifugadas (400 g, 8 min, 4° C) e lavadas com RPMI incompleto. Posteriormente, as amostras eram forçadas contra peneira de células de 100 µm para formação de suspensão celular simples, lavadas e centrifugadas com tampão de FACS e colocadas em tubos de citometria apropriados após correção do volume para 1 milhão de células.

4.8.2. Quantificação de TAM por Citometria de Fluxo

A infiltração por TAM foi mensurada no D+14 e no D+21 após inoculação tumoral. Brevemente, após preparo da suspensão celular simples (conforme descrito no item 4.8.1.2), as células tumorais (1×10^6 /tubo) eram adicionadas a 1 µL de anti-F4/80 PE (eBiosciences, San Diego, CA, EUA) e 3 µL de anti-CD2016 AF 647 (ABD Serotec, Kidlington, UK) e incubados por 40 min a 4° C. Após, era realizada lavagem com tampão de FACS e centrifugação (400 g, 8 min, 4° C) para retirada do excesso de anticorpo. As células eram fixadas com PBS-Formol 1% e levadas ao citômetro de fluxo (FACS Canto) para aquisição dos dados. Foram considerados TAM as células $F4/80^+CD206^+$. Como forma de refinar nossos achados, realizamos novo experimento no D+14 com marcação para leucócitos totais com 1 µL de anti-CD45-PE (eBiosciences), além de 1 µL de anti-F4/80-FITC (eBiosciences) e 1 µL de anti-CD2016-AF 647 (ABD Serotec), tendo sido considerados TAM os eventos $CD45^+F4/80^+CD206^+$.

4.8.3. Determinação da expressão de CXCR4 em TAM

A porcentagem e número absoluto de TAM expressando o receptor de membrana CXCR4 foi determinada a partir de citometria de fluxo após marcação com anticorpos anti-CD45-APC (eBiosciences), anti-F4/80-FITC (eBiosciences) e anti-CXCR4-PE (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Foram considerados TAM CXCR4⁺ os eventos CD45⁺F4/80⁺CXCR4⁺.

4.8.4. Quantificação de proliferação extramedular de TAM

Adicionalmente, quantificamos a presença de TAM com proliferação extramedular, a partir da expressão do antígeno nuclear Ki67. Após preparo da suspensão celular simples, as células foram permeabilizadas através de kit específico para permeabilização das membranas celulares (*Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set*, Affymetrix eBiosciences). Brevemente, 2 milhões de células do homogenato tumoral previamente marcadas com anti-CD45-FITC (BD Biosciences) e anti-F4/80-PE (eBiosciences), conforme protocolo previamente discriminado, eram fixadas e permeabilizadas durante 20 minutos em temperatura ambiente com o tampão *Fixation/Permeabilization Concentrate* (250 µL por tubo, previamente diluído com o tampão *Fixation/Permeabilization Concentrate*, conforme orientação do fabricante). O material era centrifugado (400 g, 10 min, 4° C) e novamente permeabilizado com o tampão *Permeabilization Buffer* (diluído 1:10 em água destilada) contendo anti-Ki67-APC (Biolegend, San Diego, CA, EUA) diluído 1:250. Após passagem no vórtex, as células eram deixadas incubando por 30 minutos em temperatura ambiente, novamente centrifugadas e lavadas com PBS. Após leitura no citômetro de fluxo, foram considerados TAM em proliferação os eventos CD45⁺F4/80⁺Ki67⁺.

4.8.5. Quantificação de Tregs por Citometria de Fluxo

A presença de Tregs foi mensurada no baço, linfonodo inguinal e tumor no D+14 após inoculação tumoral. Resumidamente, após preparo da suspensão celular simples (descrito em 4.8.1), as células (1x10⁶/tubo) foram adicionadas a anti-CD4 FITC (1 µL, BD Pharmingen) e anti-CD25 Percp (1 µL, BD Pharmingen) e incubadas por 30 minutos a 4° C para marcação dos antígenos de superfície. Após lavagem com tampão de FACS (400 g, 8 min, 4° C), as células foram fixadas foi acrescentado 300 µL de tampão Cytofix/Cytoperm (BD

Cytofix/Cytoperm kit, Pharmingen, BD Biosciences) com incubação por 20 min em temperatura ambiente. Após, foram realizadas duas lavagens com o tampão de permeabilização PermWash (BD Cytofix/Cytoperm kit, Pharmingen, BD Biosciences) diluído 1:10 em PBS. Foi adicionado 1 μ L de anti-Foxp3 PE (eBiosciences) com incubação por 45 min a 4° C. As células foram então lavadas com tampão de FACS e centrifugadas (400 g, 8 min, 4° C), suspendidas em 50 μ L de formol a 1% e levadas ao citômetro de fluxo (FACS Canto, BD Biosciences). Foram considerados Tregs os eventos CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

4.8.6. Análise

Os dados adquiridos foram analisados no programa FCS Express V3 (De Novo Software), com construção de *dots plots* para cada análise realizada. Os eventos foram avaliados de acordo com parâmetros de tamanho (FSC), granularidade (SSC) e fluorescência (FL), permitindo a construção de *gates* (janelas) para cada tipo celular desejado. Os dados foram expressos como porcentagem (número relativo em relação aos eventos totais) ou absolutos (quantidade de células totais).

4.9. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

Para dosagem de citocinas, realizamos experimento com animais naïve, pós-sépticos, apenas tumor ou pós-sépticos com tumor. Os animais foram sacrificados no D+14 da inoculação para coleta de soro, sobrenadante de linfonodo inguinal estimulado e tumor. Foram realizadas dosagem por método imunoenzimático (ELISA) de IL-10, CXCL12, TGF- β , CCL2, TNF- α e IFN- γ (kits Duo Set, R&D Systems). O material sólido (tumor) era adicionado a 400 μ L de PBS, homogeneizado (Polytron), centrifugado (8000 RPM, 15 min, 4° C) e o sobrenadante era coletado para a dosagem. Os linfonodos eram estimulados em cultura com concanavalin-A tipo IV 50 μ g/mL (Sigma) e o sobrenadante era coletado em 72 horas para dosagem de citocinas. Para dosagem de TGF- β , era necessária ativação prévia da amostra com ácido clorídrico (HCl 1 N) 1:5. Após 10 minutos, o material era neutralizado com hidróxido de sódio (NaOH 1,2 N) e HEPES (0,5 M) 1:6 da amostra. Nas amostras de tumor, foi determinada a concentração de proteína total através de teste colorimétrico. Brevemente, 10 μ L de sobrenadante de tumor diluído 1:40 em água Milli-Q era adicionado a 145 μ L de reagente de Bradford e imediatamente lido a 595 nm no espectrofotômetro. A

concentração de proteínas da amostra era determinada baseado nas leituras de curva com concentrações conhecidas.

As placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 100 µl/poço de anticorpo específico anti-IL-10, anti-CXCL12, anti-TGF-β, anti-CCL2, anti-TNF-α e anti-IFN-γ nas concentrações descrita pelo fabricante. Após, eram lavadas com *Wash Buffer* fornecido pelo fabricante. Após, foi adicionado a cada poço 300 µl de *Blocking Buffer* fornecido pelo fabricante e incubado por 1 hora. As amostras e o padrão (curva-padrão) contendo as concentrações adequadas de IL-10 (4000 pg/mL), CXCL12 (2000 pg/mL), TGF-β (1000 pg/mL), CCL2 (1000 pg/mL), TNF-α (1000 pg/mL) e IFN-γ (5000 pg/mL) foram colocados nas placas (50 µl) e incubados *overnight* a 4° C. Após, as placas eram lavadas e adicionado 100 µl/poço dos anticorpos biotinizados com incubação por 2 horas em temperatura ambiente. As placas eram novamente lavadas e era adicionado 100 µl/poço do conjugado estreptavidina-HRP (1:200) com incubação por 20 minutos. As amostras eram lavadas e era adicionado 100 µl/poço de *Substrate Solution*, com incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Após, era adicionado 50 µl/poço de *Stop Solution*. A densidade óptica foi medida a 450 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). A concentração de citocinas contidas nas amostras foi calculada a partir de curva padrão com 12 pontos obtidos por diluição seriada. Os resultados foram expressos em pg/mL (soro ou sobrenadante de linfonodo) ou pg/proteína (tumor).

4.10. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Como método complementar de quantificação e para analisar a disposição espacial dos TAM na massa tumoral de animais previamente submetidos a CLP e naïve, realizamos ensaio de imunofluorescência com marcação para macrófagos. Brevemente, no D+14 da inoculação tumoral, os animais eram sacrificados através de dose excessiva de anestésicos, o tumor era excisado, incluído em forma própria preenchida com Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura) e mergulhado em isopentano (Vetec) a -196° C em banho-maria com nitrogênio líquido. Após o congelamento, os blocos eram cortados em criótomo a 20 µm e os cortes colocados em lâminas StarFrost (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs). O material era então fixado em paraformaldeído 4% (Sigma) por 15 min, exposto a glicina 2% (Sigma) por 1 hora para redução da autofluorescência dos tecidos e ao BSA 2% (Sigma) por 1 hora para bloqueio de ligações inespecíficas. A marcação para TAM era então realizada com anticorpo primário

F4/80 monoclonal de rato anti-camundongo (Caltag laboratories, UK) na diluição 1:50 e incubado *overnight*. No dia seguinte, após lavagem do anticorpo primário com PBS, era adicionado o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 de cabra anti-rato (Life Technologies) na diluição 1:100. Após lavagem com PBS, era adicionado Hoechst 33342 1 µg/mL (Life Technologies) e mantido por 5 minutos. Os conjuntos lâmina-lamínula eram então montados após adição de Fluormount G (Southern Biotech) para preservação da fluorescência. O material era fotografado em microscópio de fluorescência (Leica DMI6000 B, Leica microsystems) até no máximo 3 dias após a marcação. Foi realizada contagem de núcleos, de células F4/80+ e mensuração de área em três campos de cada amostra através do *software* ImageJ 1.44 (National Institutes of Health, EUA). Os resultados foram expressos em quantidade de células por campo ou em densidade celular (núcleos/área), quando apropriado.

4.11. EFEITO DA COINOCULAÇÃO DE B16 COM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS PÓS-SEPSE NA PROGRESSÃO TUMORAL

Para determinar se a coinoculação de macrófagos derivados de medula óssea com células de melanoma B16 pode levar ao aumento da progressão tumoral em animais naïve, realizamos esta série de experimentos. Basicamente, um grupo de animais era submetido a CLP e tratados com ertapenem para indução de sobrevida em torno de 50%. 15 dias após, os animais eram sacrificados, a medula óssea era retirada e os macrófagos diferenciados por 7 dias através de meio específico com sobrenadante de sarcoma L929. Foi usado como controle macrófagos de animais não submetidos a CLP. Em seguida, outros animais eram coinoculados com B16 30 mil por via subcutânea e macrófagos derivados de medula óssea de animais pós-sépticos ou na naïve. A Figura 10 ilustra como foram realizados os experimentos.

Figura 10 - Coinoculação de macrófagos derivados de animais sobreviventes à sepse ou naïve com melanoma B16 em animais naïve. Os animais previamente submetidos à CLP eram sacrificados 14 dias após a cirurgia, tinham sua medula óssea extraída para diferenciação de macrófagos. Macrófagos derivados de medula óssea de animais naïve foram utilizados como controle. Após a coincoculação, os animais eram seguidos para medidas de progressão tumoral e observação de sobrevivência.

4.11.1. Extração de Medula Óssea e Diferenciação de Macrófagos

Após sacrifício dos animais com dose excessiva de anestésicos, os fêmures eram expostos, excisados e a medula óssea era extraída através de *flush* de 10 mL de RPMI incompleto. A medula óssea era colocada em tubo Falcon de 15 mL e homogeneizada através de pipetagem. Era realizada a centrifugação (400 G, 10 min, 4° C). O sobrenadante era descartado e adicionado 5 mL de tampão de lise. As amostras eram novamente centrifugadas (400 G, 10 min, 4° C) e lavadas com RPMI incompleto. Era adicionado 40 mL de meio L929 e plaqueado 10 mL por placa Petri Optilux não tratada para aderência. As placas eram deixadas em estufa a 37° C com atmosfera de CO₂ de 5%. No 3° dia, era acrescentado mais 10 mL de meio L929. No 7° dia, o sobrenadante era descartado, era adicionado 10 mL de PBS 1 X gelado e as células descoladas com auxílio de espalhador de células tipo rodo (*Cell Scraper*, Corning). Os macrófagos eram centrifugados (400 G, 10 min, 4° C) e suspensos em 10 mL de PBS 1 X. Era realizada a contagem em câmara de Neubauer e o volume ajustado para a quantidade desejada de células. De modo a confirmar a coincoculação de macrófagos, foram separadas alíquotas de células para análise morfológica através do preparo

de lâminas por citocentrifugação, além de fenotipagem por citometria de fluxo com marcação para F4/80 e CD206.

4.11.2. Coinoculação

Animais naïve eram submetidos a inoculação simultânea de melanoma B16 (30 mil células) e macrófagos derivados de medula óssea (10 mil células) provenientes de animais naïve ou pós-CLP, por via subcutânea no flanco direito. O volume ajustado final foi padronizado para 200 µL.

4.11.3. Mensuração da progressão tumoral

A mensuração da progressão tumoral foi realizada através de paquímetro e mensuração de bioluminescência, de modo semelhante ao anteriormente descrito.

4.12. ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR E MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS PÓS-SEPSE E NAÏVE

Na intenção de realizar a análise diferencial da expressão gênica de larga escala de TAMs, conduzimos uma série de 3 experimentos com grupos naïve e pós-CLP (n=2-3 por grupo por experimento). Todos os animais receberam inóculo tumoral de 30 mil células B16 no subcutâneo do dorso direito. No D+14 após inoculação tumoral, os animais foram sacrificados e os tumores processados de modo a obter-se a suspensão celular simples, conforme descrito na seção 1.8.1.2. Como controles da análise de expressão gênica e para efeito de comparação, foram utilizados macrófagos derivados de medula óssea (M0) derivados de animais naïve ou CLP15d, assim como macrófagos diferenciados M1 e M2. A Figura 11 abaixo resume os principais passos empregados para extração de TAM.

Figura 11 - Isolamento de macrófagos por gradiente de Percoll 70/30 seguido de adesão em placa por 1 hora. Por meio de gradiente de Percoll 70/30 e adesão por 1 hora, encontramos pureza entre 70-80% para células F4/80⁺. Após, os TAM eram submetidos a isolamento de RNA por coluna.

A seguir, são descritas com detalhe as etapas do processo para obtenção de TAM, Extração de RNA, análise do RNA e análise de expressão gênica.

4.12.1. Isolamento de macrófagos associados ao tumor

Após preparo da suspensão celular simples, as células foram contadas e o volume corrigido para 30 milhões de células. Nos casos em que não havia esta quantidade de células disponíveis, foi utilizada a quantidade máxima encontrada. As células eram centrifugadas (400 g, 8 min, 4° C) para obtenção de *pellet*, o qual era ressuspensionado em Percoll a 30% e colocado cuidadosamente sobre Percoll a 70% e centrifugado para obtenção de gradiente (1800 RPM, 23 min, 4° C). A fração correspondente aos linfomononucleares era então separada, lavada para remoção do Percoll e ressuspensionada em 2 mL de meio RPMI com 1% de soro bovino fetal. As amostras eram então incubadas em placa de 6-well e deixadas em estufa a 37° C. Após 40 minutos, as células não aderentes eram removidas através de vigorosa

lavagem com PBS. As células aderentes eram removidas com auxílio de rodo de células (*cell scraper*).

Na fase de padronização do método, realizamos marcação com anticorpo anti-F4/80-PE (eBiosciences) e confirmamos a pureza por citometria de fluxo, seguindo método previamente descrito. Obtivemos a pureza de aproximadamente 70 a 80% de TAM.

4.12.2. Isolamento de macrófagos derivados de medula óssea e polarização para M1 ou M2

Para efeito de comparação, foram utilizados macrófagos derivados de medula óssea de animais naïve e CLP_{15d} (macrófagos não ativados ou M0). O método para isolamento e diferenciação desses macrófagos já foi descrito na seção 4.11.1. Adicionalmente, macrófagos derivados de medula óssea de animais naïve foram ativados para M1 ou M2, de modo a que pudéssemos comparar de qual extremo do espectro de polarização os macrófagos associados ao tumor e os macrófagos M0 de animais naïve ou CLP_{15d} mais se aproximam. Para a ativação de macrófagos no sentido M1, o meio de cultura de macrófagos (meio L929) era suplementado no 3º dia de cultura com IFN- γ (50 ng/mL) e LPS (10 ng/mL). Para ativação no sentido M2 clássico, macrófagos eram suplementados com IL-10 (20 ng/mL). A polarização era confirmada através de citometria de fluxo, após marcação com anti-F4/80-PE (eBiosciences), anti-MHC classe II-FITC (marcador M1, eBiosciences) e anti-CD206-AF647 (marcador M2, Abd Serotec).

4.12.3. Extração de RNA

Para a extração de RNA total de TAM, foi utilizado kit específico (Zymo Research, RNA MicroPrep, kit R1050, CA, EUA). As amostras foram processadas conforme instrução do fabricante. Brevemente, as células em suspensão eram centrifugadas para obtenção de *pellet* a 400 g, 8 min, 4º C. Após, era adicionado o tampão de lise (*Lysis Buffer*) 100 μ L por amostra, homogenizado no vórtex. Para a purificação do RNA, era adicionado 100 μ L de etanol 100% e transferida a mistura para coluna específica (*Zymo-Spin IC Column*) e centrifugada a 10.000 g por 30 s. Após lavagem com 400 μ L do tampão apropriado (*Wash Buffer*), era realizado tratamento com DNase para prevenir contaminação com DNA. Brevemente, era adicionado diretamente à coluna 50 μ L do preparado de DNase I (5 μ L de

DNase I, 5 µL de DNase I *Reaction Buffer* a 10% e 40 µL de RNA *Wash Buffer*) e deixado incubando em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, era adicionado 400 µL de tampão de preparo (*Prep Buffer*) e novamente centrifugado. Em sequência, eram realizadas duas lavagens com tampão *Wash Buffer*. Após, era realizada nova centrifugação a 16.000 g por 30 s para coleta do RNA em 30 µL de água DNase/RNase *free*.

A concentração de RNA e as frações de absorbância A260/A230 e A260/A280 foram determinadas através do NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). Foram consideradas amostras ideais as que se aproximaram de razões no valor de 2,0. O Apêndice 1 mostra os RNA isolados de cada amostra de TAM, macrófagos M1 ou M2 e MDMO naïve ou CLP_{15d}, com as respectivas concentrações e razões de absorbância. Baseado nas razões de absorbância, 4 amostras de cada grupo foram selecionados para a etapa posterior de preparo. Consta no Apêndice 1 o detalhamento dos RNA que foram selecionados para preparo e análise posterior.

4.12.4. Confeção do cDNA, cRNA, marcação com Cy3, hibridização e preparo das lâminas de *microarray*

A preparação dos RNA para o ensaio de *microarray* foi realizado conforme instrução do fabricante (Agilent Technologies, Santa Clara, California, Estados Unidos). Inicialmente, o volume dos RNA foi corrigido de modo que fossem obtido 100 ng em 1,5 µL (SpeedVac, Savant). A 100 ng de RNA eram adicionados 2 µL da solução “*Spike Mix*” previamente diluída a 1:10000 com o tampão de diluição apropriado (“*Dilution Buffer*”). Adicionalmente, 1,8 µL da solução “*T7 Primer Mix*” (0,8 µL “*T7 Primer*” + 1 µL água nuclease-free) eram acrescidos a cada tubo, sendo desnaturado a 65° C por 10 min, seguido de incubação por 5 min no gelo. Para confecção do cDNA eram adicionados 4,7 µL por tubo de “*cDNA Master Mix*”, preparado nas seguintes proporções: 2 µL de 5x *First Strand Buffer* + 1 µL de 0,1 M DTT + 0,5 µL de 10 mM dNTP *Mix* + 1,2 µL de *Affinity Script RNase Block Mix*. As amostras eram sequencialmente incubadas a 40° C por 2 horas, a 70° C por 15 min e por 5 min no gelo. Para confecção do cRNA marcado com 3-cianina, eram adicionados 6 µL por tubo da solução “*Transcription Master Mix*”, composta nas seguintes proporções: 0,75 µL de água nuclease-free + 3,2 µL de 5x *Transcription Buffer* + 0,6 µL de 0,1 M DTT + 1 µL de NTP *Mix* + 0,21 µL de *T7 RNA Polymerase Blend* + 0,24 µL de *Cyanine 3-CTP*, seguindo-se de incubação a 40° C por 2 horas.

Para purificar o cRNA marcado/amplificado, foi utilizado o *RNeasy Mini kit* (Qiagen, Valencia, California, Estados Unidos). Inicialmente, foram sequencialmente adicionados aos 16 µL de cRNA marcado/amplificado 84 µL de água *nuclease-free*, 350 µL de *Buffer RLT* e 250 µL de etanol 100%. Os 700 µL totais eram então transferidos para uma coluna *RNeasy Mini Spin Column* e centrifugados a 4° C por 30 segundos a 13000 g. Após, a coluna era transferida para um tubo de coleta, sendo adicionados 500 µL de *Buffer RPE* e centrifugado (13000 g, 4° C, 30 s). O cRNA marcado/amplificado era então eluído após adição de 30 µL de água *nuclease-free* e centrifugação (13000 g, 4° C, 30 s). O cRNA marcado/amplificado era quantificado através do NanoVue (GE Healthcare LifeSciences, Salt Lake City, Utah, Estados Unidos). As concentrações do corante cianina-3 (Cy3) (pmol/µL), cRNA (ng/µL) e a razão de absorbância de RNA (260/280 nm) eram registradas. A quantidade total de RNA era determinada através da fórmula:

$$\text{cRNA em } \mu\text{g} = \frac{\text{concentração de cRNA} \times 30 \mu\text{L}}{1000}$$

A atividade específica era determinada através da fórmula:

$$\text{pmol de Cy3 por } \mu\text{g de cRNA} = \frac{\text{concentração de Cy3} \times 1000}{\text{concentração de cRNA}}$$

Foi considerada ótima a atividade específica de pelo menos 6 pmol de Cy3 por µg de cRNA.

Para hibridização do cRNA, era adicionado volume correspondente a 600 ng de cRNA amplificado marcado com Cy3, 5 µL de 10X *Gene Expression Blocking Agent* e água *nuclease-free* q.s.p. 24 µL. Após, era adicionado 1 µL de 25X *Fragmentation Buffer*, deixado incubando por 30 min a 60° C e colocado rapidamente em gelo por 1 min. À amostra de cRNA era então cuidadosamente adicionado 25 µL de 2x *Hi-RPM Hybridization Buffer*, evitando a formação de bolhas, e centrifugado por 1 min a 13000 g. O montante era então cuidadosamente pipetado nas lâminas de *microarray* (SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60K *Microarray*, G4852A, Agilent Technologies, Lâmina 1: 252800516673, Lâmina 2: 252800516674, Lâmina 3: 252800516788), que eram então fechadas e colocadas em câmara específica (Agilent Microarray Hybridization Chambers, Agilent Technologies) a 65° C, com rotação 10 g, por 17 horas, para assegurar correta hibridização. A posição na lâmina de cada

amostra foi determinada após dois sorteios aleatórios, de modo a evitar viés de posicionamento. Após o período de hibridização, foram realizadas lavagens sequenciais com os tampões *Gene Expression Wash Buffer 1* e *Gene Expression Wash Buffer 2*. As lâminas de *microarray* eram então escaneadas (G4900DA SureScan Microarray Scanner, Agilent Technologies) e os dados extraídos através do Agilent Feature Extraction Software (Agilent Technologies).

4.12.5. Análise da expressão gênica por *microarray*

Os dados gerados no *microarray* foram analisados utilizando pacotes de dados da ferramenta *open source Bioconductor 3.0* (<http://www.bioconductor.org/>). Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa R (versão 3.1.1) (SMYTH, 2005). A correção do *background* eliminou o ruído basal do experimento e a normalização dos dados foi realizada de forma que todas as amostras apresentassem o mesmo desvio absoluto médio, pelo método de *quantile*. A normalização por *quantile* e baseada no desvio da media aritmética e faz com que duas distribuições se tornem idênticas, do ponto de vista estatístico. Uma amostra do grupo TAM naïve foi considerada *outlier*, tendo sido excluída das análises, pela baixa quantidade e má qualidade do RNA extraído. Foram realizadas comparações da expressão gênica global através da ferramenta *Principal Component Analysis* (PCA) entre todos os grupos estudados. Posteriormente, *Volcano Plots* de comparações entre os grupos TAM naïve e TAM pós-sepse foram construídos, exemplificando alterações em maior escala entre os grupos. Uma lista de genes considerados diferencialmente expressos foi montada a partir de variação (*fold*) de 0,58 para genes com expressão aumentada (*up-regulated*) e -0,58 para genes com expressão reduzida (*down-regulated*) e $p < 0,01$. Os genes diferencialmente expressos foram analisados através de recursos de análise de vias moleculares fornecidos pelo NextBio (<http://www.nextbio.com>). Foram elaborados *heat maps* com clusterização hierarquizada para apresentação dos dados. Todos os dados foram depositados para acesso público no banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO). O código para acesso é GSE64498.

4.13. ENSAIOS *IN VITRO*

Macrófagos derivados de medula óssea (MDMO), isolados conforme método previamente descrito, foram deixados em cultura com meio RPMI suplementado com 1% de SBF. Após, 24 horas, os meios condicionados (MC) eram coletados e estocados a -80° C.

A fim de determinar o efeito do MC de 24 h de MDMO de animais sobreviventes à sepse e naïves em culturas de melanoma B16, realizamos uma série de experimentos *in vitro*, a seguir descritos:

4.13.1. Proliferação celular

Para avaliação da proliferação, realizamos ensaio para tempo de duplicação celular. Brevemente, 10⁴ B16 era incubada em placa de 6-well com MC de MDMO suplementado com SBF 10%. Após 33 horas, as células eram tripsinizadas e contadas em microscópio óptico (Zeiss) para determinação da quantidade total de células. O tempo de duplicação celular foi calculado conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Tempo de duplicação celular} = \frac{\text{tempo de cultura em horas}}{3,3 \left[\log_{10} \frac{\text{número inicial de células}}{\text{número final de células}} \right]}$$

Os experimentos foram realizados duas vezes e em triplicata experimental. Os resultados foram expressos como a média do tempo de duplicação celular.

4.13.2. Ensaio de cicatrização

A fim de avaliar se MC de MDMO de animais naïve ou CLP alteram o potencial de migração de células B16, realizamos ensaio de cicatrização (*scratch assay*), conforme previamente descrito (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Anteriormente, placas de 6-well foram submetidas a *coat* com fibronectina (3μL/cm², Sigma). 10⁶ células B16/poço foram incubados por 12 horas em meio RPMI completo. Após esse período, foi realizada uma falha longitudinal no tapete de células e as células soltas foram lavadas com PBS (tempo 0). MC de MDMO (suplementado com SBF 1% para evitar proliferação celular) de animais naïve ou pós-CLP foi então adicionado às culturas e deixado incubando por 16 horas. As placas foram fotografadas no tempo 0 e no tempo 16 horas e mensurada a distância entre os bordos em três

campos previamente determinados (cinco medidas por campo). A migração celular foi mensurada através da fórmula:

$$\text{Migração} = \frac{\text{distância inicial} - \text{distância final}}{2}$$

4.14. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA CXCR4/CXCL12 NA PROGRESSÃO TUMORAL EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE

A fim de determinar a participação da via CXCR4/CXCL12 na progressão tumoral de animais sobreviventes à sepse, realizamos novo grupo de experimentos. Brevemente, os animais foram submetidos à CLP, tratados com antibióticos (ertapenem 20 mg/kg 12/12 h, i.p. 7 doses) e os sobreviventes foram inoculados com B16 30 mil células por via subcutânea. No D+10 e D+15 da inoculação, os animais receberam AMD3100 (Sigma, 5 mg/kg, i.p.) ou salina como controle. O AMD3100 (plexirafor) é uma antagonista específico do receptor CXCR4, antagonizando as ações biológicas do seu ligante, a quimiocina CXCL12 (ZOU, 2005). Dessa forma, foi avaliada a progressão tumoral (através de paquímetro) e sobrevida nos seguintes grupos: naïve + salina, naïve + AMD3100, CLP_{15d} + salina e CLP_{15d} + AMD3100 (Figura 12).

Figura 12 - Inibição do eixo CXCR4/CXCL12 por AMD3100. Animais pós-CLP ou naïve receberam AMD3100 (5 mg/kg, i.p.) no D+10 e D+15 da inoculação. Progressão tumoral e sobrevida foram mensuradas.

Outro conjunto de experimentos foi realizado para determinar se a inibição do CXCR4 poderia alterar o padrão de aumento de TAM e/ou Tregs em tumores de animais pós-CLP. Sendo assim, foram avaliados os grupos: naïve sem tumor, naïve com tumor + salina, naïve,

com tumor + AMD3100, CLP_{15d} sem tumor, CLP_{15d} com tumor + salina e CLP_{15d} + AMD3100. Os animais dos grupos “com tumor” receberam 30 mil células por via subcutânea. Os animais dos grupos que receberam AMD3100 tiveram a droga administrada no D+10 da inoculação. Todos foram sacrificados no D+15 da inoculação, para coleta de baço, linfonodo inguinal de drenagem e tumor, a fim de quantificar a presença de Tregs (baço, linfonodos e tumor) e TAM (tumor), conforme metodologia previamente detalhada. Adicionalmente, foi realizada mensuração de TAM com expressão de CXCR4⁺ e de TAM Ki67⁺ (proliferação extramedular), conforme previamente descrito (Figura 13).

Figura 13 - Avaliação de alterações em TAM e Tregs após inibição de CXCR4/CXCL12 por através de AMD3100. Animais receberam AMD3100 (5 mg/kg, i.p.) no D+10 e foram sacrificados no D+15 para análise de TAM no microambiente tumoral e Tregs no baço e linfonodos.

4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com através do *software* GraphPad Prism 5.0. Quanto observada distribuição normal dos dados amostrais, os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão médio. Em casos que a distribuição não era normal, utilizou-se a mediana como medida de tendência central. Para as análises de curva de crescimento tumoral foi utilizado o teste ANOVA de duas vias e o pós-teste de Bonferroni quando apropriado. Para comparação entre variáveis quantitativas foi realizado o teste t de Student (se 2 grupos)

ou ANOVA seguido de Bonferroni (se três ou mais grupos). Nas análises de sobrevida, os dados foram expressos através de curvas de Kaplan Meier e analisados pelo teste de Log rank. Quando tratavam-se de variáveis qualitativas, os dados foram expressos em tabelas de contingência e foi utilizado o teste de Fisher. Foram considerados significantes valores $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. MODELO DE SEPSE E MODELO DE PÓS-SEPSE

Inicialmente, padronizamos o modelo de sepse por CLP. Confirmamos que a transfixação (dois orifícios nas paredes anterior e posterior do ceco) com agulha 18G levou a “CLP letal”, com 100% de mortalidade em dois dias, falência de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, migração de polimorfonucleares para o pulmão, presença de bacteremia e de bactérias na cavidade peritoneal. Verificamos também que três punções com agulha 24G levou a “CLP não letal”, ou seja, sem mortalidade, com migração efetiva de neutrófilos para a cavidade peritoneal e ausência de bactérias no sangue e no lavado peritoneal (Figura 14).

Figura 14 - Padronização do Modelo de sepse por CLP. (A) Animais submetidos à CLP com agulha 18G apresentaram sepse letal (CLP-L), enquanto os submetidos à CLP com agulha 24G apresentaram sepse não letal (CLP-NL). (B) CLP-L foi associada à falência de migração de neutrófilos para o foco infeccioso e (C) migração de células de origem mielóide para o pulmão. (D) Animais submetidos à CLP-L tiveram a *clearance* de bactérias prejudicado no lavado peritoneal e no (E) sangue. n=8 por grupo. Os dados são expressos como curva de Kaplan-Meier (A), média ± S.E.M. (B e C) ou mediana (D e E) e analisados pelo teste de Log-rank (A) e ANOVA seguido por Bonferroni (B, C, D e E). * significa p < 0,05.

Posteriormente, padronizamos o modelo de sobreviventes à sepse (doravante denominado pós-sepse). Os animais foram submetidos a “CLP letal” e tratados com ertapenem (20 mg/kg, i.p.) 6 horas após a cirurgia e de 12/12 h por 3 dias. Dessa forma, conseguimos obter uma sobrevida duradoura aproximada de 40 a 50% dos animais (Figura 15, Painel A). De modo a confirmar a imunossupressão ocorrida no pós-sepse, instilamos *Legionella pneumophila* (1×10^7) por via nasal. Observamos que 100% dos animais pós-CLP inoculados evoluíram a óbito nos primeiros cinco dias (Figura 15, Painel B).

Figura 15 - Padronização do Modelo de Pós-sepse. (A) Animais submetidos à sepse letal (CLP-L) tratados com o antibiótico ertapenem (20 mg/kg, i.p.) 6 horas após o procedimento e de 12 em 12 horas por 3 dias apresentam sobrevida em torno de 40-50%. (B) Animais sobreviventes (pós-sepse) quando desafiados com inóculo não letal de *Legionella pneumophila* (1×10^7 , intranasal) evoluem a óbito em 5 dias, mostrando possível imunossupressão. $n=8$ por grupo. Os dados são expressos como curva de Kaplan-Meier, analisados pelo teste de Log-rank.

5.2. CAMUDONGOS SOBREVIVENTES À SEPSE APRESENTARAM MAIOR PROGRESSÃO TUMORAL EM COMPARAÇÃO AOS NAÍVE

Animais naíve ou sobreviventes de sepse (pós-sepse) foram inoculados no 15º dia após a CLP com células de melanoma B16-F10-luc por via subcutânea no dorso direito, com diferentes quantidades de células (doravante denominadas inóculos tumorais), e a formação de tumores foi sequencialmente avaliada por meio de medição com paquímetro ou sinal bioluminescente. A Figura 16 mostra que houve aumento da progressão tumoral nos animais pós-sepse quando foram inoculados com 100 mil células. Apesar de as curvas de crescimento

já se separarem a partir do 15º dia, as diferenças quanto ao volume tumoral e quanto à intensidade de bioluminescência foram significativas apenas no D+21.

Figura 16 - Aumento da progressão tumoral pós-sepse com inóculo tumoral de 100 mil células. (A) Animais pós-sepse apresentaram maior volume tumoral (A) e sinal bioluminescente (B) em comparação com animais. n=8-10 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados semelhantes. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste *two-way* ANOVA seguido por Bonferroni. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Abaixo, a Figura 17 mostra que o efeito foi semelhante quando inoculadas 30 mil células. As curvas de crescimento separaram-se a partir do D+14, porém diferenças importantes são notadas apenas a partir do D+24 (Figura 17, Painel A) e D+21 (Figura 17, Painel B).

Figura 17 - Aumento da progressão tumoral pós-sepse com inóculo tumoral de 30 mil células. (A) Animais pós-sepse apresentaram maior volume tumoral (A) e sinal bioluminescente (B) em comparação com animais. (C) Imagens da captura da bioluminescência representativas de cada grupo. n=8-10 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados semelhantes e o experimento mostrado em (A) foi repetido três vezes com resultados semelhantes. Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. e analisados pelo teste *two-way* ANOVA seguido por Bonferroni. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Da mesma forma, houve aumento de progressão tumoral em animais pós-CLP em comparação aos naïve quando inoculados com 10 mil células (Figura 18), sendo o efeito ainda mais evidente, haja vista o pequeno volume tumoral no grupo naïve (controle).

Figura 18 - Aumento da progressão tumoral pós-sepse com inóculo tumoral de 10 mil células. (A) Animais pós-sepse apresentaram maior volume tumoral (A) e sinal bioluminescente (B) em comparação com animais. O efeito é ainda mais evidente do que quando utilizado inóculos maiores. (C) Imagens da captura da bioluminescência representativas de cada grupo. n=8-10 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados semelhantes. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste *two-way* ANOVA seguido por Bonferroni. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A análise de sobrevivência mostrou que ocorre aumento de mortalidade em animais pós-sépticos em comparação aos controles, quando foram utilizados inóculos tumorais de 30 mil e 10 mil células. Não houve diferença significativa no inóculo tumoral de 100 mil células (Figura 19).

Figura 19 - Redução de sobrevida em animais pós-sépticos inoculados com melanoma B16. Não observamos redução de sobrevida em animais inoculados com (A) 100 mil ($n=5$ por grupo). Entretanto, quando o inóculo tumoral foi reduzido para (B) 30 mil células ($n=17$, grupo CLP + B16 e $n=19$, grupo apenas B16) e (C) 10 mil células ($n=5$ por grupo), o grupo pós-CLP com tumor apresentou menor sobrevida que o grupo apenas B16. Os dados são expressos como curva de Kaplan-Meier e analisados pelo teste de Log-rank.

De modo a tentar determinar qual o menor número de células capaz de induzir tumor em animais pós-sepse, realizamos experimentos adicionais com administração subcutânea de 1 mil células e 100 células. Observamos que quando inoculadas 1 mil células ou 100 células, o crescimento tumoral foi errático e não seguiu um padrão reprodutível em experimentos subsequentes para confirmação (dados não mostrados). Sendo assim, consideramos ser 10 mil células B16 o menor número de células capaz de induzir tumor em animais pós-sepse e naïve com adequado grau de reprodutibilidade.

Avaliamos ainda se houve aumento da frequência da pega tumoral em animais sobreviventes de sepse, de acordo com as diferentes quantidades de células utilizadas. A Tabela 1 mostra que 100% dos animais inoculados com 100 mil células ou 30 mil células

desenvolvem tumores palpáveis, independentemente do grupo ao qual pertence. Entretanto, mostramos que, quando inocula-se 10 mil células, a fração de animais que desenvolve tumor é maior em animais pós-sepse (80%) em comparação aos controle (40%).

Tabela 1 - Análise da Pega Tumoral no D+42

Inóculo	Grupo	Com Tumor	Sem Tumor	p*
100 mil	naïve	10/10 (100%)	0/10	-
	CLP _{15d}	10/10 (100%)	0/10	
30 mil	naïve	10/10 (100%)	0/10	-
	CLP _{15d}	10/10 (100%)	0/10	
10 mil	naïve	8/20 (40%)	12/20	0,0225
	CLP _{15d}	16/20 (80%)	4/20	

* teste exato de Fisher.

Adicionalmente, mostramos que o efeito pró-tumoral em animais pós-CLP foi duradouro, ocorrendo aumento de progressão tumoral e redução de sobrevida após 30 dias (Figura 20, Painéis A e B, CLP_{30d}) e 60 dias (Figura 20, Painéis C e D, CLP_{60d}) da CLP.

Figura 20 - Aumento de progressão tumoral e redução de sobrevivência em animais inoculados com células B16 30 e 60 dias após sepse. Sepse foi induzida por CLP e os animais foram inoculados 30 (A e B) ou 60 dias (C e D) após sepse. Observamos importante aumento de progressão tumoral, assim como redução de sobrevivência. n=7 por grupo. Os experimentos foram repetidos uma vez com resultados semelhantes. (A e C) Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. e analisados pelo teste *two-way* ANOVA seguido de Bonferroni. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (B e D) Os dados são expressos como curva de Kaplan-Meier e analisados pelo teste de Log-rank.

Tomados em conjunto, nossos dados mostram que ocorre aumento de progressão tumoral em animais sobreviventes à sepse. Observamos que o inóculo tumoral de 30 mil células é o mais adequado para ser definido como inóculo tumoral padrão para os experimentos seguintes nos animais sobreviventes à sepse, haja vista ocorrer importante aumento de progressão tumoral, redução de sobrevivência e pega tumoral em 100% dos animais recipientes. No D+14 não observamos diferenças significantes no volume tumoral nos grupos estudados. Tendo isso em vista, ajustamos o D+14 como o tempo escolhido para a maior parte das avaliações de microambiente tumoral.

5.3. AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS TUMORAIS (NECROSE E HEMORRAGIA)

Tumores primários de animais sobreviventes de sepse (CLP_{15d}) e controles inoculados com 30 mil células foram excisados no D+21 da inoculação. Lâminas foram confeccionadas e coradas com hematoxilina-eosina (Figura 21). A Tabela 2 abaixo mostra que, apesar das diferenças de tamanho dos tumores primários, não notamos diferença perceptíveis nos parâmetros avaliados (presença de necrose ou hemorragia).

Figura 21 - Cortes histológicos de tumor primário no D+21. Secção de tumor primário de animal naïve (A) e CLP_{15d} (B). Nota-se áreas de necrose e de hemorragia nas duas secções. Notar em (B) a invasão de tecido muscular, indicando a maior progressão tumoral em animais sobreviventes da sepse. Aumento de 100X, Escala de 100 μ m.

Tabela 2 - Análise de alterações histológicas em lâminas de melanoma B16 no D+14 (inóculo tumoral de 30 mil células)

Grupo	naïve	CLP _{15d}	p*
Necrose	6/10 (60%)	9/10 (90%)	0,3
Hemorragia	3/10 (30%)	7/10 (70%)	0,17

*teste de Fisher

5.4. O ESTADO PÓS-SEPSE RESULTARAM EM MAIOR CARGA TUMORAL DE METÁSTASES

Avaliamos a ocorrência de metástases espontâneas no D+21 após inoculação subcutânea de 30 mil células B16 em animais pós-sepse e controles. A Tabela 3 mostra que ocorreram metástases espontâneas pulmonares, hepáticas e cerebrais, mas não linfáticas. Não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos pós-sepse e naïve na frequência de metástases espontâneas para cérebro, fígado, linfonodos inguinais, pulmão (embolia vascular) e pulmão (parênquima).

Tabela 3 – Análise da presença de metástases microscópicas por animal no D+21 (inóculo tumoral de 30 mil células)

Órgão	naïve	Pós-sepse (CLP_{15d})	p*
Pulmão (embolia vascular)	2/9 (22%)	3/15 (20%)	1,0
Pulmão (parênquima)	0/9 (0%)	3/15 (20%)	0,26
Fígado	0/9 (0%)	1/15 (6%)	1,0
Cérebro	1/9 (11,1%)	0/15 (0%)	0,37
Linfonodo	0/9 (0%)	0/15 (0%)	1,0
Todos	3/9 (33,3%)	7/15 (46,6%)	0,67

* teste exato de Fisher.

Por outro lado, detectamos maior quantidade de nódulos pulmonares malignos através da contagem de pontos enegrecidos na superfície pulmonar nos animais sobreviventes de sepse no D+21 da inoculação (Figura 22). As lesões observadas foram confirmadas como metástases através análise histopatológica (Figura 22, Painéis B e C). Ou seja, apesar de aparentemente não modificar a frequência de lesões metastáticas nos órgãos avaliados (Tabela 3), o estado pós-sepse culmina em maior número de metástases no pulmão.

Figura 22 - Aumento da quantidade de lesões metastáticas espontâneas pulmonares em animais previamente submetidos a CLP. (A) Observamos aumento da quantidade de lesões metastáticas macroscópicas espontâneas no D+21 em animais pós-sépticos (n=11) em comparação aos animais controle (n=8) inoculados com 30 mil células B16. As metástases foram confirmadas por análise histopatológica. Imagens representativas de animais (B) naïve e (C) pós-CLP. Aumento de 100X, Escala de 100 µm. Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. e analisados pelo teste t de Student. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

Adicionalmente, realizamos ensaio de mortalidade provocada por metástases espontâneas. Para tanto, os animais foram inoculados com B16 (30 mil células) por via subcutânea e no D+14 foi realizada a completa exérese do tumor primário. A mortalidade que se seguiu nesses animais foi então atribuída a presença de metástases espontâneas ocorridas antes da exérese do tumor (até o D+14).

Observamos que animais pós-sepse apresentaram mortalidade mais precoce em decorrência de metástases espontâneas em comparação aos animais naïve (Figura 23). Apenas um animal do grupo CLP15d apresentou recrudescimento local da neoplasia e foi excluído das análises.

Figura 23 - Aumento de mortalidade por metástases espontâneas em animais pós-CLP. Observamos aumento de mortalidade por metástases espontâneas em animais pós-CLP em comparação a animais naïve. Neste ensaio, os animais foram inoculados por via subcutânea com 30 mil células B16. No D+14 após inoculação, os tumores primários foram cirurgicamente removidos e os animais observados diariamente para verificação de sobrevida. n=6 por grupo. Os dados são expressos como curva de Kaplan-Meier e analisados pelo teste de Log-rank.

Adicionalmente, detectamos aumento da colonização pulmonar por melanoma B16 no D+18 após infusão intravenosa de 30 mil células B16. A Figura 24 mostra que houve maior intensidade de sinal bioluminescente *ex vivo* nos pulmões de animais pós-sepse em comparação aos naïve.

Figura 24 - Aumento da carga tumoral nos pulmões de animais pós-CLP em ensaio de colonização pulmonar. (A) Realizamos ensaio de colonização pulmonar através da inoculação i.v. de 30 mil células B16 e análise *ex vivo* dos pulmões no D+18 por bioluminescência. Os animais do grupo CLP apresentaram maior carga tumoral (n=5) em comparação aos naïve (n=4). As lesões foram confirmadas por análise histopatológica. O experimento foi repetido uma vez com resultados semelhantes. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste t de Student. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

5.5. TUMORES DE ANIMAIS PÓS-SEPSE APRESENTARAM MAIOR INFILTRAÇÃO POR LEUCÓCITOS TOTAIS

Passamos a investigar se o estado pós-sepse pode acarretar alterações significativas no microambiente tumoral, que possam ser responsáveis pelos fenótipos observados. Verificamos que ocorreu uma tendência ao aumento relativo da infiltração por leucócitos

totais (células CD45⁺) relativa ao número de eventos adquiridos da suspensão celular tumoral de animais pós-CLP inoculados com 30 mil células B16 no D+14 (Figura 25, Painel A). Ocorre, porém, aumento absoluto na infiltração por leucócitos totais em tumores B16 de animais pós-sepse (Figura 25, Painel B).

Figura 25 - Acúmulo de leucócitos totais (células CD45⁺) no microambiente tumoral de animais pós-sepse no D+14. (A) Não observamos aumento significativo nas quantidades leucócitos totais relativas ao número de eventos adquiridos da suspensão celular tumoral. (B) Ocorre porém evidente aumento absoluto nas quantidades de células CD45⁺ nos animais pós-CLP em comparação aos controles. n=8 por grupo. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste t de Student. * significa p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 em relação ao grupo controle.

5.6. AUMENTO DE CÉLULAS T REGULADORAS NO BAÇO E LINFONODO, MAS NÃO NO MICROAMBIENTE TUMORAL DE ANIMAIS PÓS-SEPSE PORTADORES DE TUMOR

Tendo em vista os resultados do estudo realizado por Cavassani e colaboradores (2010) sugerindo a participação de Tregs do pós-sepse na progressão tumoral de carcinoma de Lewis heterotópico (CAVASSANI et al., 2010), passamos a investigar se poderia ocorrer aumento de Tregs no macroambiente ou microambiente tumoral no nosso modelo.

A Figura 26 mostra que ocorre aumento de Tregs no baço de animais previamente submetidos a CLP sem tumor e naqueles portadores de tumor não previamente submetidos à sepse, em comparação a animais naïve sem tumor. Entretanto, observamos no D+14 acúmulo ainda mais intenso de Tregs no baço de animais previamente sépticos e portadores de tumor,

em comparação aos grupos anteriores. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes (Figura 26, Painéis A e B).

Figura 26 - Aumento de Tregs no baço de animais previamente submetidos a CLP inoculados com B16.(A) Observamos aumento de Tregs no baço de animais previamente submetidos a CLP e de animais controle portadores de tumor (D+14) em comparação aos naïve não portadores de tumor. Verificamos que ocorre maior acúmulo de Tregs em animais pós-CLP portadores de tumor em comparação aos demais grupos. (B) *Dots plots* representativos de cada grupo. n=6-8 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni. * significa $p < 0,05$ em relação ao grupo naïve sem tumor. # significa $p < 0,05$ em relação ao grupo naïve com tumor e CLP sem tumor.

Adicionalmente, avaliamos a presença de Tregs em linfonodos inguinais ipsilaterais (LNI) ao tumor (lado direito). Observamos que ocorreu aumento de Tregs nos LNI de animais pós-CLP não portadores de tumor e em animais portadores de tumor não previamente submetidos a CLP, em comparação a animais naïve não portadores de tumor. Houve uma tendência a detectar-se um maior número de Tregs nos LNI de animais pós-CLP portadores de tumor (Figura 27, Painéis A e B).

Figura 27 - Aumento de Tregs nos linfonodos inguinais ipsilaterais (LNI) ao tumor em animais pós-CLP inoculados com B16. (A) Observamos aumento de Tregs nos LNI de animais previamente submetidos a CLP e de animais controle portadores de tumor (D+14) em comparação aos naïve não portadores de tumor. (B) *Dots plots* representativos de cada grupo. n=6-8 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni. * significa $p < 0,05$ em relação ao grupo naïve sem tumor.

Por outro lado, não observamos variação significativa de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ mensuradas por citometria de fluxo no microambiente tumoral, tendo havido grande variação entre os indivíduos estudados (Figura 28, Painéis A e B).

Figura 28 - Análise da infiltração por Tregs no microambiente tumoral de animais pós-CLP inoculados com B16. (A) Observamos que não ocorreu aumento da infiltração por Tregs no microambiente tumoral de animais previamente submetidos a CLP em comparação a animais naïve, no D+14 da inoculação. (B) *Dots plots* representativos de cada grupo. n=6-8 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

5.7. ACÚMULO PRECOCE DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR NO MICROAMBIENTE TUMORAL DE ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE

Passamos posteriormente a investigação de possíveis alterações nos macrófagos associados ao tumor, haja vista a grande importância desse subtipo celular no estabelecimento de neoplasias. Nossa hipótese era haveria uma maior infiltração por ou alterações na polarização dos macrófagos nos tumores de animais pós-CLP.

Observamos que ocorre importante aumento relativo (Figura 29, painel A e B) e absoluto de TAM (Figura 16, painel C) no D+14 de tumores de animais sobreviventes à sepse, em comparação com os naïve. O aumento relativo foi da ordem de aproximadamente 100%. Verificamos que a quase totalidade dos macrófagos marcados (F4/80⁺) apresentaram marcação para receptor de manose (CD206⁺), mostrando um perfil de ativação mais voltado para a polarização M2 (Figura 29, Painel D), compatível com o fenótipo esperado para TAM.

Figura 29 - Acúmulo de TAM no microambiente tumoral no D+14 em animais pós-sépticos. Observamos aumento relativo de (A) células F4/80⁺, (B) F4/80⁺CD206⁺ e (C) absoluto de células F4/80⁺CD206⁺ no D+14 da inoculação de B16 em animais pós-CLP, em comparação a animais naïve (D) *Dots plots* representativos do D+14. n=8 por grupo. O experimento foi repetido duas vezes com resultados equivalentes. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste t de Student. * significa p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 em relação ao grupo controle.

Adicionalmente, mostramos que a diferença relativa na infiltração por TAM não foi detectada em tumores com maior volume (no D+21 da inoculação) (Figura 30, painéis A e B). Entretanto, em termos absolutos, há uma quantidade maior de macrófagos nesse período (Figura 30, Painel C).

Figura 30 - Acúmulo de TAM no microambiente tumoral no D+21 em animais pós-sépticos. Não observamos aumento relativo de (A) células F4/80⁺ e (B) F4/80⁺CD206⁺ de células F4/80⁺CD206⁺ no microambiente tumoral de animais pós-CLP em comparação a animais naïve. (C) Importante aumento em termos absolutos de TAM no microambiente tumoral de animais pós-CLP. (D) *Dots plots* representativos do D+21. n=8 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste t de Student. * significa p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 em relação ao grupo controle.

Como meio de confirmar nossos achados, procedemos a novos experimentos para quantificação de TAM por citometria de fluxo de células CD45⁺F4/80⁺CD206⁺ no D+14 da inoculação de B16 30 mil células. Quando analisados na *Gate* para CD45⁺, mantém-se a observação de aumento relativo (Figura 31, Painel A) e absoluto (Figura 31, Painel B) de TAM (F4/80⁺CD206⁺).

Figura 31 - Acúmulo de TAM no microambiente tumoral no D+14 em animais pós-sépticos, gate CD45⁺. Observamos aumento (A) relativo e (B) absoluto de macrófagos associados ao tumor (F4/80⁺CD206⁺) em animais sobreviventes à sepse inoculados com 30 mil células B16, quando analisados na gate CD45⁺. (C) *Dots plots* representativos. n=8 por grupo. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste t de Student. * significa p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 em relação ao grupo controle.

De modo a confirmar o aumento e avaliar a disposição espacial de TAM nos tumores de animais pós-CLP e controles, realizamos ensaios de imunofluorescência com marcação para células F4/80⁺ no D+14 da inoculação de 30 mil células B16. A Figura 32 mostra claramente aumento da infiltração por TAM nos tumores de animais pós-CLP em comparação aos naïve. Não notamos diferenças na disposição espacial de TAM entre os dois grupos estudados.

Figura 32 - Imunofluorescência para TAM mostrando aumento de infiltração nos tumores de animais sobreviventes à sepse. (A) Animais CLP_{15d} no D+14 de inoculação com 30 mil células B16 apresentaram aumento de infiltração por TAM em comparação com animais naïve. (B) Maior aumento (aumento de 400X, escala 50 μ m) com detalhe da marcação para células F4/80⁺ (macrófagos tumorais). As setas brancas apontam para dois TAM. Imagens representativas no menor aumento (aumento de 100X, escala 200 μ m) de (C e E) tumores de controles naïves e (D e F) pós-CLP. Em azul: Hoechst 33342. Em verde: F4/80⁺. Pós-CLP (n=5) e naïve (n=9). O experimento foi repetido duas vezes com resultados semelhantes. Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. e analisados pelo teste t de Student. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.8. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR

TAM derivados de animais naïve e pós-sepse foram isolados para análise de expressão gênica e comparação com macrófagos derivados de medula óssea de animais naïve e pós-sepse, assim como de macrófagos polarizados no sentido M1 e M2. Após normalização dos dados, uma amostra de TAM naïve foi considerada *outlier* em comparação aos demais, tendo sido excluída das análises.

A análise comparativa de expressão gênica global entre os grupos, através da ferramenta *Principal Component Analysis* (PCA), revelou uma maior proximidade de macrófagos M0 derivados de animais pós-sepse com macrófagos polarizados M2. Adicionalmente, fica claro nessa análise que as diferenças de expressão gênica entre TAM naïve e TAM pós-sepse foram bastante discretas (Figura 33).

Figura 33 - Comparação da análise de expressão gênica global entre M0 naïve, M0 pós-sepse, M1, M2, TAM naïve e TAM pós-sepse através de *Principal Component Analysis* (PCA). Verificamos que as diferenças entre TAM naïve e TAM pós-sepse foram bastante tênues, não se permitindo inferir maiores detalhes através desta análise.

A comparação entre TAM naïve e TAM pós-sepse mostrou grande semelhança entre os grupos, tendo sido identificados 61 genes hiperexpressos (*up-regulated*) e 98 hipoexpressos (*down-regulated*). Foram considerados genes com diferenças que produziram mudanças de expressão (*fold*) para *up* de 0,58, enquanto para *down* de -0,58 e $p < 0,01$ (Apêndice 10.3). O *Volcano Plot* mostrando os genes diferencialmente expressos está mostrado na Figura 34.

Figura 34 - *Volcano Plot* com genes diferencialmente expressos na comparação entre TAM de animais pós-sepse e TAM de animais naïve. O gráfico mostra a distribuição da Variação (*fold*) da Expressão Gênica pela significância (p corrigido). Foram considerados mudanças da expressão (*fold*) de 0,58 para genes hiperexpressos e de -0,58 para genes hipoexpressos associados à $p < 0,01$. Em vermelho: genes hiperexpressos (*up*). Em verde: genes hipoexpressos (*down*). Em azul: ausência de variação. O formato do ponto gráfico mostra o tipo de gene estudado. Em cruz: mRNAs. Em quadrado: RNA longo não-codificante (lncRNAs, do inglês *long non coding* RNAs). Em círculo: genes controles. Em triângulo: genes de funções não conhecidas (UNK, do inglês *unknown*).

Com auxílio da ferramenta *Nextbio* (<http://www.nextbio.com>), grupos de genes relacionados a vias e mecanismos foram identificados e agrupados. Foram selecionados genes que pudessem representar e explicar funções biológicas específicas.

A Tabela 4 mostra a comparação da expressão de genes relacionados à ativação de leucócitos.

Tabela 4 - Comparação entre expressão gênica de TAM pós-sepse com TAM naïve - genes relacionados à ativação de leucócitos.

Gene	<i>Fold Change</i>	Expressão em TAM pós-sepse
Cd2	-2,9	Reduzida
Ccr7	-2,7	Reduzida
Cd24a	-2,1	Reduzida
Cd74	-1,8	Reduzida
Cd86	-1,8	Reduzida
Satb1	-1,7	Reduzida
H2-Ab1	-1,7	Reduzida
Selplg	-1,7	Reduzida
Cd3d	-1,6	Reduzida
H2-Ab1	-1,6	Reduzida
Cxcr4	-1,6	Reduzida
Itk	-1,5	Reduzida
Il2rb	-1,5	Reduzida
Ccl5	-1,4	Reduzida
Zap70	-1,2	Reduzida
Fzd9	1,13	Aumentada
Lat	-1,06	Reduzida
Exo1	0,8	Aumentada
Flt3	-0,8	Reduzida

Evidenciamos também uma redução global da expressão de genes codificadores de proteínas relacionadas ao complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC-II) nos TAM derivados de animais pós-sepse. Isso também reforça seu possível maior direcionamento no sentido de polarização M2 (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação entre expressão gênica de TAM pós-sepse com TAM naïve - genes relacionados ao complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC-II)

Gene	<i>Fold Change</i>	Expressão em TAM pós-sepse
H2-Ab1	-1,7	Reduzida
H2-DMb1	-2,1	Reduzida
Cd74	-1,8	Reduzida
H2-Eb1	-1,8	Reduzida
H2-Ob	-1,6	Reduzida

O *Heat map* exposto na Figura 35 mostra essas alterações, comparando os níveis de expressão gênica com os demais grupos (M0 naïve, M0 pós-sepse, M1 e M2). A Figura 36 detalha a comparação entre TAM naïve e TAM pós-sepse.

Figura 35 - Heat map de todos os grupos analisados (TAM naïve, TAM pós-sepse, M0 naïve, M0 pós-sepse, M1 e M2) com genes relacionados à ativação leucocitária, citocinas e angiogênese. Em laranja, estão genes discriminados genes relacionados à citocinas e quimiocinas que estavam diferencialmente expressos entre os grupos. Em roxo, genes relacionados à ativação leucocitária. Em cinza, genes relacionados à angiogênese.

Figura 36 - Heat map dos grupos TAM naïve e TAM Pós-sepse com genes relacionados à ativação leucocitária, citocinas e angiogênese. Em laranja, estão genes discriminados genes relacionados à citocinas e quimiocinas que estavam diferencialmente expressos entre os grupos. Em roxo, genes relacionados à ativação leucocitária. Em cinza, genes relacionados à angiogênese. É possível notar que as diferenças entre estes dois grupos foram muito discretas.

A Tabela 6 mostra a comparação entre genes relacionados à polarização e função macrofágica. Em termos gerais, notamos uma redução de marcadores relacionados à polarização M1 (Ccr7 e Cd86), assim como um aumento da expressão de Marco (relacionado à polarização M2). Entretanto, a expressão de Cd209a, marcador de M2, também encontrou-se reduzida. Não foram evidenciadas diferenças em outros importantes marcadores de polarização como Fizz, Arg1, Ym1, Mgl1, Cd206 (Mrc1), Stab1, Sepp1, Cd163l, Il-1ra, Mmp2, Mmp9 e Stat3. Foi encontrada redução da expressão de Cxcr4 e de Ccl5, assim como de Nfkbid. Na Figura 37, está exposto o *heat map* da comparação entre todos os grupos e genes diferencialmente expressos relacionados à polarização macrofágica. A Figura 38 destaca os grupos TAM naïve e TAM Pós-sepse, evidenciando a redução de expressão de Ccr7, Cd86 e Ccl5 nos TAM Pós-sepse, assim como o aumento da expressão de Marco.

Tabela 6 - Comparação entre expressão gênica de TAM pós-sepse com TAM naïve - genes relacionados à polarização ou função macrofágica

Gene	<i>Fold</i>	Expressão	Relação com polarização
Ccr7	-2,7	Reduzida	M1
Cd86	-1,8	Reduzida	M1
Marco	1,6	Aumentada	M2 (?) [*]
CD209a	-1,4	Reduzida	M2
Nfkbid	-2,0	Reduzida	-
Cxcr4	-1,6	Reduzida	-
Ccl5	-1,4	Reduzida	-
Il6ra	-1,4	Reduzida	-

^{*} não bem definido na literatura.

Figura 37 - Heat map de todos os grupos analisados (TAM naïve, TAM pós-sepse, M0 naïve, M0 pós-sepse, M1 e M2) com genes relacionados à polarização macrofágica.

Figura 38 - Heat map dos grupos TAM naïve e TAM Pós-sepse com genes relacionados à ativação leucocitária, citocinas e angiênese.

De modo interessante, também foi evidenciado em TAM derivado de animais pós-sepse aumento da expressão de genes relacionados à via de sinalização Wnt (Tabela 7). Genes relacionados à via não-canônica de polarização celular num plano encontraram-se hiperexpressos em TAM de animais pós-sepse (Figura 39).

Tabela 7 - Comparação entre expressão gênica de TAM pós-sepse com TAM naïve - genes relacionados à via de sinalização Wnt

Gene	Fold Change	Expressão em TAM pós-sepse
Fzd9	1,13	Aumentada
Fzd6	0,97	Aumentada

Figura 39 - Hiperexpressão em TAM Pós-sepse de genes relacionados à via Wnt não-canônica de polarização celular num plano. Encontramos aumento de expressão de genes relacionados à via Wnt não-canônica de polarização celular num plano, tais como Fzd9, Rac2 e Daam2.

5.9. ALTERAÇÃO DO PADRÃO DE LIBERAÇÃO DE CITOCINAS EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE INOCULADOS COM MELANOMA B16

Procuramos avaliar se animais pós-sepse poderiam ter mudanças no padrão de liberação de citocinas, as quais pudessem justificar o aumento de progressão tumoral e o acúmulo de macrófagos associados ao tumor. Dessa forma, animais previamente inoculados

com 30 mil células B16 foram sacrificados no D+14, para dosagem de citocinas no soro, sobrenadante de massa tumoral total e de linfonodo estimulado com concanavalina-A. Foram quantificadas citocinas representantes de padrão Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-10); citocinas relacionadas a aumento de progressão tumoral (TGF- β e TNF- α); e quimiocinas relacionadas a recrutamento de linhagem monocítica (CXCL12 e CCL2).

Sendo assim, realizamos dosagem por ELISA dessas citocinas/quimiocinas inicialmente no soro. Não notamos diferenças expressivas no padrão Th1/Th2, porém notamos importante aumento de citocinas relacionadas com a regulação da progressão tumoral (TGF- β e TNF- α) no soro dos animais sobreviventes à sepse e portadores de melanoma B16. Observamos também que ocorreu aumento de CCL2 em animais sobreviventes à sepse (com ou sem tumor). O aumento de CXCL12 ocorreu apenas no soro de animais sobreviventes à sepse e portadores de tumor (Figura 40)

Figura 40 - Padrão de citocinas/quimiocinas no soro de animais pós-CLP portadores de tumor. (A e B) Observamos que não houve alteração de padrão Th1/Th2 (IFN- γ e IL-10). (C e D) Aumento de citocinas relacionadas à progressão tumoral (TGF- β e TNF- α). (E e F) Aumento de citocinas relacionadas a migração/recrutamento de monócitos (CCL2 e CXCL12). n=5-7 por grupo. Amostras analisadas pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni quando apropriado. * significa $p < 0,05$ em comparação ao grupo naíve sem tumor. # significa $p < 0,05$ em comparação grupo CLP sem tumor.

Adicionalmente, realizamos a dosagem de citocinas Th1/Th2 no sobrenadante de linfonodo inguinal estimulado com concanavalina-A. A Figura 41 mostra uma redução de IL-10 nos animais pós-CLP, em comparação aos naíve. Por outro lado, encontramos aumento de TGF- β em animais sobreviventes à sepse e portadores de tumor, em relação aos demais.

Figura 41 - Padrão de citocinas/quimiocinas no sobrenadante de linfonodo estimulado de animais pós-CLP portadores de tumor. (A e B) Observamos que houve uma não esperada redução de IL-10 nos animais pós-CLP com ou sem tumor. (C) Ocorreu importante aumento de TGF- β no sobrenadante de linfonodo estimulado de animais pós-CLP portadores de tumor. (D) Não observamos mudanças nas concentrações de CXCL12 no sobrenadante de linfonodo estimulado de animais pós-CLP portadores de tumor. n=5-7 por grupo. Amostras analisadas pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni quando apropriado. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo naïve sem tumor.

Por outro lado, a dosagem de citocinas/quimiocinas no homogenato de melanoma no D+14 da inoculação mostrou apenas aumento de TNF- α nos tumores de animais pós-CLP. Não observamos diferenças em citocinas de padrão Th1/Th2, TGF- β , CCL2 ou CXCL12 (Figura 42).

Figura 42 - Padrão de citocinas/quimiocinas em tumores de animais naïve e sobreviventes à sepse. (A e B) Não observamos mudanças no padrão Th1/Th2. (C e D) Ocorreu importante aumento de TNF- α nos tumores de animais pós-CLP, mas não de TGF- β . (E e F) Não observamos mudanças nas concentrações de CXCL12 e CCL2 na massa tumoral analisada. n=7 por grupo. Amostras analisadas pelo teste t de Student. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo naïve sem tumor.

5.10. COINOCULAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS COM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS PÓS-SEPSE ACARRETOU AUMENTO DE PROGRESSÃO TUMORAL

Como modo de provar o conceito de que macrófagos de animais sobreviventes à sepse participam ativamente no aumento da progressão tumoral, realizamos experimento em que animais foram submetidos à CLP e sacrificados 15 dias para coleta de medula óssea e diferenciação de macrófagos através de sobrenadante de sarcoma L929. Macrófagos de animais naïve foram utilizados como controle. 10 mil macrófagos (naïve ou pós-CLP) eram coinoculados com 30 mil células B16 no subcutâneo de animais naïve.

Previamente à coinoculação, as células diferenciadas eram confirmadas como sendo macrófagos por critérios morfológicos (Figura 43, Painel A) e fenotipagem por citometria de fluxo através de marcação com anticorpos anti-F4/80 e anti-CD206 (Figura 43, Painel B). Notamos que praticamente todas as células eram macrófagos ($F4/80^+$) e com padrão de não polarização (M0), haja vista a baixa expressão do marcador CD206 (M2) e MHC classe II (M1, dado não mostrado). Após a inoculação, a progressão tumoral foi verificada através de mensuração por paquímetro, por bioluminescência e por sobrevida global. Os experimentos foram repetidos por duas vezes.

Figura 43 - Morfologia e fenotipagem de macrófagos derivados de medula óssea de animais naïve e CLP15d. Macrófagos de camundongos naïve (A) e do grupo CLP_{15d} diferenciados a partir de células da medula óssea. (B) Não observamos diferenças no sentido de polarização dos macrófagos coinoculados.

Constatamos que houve maior crescimento tumoral em animais coinoculados com macrófagos derivados de camundongos pós-CLP, em comparação aos coinoculados com macrófagos derivados de medula óssea de camundongos naïve (Figura 44).

Figura 44 - Coinoculação de melanoma B16 com macrófagos derivados de medula óssea de animais pós-CLP acarretou aumento de progressão tumoral. (A) Aumento de progressão tumoral avaliado por paquímetro. (B) Aumento de progressão tumoral no D+21 avaliado por bioluminescência. (C) Detalhe de três animais representativos de cada grupo. Gráficos representativos de dois experimentos. n=10, grupo Mφs naïve e n=9, grupo Mφs CLP. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste *two-way* ANOVA ou *t* de Student. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

A Figura 45 mostra importante redução da sobrevida no grupo dos animais coinoculados com macrófagos derivados de animais sobreviventes à sepse. Até o D+50 do

seguimento, ainda restavam vivos aproximadamente 60% dos animais que receberam melanoma em combinação com macrófagos de animais naïve.

Figura 45 - Coinoculação de melanoma B16 com macrófagos derivados de medula óssea de animais pós-CLP acarretou redução de sobrevida. Observamos aumento de mortalidade em animais naïve coinoculados com macrófagos derivados de animais sobreviventes à sepse. Mos naïve e n=9, grupo Mos CLP. Os dados são expressos como curva de Kaplan Meier e analisados pelo teste log-rank.

5.11. MEIO CONDICIONADO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS PÓS-SÉPTICOS NÃO ALTERA A PROLIFERAÇÃO NEM A MIGRAÇÃO CELULAR *IN VITRO*

De modo a determinar se macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) poderiam liberar mediadores capazes de alterar a proliferação ou migração celular de células B16 *in vitro*, realizamos os experimentos com resultados abaixo descritos.

5.11.1. Proliferação Celular

Células tumorais (10^4) foram incubadas em meio condicionado (MC) de 24 h de MDMO suplementado com 10% de SBF. Após 33 horas, as células foram removidas e contadas para determinar o tempo de duplicação celular.

A Figura 46 mostra que não observamos alteração no tempo de duplicação celular após exposição das células tumorais a meio condicionado de MDMO de animais pós-CLP.

Figura 46 - Meio condicionado de macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) não alterou o tempo de duplicação celular de células B16. Não observamos variação no tempo de duplicação celular após exposição de B16 a meio condicionado de MDMO de animais naíve ou CLP, em comparação ao grupo controle (C) em que foi utilizado meio RPMI completo. Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni quando apropriado. Os experimentos foram realizados três vezes, em triplicata experimental. “ns” significa não significante.

5.11.2. Ensaio de cicatrização (*Scratch assay*)

A fim de avaliar se o sobrenadante de macrófagos derivados de medula óssea de animais pós-CLP altera a migração de células de melanoma B16, realizamos ensaio de cicatrização (*scratch assay*), com medida das distâncias no tempo 0 e após 16 h do contato com o sobrenadante. Não pudemos observar diferenças significativas entre apenas meio RPMI completo, sobrenadante de macrófagos derivados de medula óssea de animais naíve e de animais sobreviventes de sepse (Figura 47).

Figura 47 - Meio condicionado de macrófagos derivados de medula óssea de animais pós-CLP não altera migração de células B16. Não observamos diferenças na migração celular entre os grupos que tiveram contato com apenas meio de cultura (C - controle negativo), sobrenadante de macrófagos de animais naïve e de animais sobreviventes à sepse (CLP_{15d}). Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni. Os experimentos foram realizados três vezes, em triplicata experimental. “ns” significa não significante.

5.12. INIBIÇÃO DE CXCR4 ACARRETA REDUÇÃO DA PROGRESSÃO TUMORAL EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE

Como modo de avaliar a participação da via CXCR4/CXCL12 no aumento de progressão tumoral que ocorre no pós-sepse, realizamos experimentos em que utilizamos o inibidor específico AMD3100 (Sigma), na dose de 5 mg/kg, administrado i.p., nos dias D+10 e D+15 após inoculação tumoral.

Como mostra a Figura 48, pudemos detectar que a inibição da via CXCR4/CXCL12 reduziu o fenótipo de aumento de progressão tumoral induzida pelo estado pós-sepse, assim como reduziu a mortalidade nesse grupo específico.

Figura 48 - Inibição da via CXCR4/CXCL12 através do inibidor AMD3100 acarretou reversão do fenótipo de aumento de progressão tumoral em animais sobreviventes à sepse. (A) O tratamento com AMD3100 (5 mg/kg, i.p., D+5 e D+10) preveniu o aumento de progressão tumoral relacionado ao período pós-sepse. (B) Observamos ainda que a redução de sobrevivência determinada pela condição pós-sepse foi revertida após uso do AMD3100. Setas: representam os dias das administrações do AMD3100 (D+5 e D+10). Os experimentos foram repetidos uma vez com resultados semelhantes. (A) Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. e analisados pelo teste *two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni quando apropriado. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns significa não significativa. (B) Os dados são expressos como curva de Kaplan-Meier e analisados pelo teste de Log-rank. Os valores p na comparação entre os grupos de interesse encontram-se na figura.

5.13. INIBIÇÃO DE CXCR4 PREVENIU AUMENTO DO ACÚMULO DE LEUCÓCITOS TOTAIS E DE TAM NO MICROAMBIENTE TUMORAL DE ANIMAIS PÓS-SEPSE

Adicionalmente, realizamos experimentos para investigar se a inibição da via CXCR4/CXCL12 poderia interferir na progressão tumoral através da redução de infiltração por macrófagos, notoriamente aumentada em fases precoces da progressão tumoral em animais pós-sepse. Animais pós-CLP com tumor receberam AMD3100 (5 mg/kg, i.p.) no D+10 e foram sacrificados no D+14. Os controles receberam apenas salina.

Pudemos evidenciar que a inibição da via CXCR4/CXCL12 reduziu o infiltrado tumoral por leucócitos totais (CD45⁺) (Figura 49).

Figura 49 - Inibição de CXCR4/CXCL12 preveniu o aumento de leucócitos totais induzido pelo estado pós-sepse. (A) Observamos que houve aumento de leucócitos totais no microambiente tumoral de animais que passaram previamente por sepse. Esse aumento foi prevenido pela inibição do eixo CXCR4/CXCL12 com o AMD3100. n=7 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Foram considerados leucócitos os eventos CD45⁺. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni quando apropriado. * significa p < 0,05 em comparação ao grupo naïve sem tumor. # significa p < 0,05 em comparação ao grupo CLP com tumor e salina (controle).

Verificamos também que a inibição de CXCR4 com o antagonista AMD3100 reduziu o infiltrado de TAM induzido pelo estado pós-sepse (Figura 50).

Figura 50 - AMD3100 preveniu acúmulo de TAM induzido pelo estado pós-sepse. (A) Observamos que houve aumento de TAM no microambiente tumoral de animais que passaram previamente por sepse. Esse aumento foi prevenido pela inibição do eixo CXCR4/CXCL12 com o AMD3100. . (B) *Dots plots* representativos dos grupos apresentados. n=7 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Foram considerados TAM os eventos CD45⁺F4/80⁺. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni quando apropriado. * significa p < 0,05 em comparação ao grupo naïve sem tumor. # significa p < 0,05 em comparação ao grupo CLP com tumor e salina (controle).

Como controle, quantificamos a presença de CXCR4 nos TAM de animais naïve e pós-CLP. Constatamos que não houve diferença de expressão desse receptor nos TAM. Dessa

forma o efeito do AMD3100 no grupo de animais sobreviventes de sepse não pareceu ser dependente de expressão diferencial do receptor CXCR4 (Figura 51).

Figura 51 - Não houve diferença na expressão de CXCR4 nos TAM de animais naïve e pós-CLP. Não notamos diferença na expressão do receptor de CXCL12 nos TAM de animais pós-CLP ou naïve. Foram considerados TAM os eventos CD45⁺F4/80⁺. n=7 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni quando apropriado.

5.14. INIBIÇÃO DE CXCR4/CXCL12 PREVENIU O ACÚMULO DE TAM EM ANIMAIS PÓS-SEPSE POR REDUZIR A PROLIFERAÇÃO EXTRAMEDULAR DE TAM

Mostramos que ocorre aumento de proliferação extramedular de TAM em animais no estado pós-sepse (Figura 52). Verificamos ainda que, após inibição do eixo de sinalização CXCR4/CXCL12 através do inibidor específico AMD3100, houve redução da proliferação extramedular de TAM nos animais pós-sepse Figura 52.

Figura 52 - Inibição de CXCL12/CXCR4 preveniu o aumento de proliferação extramedular de TAM induzida pelo estado pós-sepse. (A) Observamos que houve aumento da proliferação extramedular de TAM no microambiente tumoral de animais que passaram previamente por sepse, o qual foi prevenido pela inibição do eixo CXCR4/CXCL12 com o AMD3100. (B) *Dots plots* representativos dos grupos apresentados. n=7 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Foram considerados TAM os eventos F4/80⁺ e TAM em proliferação extramedular os eventos F4/80⁺Ki67⁺. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni quando apropriado. * significa p < 0,05 em comparação ao grupo naïve + salina. # significa p < 0,05 em comparação ao grupo CLP com tumor + salina (controle).

Adicionalmente, analisamos a proliferação extramedular de TAM na *gate* CD45⁺ (leucócitos). A Figura 53 evidencia que houve aumento de proliferação extramedular de TAM no pós-sepse, e que esse efeito foi reduzido após tratamento com o antagonista específico de CXCL12/CXCR4.

Figura 53 - Análise da proliferação extramedular de TAM analisada na *gate* CD45⁺ também evidenciou que o tratamento com AMD3100 preveniu o aumento induzido pelo estado pós-sepse. Quando analisado na *gate* para leucócitos totais (CD45⁺), também observamos que houve maior proliferação extramedular de TAM no microambiente tumoral de animais pós-CLP, tendo sido reduzido pela inibição de CXCR4/CXCL12. n=7 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Foram considerados TAM os eventos F4/80⁺ e TAM em proliferação extramedular os eventos F4/80⁺Ki67⁺. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni quando apropriado. * significa p < 0,05 em comparação ao grupo naïve + salina. # significa p < 0,05 em comparação ao grupo CLP com tumor + salina (controle).

Pudemos ainda notar que não houve no D+14 não houve diferença de proliferação entre as células não leucocitárias (CD45⁻) entre os grupos avaliados (Figura 54). Isso provavelmente significa que o efeito anti-tumoral do tratamento precoce com o CXCR4 não é dependente de inibição direta do crescimento celular.

Figura 54 - Não houve diferença de expressão do marcador de proliferação celular entre os grupos analisados. Verificamos que não houve diferença de expressão de Ki67 entre essas células. $n=7$ por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Foram considerados os eventos $Ki67^+CD45^-$. Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni quando apropriado. “ns” significa não significante.

5.15. INIBIÇÃO DE CXCR4 PROMOVE REDUÇÃO DE TREGS NO LINFONODO DE DRENAGEM, MAS NÃO NO BAÇO, EM ANIMAIS SOBREVIVENTES DE SEPSE PORTADORES DE TUMOR

Verificamos que, ao inibir a via CXCL12/CXCR4 através do antagonista específico AMD3100, não ocorreu alteração no aumento de Tregs no baço induzidos pelo estado pós-sepse. Neste grupo de experimentos, os animais que passaram por sepse apresentaram maior acúmulo de Tregs no baço, em comparação aos naïve. Porém, esse efeito não foi revertido pelo AMD3100 (Figura 55).

Figura 55 - Inibição de CXCR4 não provocou redução de Tregs no baço. (A) Observamos que houve aumento de Tregs (eventos CD4⁺Foxp3⁺) no baço de animais que passaram previamente por seps. Porém, esse evento não foi alterado pela inibição do eixo CXCR4/CXCL12. (B) *Dots plots* na *gate* CD4⁺ representativos dos grupos apresentados. n=7 por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Foram considerados Tregs os eventos CD4⁺Foxp3⁺. Os dados são expressos como média ± S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni quando apropriado. * significa p < 0,05 em comparação aos grupos naïve.

Por outro lado, evidenciamos que nos linfonodos de animais pós-CLP houve maior acúmulo de Tregs, o qual mostrou-se reduzido nos animais sobreviventes que receberam AMD3100 (Figura 56).

Figura 56 - Redução de Tregs nos linfonodos de drenagem após inibição de CXCR4. (A) Observamos que houve aumento de Tregs (eventos $CD4^+Fxp3^+$) no linfonodo inguinal de drenagem de animais que passaram previamente por sepse. Esse aumento foi prevenido pela inibição do eixo CXCR4/CXCL12 com o AMD3100 (B) *Dots plots* na *gate* $CD4^+$ representativos dos grupos apresentados. $n=7$ por grupo. O experimento foi repetido uma vez com resultados equivalentes. Foram considerados Tregs os eventos $CD4^+Fxp3^+$. Os dados são expressos como média $\pm$ S.E.M. e analisados pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni quando apropriado. * significa $p < 0,05$ em comparação ao grupo naïve sem tumor. # significa $p < 0,05$ em comparação ao grupo CLP com tumor e salina (controle).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Pacientes sobreviventes à sepse reconhecidamente apresentam estado prolongado de imunossupressão, com aumento da mortalidade e do risco de infecções oportunistas (OSAWA; SINGH, 2009; OTTO et al., 2011; WEYCKER et al., 2003). Por outro lado, os estudos desenvolvidos por Danai e colaboradores (2006) e por Williams e colaboradores (2004) mostraram o aumento da ocorrência de sepse e infecções em pacientes com câncer (DANAI et al., 2006; WILLIAMS et al., 2004). Entretanto, não há, no nosso conhecimento, evidências de aumento da incidência de câncer, da progressão tumoral, da ocorrência de metástases ou de falência de tratamento, em pacientes sobreviventes à sepse. É válido supor que haja aumento da incidência de neoplasias nesse grupo de indivíduos, assim como da progressão de neoplasias previamente existentes, haja vista a associação de câncer com outros estados de imunossupressão (DAHLKE et al., 2014; SHERSTON et al., 2014).

O presente trabalho mostrou o aumento da progressão de neoplasia (melanoma B16-F10) em camundongos previamente expostos à sepse induzida pelo método de ligadura e punção cecal. A diferença entre a progressão tumoral dos camundongos sobreviventes à sepse em comparação aos naïve controles foi mais evidente quanto menor o inóculo tumoral injetado no subcutâneo desses animais. Também a sobrevida de animais pós-sepse receptores de tumor foi reduzida em relação aos naïve. A diferença entre os grupos também foi mais pronunciada quanto menor o inóculo tumoral. Provavelmente, os mecanismos envolvidos são tênues o bastante para serem mascarados com o emprego de um inóculo tumoral maior de células neoplásicas. Foi detectado aumento de progressão tumoral em grupos de animais pós-sepse injetados com células B16 15, 30 e 60 dias após a indução de sepse. A longa duração desse efeito pós-sepse reforça a possível importância clínica do estudo epidemiológico de pacientes com câncer após sepse.

Nossos resultados também mostraram que nem todos os animais inoculados com 10 mil células B16 desenvolveram tumor até o 42^o dia de observação, sendo a pega tumoral maior (80% versus 40%) nos animais pós-sepse. Quando utilizado o inóculo tumoral de 30 mil células, todos os animais desenvolveram tumor. Por esse motivo, escolhemos utilizar 30 mil células para estudo posterior dos mecanismos envolvidos no aumento de progressão tumoral relacionado ao pós-sepse.

Cavassani e colaboradores (2010) reportaram o aumento de progressão tumoral em modelo heterotópico de carcinoma de Lewis, porém não caracterizam a relação entre inóculo tumoral e progressão, ou testaram diferentes tempos pós-sepse. Também descreveram se houve alteração da sobrevida ou aumento de pega tumoral (CAVASSANI et al., 2010).

Adicionalmente, mostramos ocorrer aumento da carga de metástases espontâneas, assim como da colonização pulmonar, em camundongos sobreviventes à sepse. Entretanto, não houve diferenças na incidência de metástases segundo exame anatomopatológico de órgãos (cérebro, linfonodos, fígado e pulmões) entre os grupos. Possivelmente o alto potencial metastático intrínseco da linhagem B16-F10 (GHEORGHEOSU; DEHELEAN, 2011) interferiu na distinção entre os grupos naïve e pós-sepse com relação à incidência de metástases.

Em grande parte das neoplasias, o microambiente exerce importantes funções regulatórias (CAVALLO et al., 2011; KOONTONGKAEW, 2013). Seus componentes celulares (por exemplo, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, MDSCs, fibroblastos, células endoteliais) e acelulares (por exemplo, matriz extracelular) estão associados a diversos processos facilitadores do câncer, como aumento da proliferação, escape imune e neoangiogênese (COUSSENS; WERB, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011). No esforço de caracterizar os mecanismos envolvidos no aumento da progressão tumoral em camundongos pós-sepse, foram avaliadas possíveis alterações no microambiente tumoral inflamatório. Sendo assim, constatamos haver um aumento precoce (D+14) de leucócitos totais (células CD45⁺) e macrófagos associados ao tumor (TAM) (CD45⁺F4/80⁺CD206⁺) nos tumores de camundongos previamente submetidos à sepse.

Os TAM são elementos-chave do microambiente tumoral (SICA; ALLAVENA; MANTOVANI, 2008b). Através de mediadores parácrinos ou justácrinos, induzem aumento da capacidade proliferativa de células neoplásicas, facilitam os processos de invasão de tecidos peritumorais, remodelamento de matriz extracelular, neoangiogênese e metástase (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013; CONDEELIS; POLLARD, 2006; SOLINAS et al., 2009). Neste trabalho, mostramos que ocorre aumento do acúmulo de TAM nos animais sobreviventes à sepse, sendo esse efeito precoce (D+14). Nessa fase, os tumores de camundongos naïve e pós-sepse ainda não apresentavam distinção de tamanho. Mais tardiamente (D+21), a diferença em relação ao acúmulo relativo (porcentual) de TAM deixou de existir. Portanto, a maior presença de TAM em termos absolutos no D+21 deveu-se à

maior massa tumoral encontrada nos animais sobreviventes à sepse. Isso levanta a hipótese de que a precocidade do acúmulo desse tipo celular possa estar associado ao aumento de progressão tumoral. Esse achado é importante, haja vista o aumento da presença de TAM ser considerado fator de mau prognóstico em muitas variedades de tumores (TANG, 2013; ZHANG et al., 2012). Além disso abre-se espaço para o estudo futuro de possíveis alvos terapêuticos da progressão tumoral pós-sepse, uma vez que a inibição do acúmulo de TAM via antagonismo de CCL2/CCR2 (BRAULT; KURT, 2005) , assim como o uso de fármacos que acarretam sua depleção (por exemplo, clodronato lipossomal e trabectedina), induzem a redução de tumores já estabelecidos (D'INCALCI et al., 2014; GERMANO et al., 2013; ZEISBERGER et al., 2006).

No presente trabalho, mostramos que o acúmulo de TAM no microambiente tumoral de animais previamente submetidos à sepse é associado ao aumento da expressão de Ki67, uma proteína nuclear expressa durante as fases ativas do ciclo celular (G1, G2, S e mitose) . Isso significa que, pelo menos em parte, o acúmulo de TAM nesses animais ocorre por aumento de proliferação extramedular. Classicamente, o acúmulo de TAM no microambiente tumoral é descrito como dependente da infiltração por monócitos provenientes da circulação sanguínea atraídos por uma série de substâncias produzidas pelas células tumorais ou pelos próprios TAM. Os principais agentes quimioatraentes são quimiocinas e citocinas como CCL2, CCL7, VEGF e PDGF (LOBERG et al., 2007; SOLINAS et al., 2009). O eixo CXCL12/CXCR4 também participa na manutenção do acúmulo de TAM em regiões de hipóxia tissular (KNOWLES; HARRIS, 2007; TEICHER; FRICKER, 2010). Além disso, a proliferação extramedular de TAM tem sido descrita como um mecanismo adicional para seu acúmulo no microambiente. Jenkins e colaboradores (2011) mostraram que a proliferação extramedular de macrófagos é vinculada a respostas imune Th2 (JENKINS et al., 2011). O microambiente tumoral propicia condições semelhantes de ativação de vias “alternativas” (ou seja, Th2 e M2) para desencadear a replicação de TAM. Nosso estudo corrobora o de Tymoszuk e colaboradores (2014), o qual mostrou que a proliferação *in situ* de TAM contribui de modo importante para o seu acúmulo em modelos animais de câncer de mama espontâneo (TYMOSZUK et al., 2014).

Como forma de mostrar que os macrófagos de animais previamente submetidos à sepse tem participação ativa no aumento de progressão tumoral já observada nesse período, foram realizados experimentos de coinoculação. Para isso, macrófagos não polarizados derivados de medula óssea de animais naïve e pós-sepse foram isolados e inoculados em

animais naïve em conjunto com células de melanoma B16. Mostramos que quando são inoculados macrófagos derivados de animais previamente submetidos à sepse, a progressão tumoral é maior, assim como a sobrevivência é reduzida. Para determinar possíveis mediadores envolvidos, incubamos células tumorais B16 com o sobrenadante de macrófagos pós-sepse ou naïve. Não houve alteração na proliferação celular nem da capacidade de migração das células tumorais. Portanto, sugere-se que os mecanismos através dos quais os TAM favorecem o aumento de progressão tumoral *in vivo* sejam indiretos (por exemplo, associado à neoangiogênese ou linfangiogênese), justácrinos ou parácrinos.

Esses resultados mostram que a presença aumentada de macrófagos associados ao tumor no período pós-sepse não é um marcador meramente putativo, e sim provavelmente ativo na indução de aumento de progressão tumoral. Cho e colaboradores (2012) isolaram monócitos de medula óssea, diferenciaram *in vitro* para M2 e inocularam em conjunto com células tumorais de câncer de mama. Houve maior progressão tumoral, maior infiltração por leucócitos e alteração de expressão gênica com maior liberação de citocinas relacionadas a escape imune e crescimento tumoral (CHO et al., 2012). Classicamente, é descrito que ao adentrar o microambiente tumoral, os TAM adquirem fenótipo similar aos macrófagos classicamente polarizados no sentido M2 (MANTOVANI et al., 2008). Baseado nisso, nossos dados nos levaram a supor que os TAM de animais pós-sepse poderiam apresentar fenótipo mais precocemente direcionado ao polo M2 em comparação aos TAM de animais naïve, com isso auxiliando o aumento de progressão tumoral observado.

Para elucidar esta hipótese, realizamos o estudo comparativo da expressão gênica entre TAM de animais naïve e TAM de animais pós-sepse. Para critérios de comparação, foram utilizados também macrófagos ativados M1 e M2, além de macrófagos M0 derivados de medula óssea de animais naïve ou pós-sepse. Os TAM de animais pós-sepse mostraram ser discretamente mais semelhantes aos macrófagos M2 do que os TAM de animais naïve. Verificamos que as diferenças de expressão gênica entre TAM-naïve e TAM-pós-sepse foram muito tênues. Um conjunto de 61 genes foi encontrado hiperexpressos (*up-regulated*) e 98 genes como hipoexpressos (*down-regulated*).

Em linhas gerais, pudemos verificar que os TAM-pós-sepse apresentaram genes relacionados à ativação leucocitária hipoexpressos. Il6ra apresentou expressão reduzida, o que é condizente com o aumento da proliferação extramedular de macrófagos observado, haja vista o aumento de IL-6 inibir a proliferação de macrófagos (RIEDY; STEWART, 1992).

Ainda, genes relacionados à polarização M1 encontravam-se reduzidos (Ccr7 e Cd86), assim como aumento de um gene provavelmente relacionado à polarização M2 (Marco). Ccr7 é um marcador de ativação M1, classicamente reduzido quando da ativação alternativa de macrófagos (WANG et al., 2010). Tomioka e colaboradores (2012), por exemplo, mostraram redução de Ccr7 induzido por ativação alternativa de macrófagos via infecção com micobactérias ou protozoários (TOMIOKA et al., 2012).

O receptor de macrófagos com estrutura de colágeno (Marco) é um receptor *scavenger* constitutivo em macrófagos e hiperexpresso após ativação de TLR via reconhecimento de bactérias (BOWDISH; GORDON, 2009). Apresenta alta homologia com o receptor *scavenger* de classe A (SR-A), reconhecidamente presente em macrófagos alternativamente ativados (BOWDISH; GORDON, 2009). Aparentemente, os dois receptores tem papel diverso nos TAM. Por exemplo, Neyen e colaboradores (2013) mostraram que a deleção de Marco em células hematopoiéticas associadas ao tumor acarretou aumento da progressão tumoral. Por outro lado, a deleção de SR-A levou à redução de progressão (NEYEN et al., 2013). Apesar de receptores *scavenger* estarem em geral associados à polarização M2 (MANTOVANI et al., 2002), a literatura é controversa quanto a definição se a expressão de Marco é mais característico da polarização M1 ou M2. Macrófagos M2 induzidos por IL-10 tem aumento da expressão de Marco (MARTINEZ; GORDON, 2014). Ainda, Marco está aumentado no perfil de expressão gênica de lesões provocadas por *Micobacterium leprae* que coexpressam outros marcadores M2 como CD163 e SR-A (TOMIOKA et al., 2012). Por outro lado, Mukhopadhyay e colaboradores (2006) mostraram que o reconhecimento de *Neisseria meningitidis* através de TLR-4 induz aumento da expressão de Marco, o qual auxilia no reconhecimento e fagocitose da bactéria (MUKHOPADHYAY et al., 2006), função associada à polarização M1. Entretanto, considera-se que a ativação inata é incapaz de polarizar o macrófago completamente no sentido M1, uma vez que não desencadeia a produção de IL-12 (MARTINEZ et al., 2008).

Adicionalmente, verificamos que os TAM derivados de animais pós-sepse apresentaram uma redução da expressão de genes associados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC)-II. De acordo com Martinez e colaboradores (2014), a alta expressão de MHC-II, assim como das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, está associada à polarização no sentido M1 (MARTINEZ; GORDON, 2014). Dessa forma, o conjunto de dados de expressão gênica obtidos neste estudo reflete um provável direcionamento mais precoce dos TAM de animais pós-sepse ao sentido M2. Isso poderia

eventualmente contribuir para o aumento de progressão tumoral. Entretanto, as diferenças entre os TAM de animais pós-sepse e de animais naïve são muito discretas e podem não representar uma diferença real de polarização, haja vista não termos encontrado mudança da expressão de genes importantes para a polarização M2 como *Fizz1*, *Arg1*, *Ym1*, *Mgl1*, *Mrc1*, *Stab1*, *Sepp1*, *Cd163l*, *Il-1ra*, *Mmp2*, *Mmp9* e *Stat3* (BISWAS et al., 2006; MARTINEZ; GORDON, 2014; SICA et al., 2008). Também não constatamos através de citometria de fluxo qualquer alteração na expressão do receptor de manose CD206 (codificado pelo gene *Mrc1*), importante marcador M2.

A análise de expressão gênica revelou ainda a hiperexpressão em TAM de animais pós-sepse de genes da via Wnt. Essa via está associada a diversos processos relacionados à carcinogênese, como proliferação celular, configuração do citoesqueleto e sinalização dependente de cálcio (SHERWOOD, 2015). Ojalvo e colaboradores (2010) mostraram que TAM localizados em sítios de invasão são capazes de secretar Wnt5b e Wnt7, estimulando a angiogênese (OJALVO et al., 2010). A sinalização inicia após reconhecimento de uma proteína Wnt aos receptores da família Frizzled e pode ser subdividida em três componentes de sinalização a depender dos ligantes e receptores ativados: o canônico Wnt/ β -catenina, o não-canônico de polarização celular num plano e o não canônico Wnt/cálcio (SHERWOOD, 2015). TAM derivados de camundongos sobreviventes de sepse mostraram aumento da expressão de *Fzd9* e *Fzd6*, dois genes que codificam receptores da família Frizzled ligados à via de polarização celular num plano (BRYNCZKA; MERRICK, 2008). Ademais, genes associados a via não-canônica de polarização celular num plano, como *Rac2* e *Daam2*, encontravam-se hiperexpressos. Essa via está associada a invasividade, migração celular e disseminação metastática (SEBBAGH; BORG, 2014). Król e colaboradores (2014) mostraram que TAM acarretam a inibição da via canônica Wnt/ β -catenina em detrimento da ativação de vias Wnt não-canônicas em células de câncer de mama canino. Também evidenciaram que essa ativação tinha correlação com a quantidade de TAM presente no tumor (KRÓL et al., 2014). Em nosso trabalho, a expressão gênica de TAM foi analisada a partir de um isolamento com pureza em torno de 80%, assim como o grupo de animais sobreviventes à sepse apresentou maior infiltração por TAM. Sendo assim, é possível que essas alterações encontradas na via Wnt sejam decorrentes não de alteração nos macrófagos analisados, mas nas células tumorais contaminantes.

Avaliamos também a presença de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Tregs) nos animais previamente submetidos à sepse. Verificamos que os Tregs sofrem acúmulo no baço e

linfonodo inguinal de animais pós-sepse sem tumor e nos naïve com tumor. Esse aumento é ainda mais pronunciado nos camundongos pós-sepse portadores de tumor. Resultados semelhantes foram previamente obtidos por Cavassani e colaboradores (2010), quando mostraram a importância de Tregs para a expansão tumoral no período pós-sepse (CAVASSANI et al., 2010). Neste estudo, decidimos avaliar também a infiltração por Tregs no microambiente tumoral, tendo em vista a alta infiltração por Tregs ser associada a mau prognóstico em pacientes com câncer (CHEN; CHEN, 2014; HU et al., 2014). Zhou e colaboradores mostraram que há associação de localização intratumoral entre Tregs e TAM. Ademais, evidenciaram que a alta presença de Tregs em adjacência aos TAM é relacionada à piora do prognóstico de pacientes com carcinoma hepatocelular. Em concordância com esses achados, sabe-se que TAM são capazes de induzir linfócitos T a adquirirem fenótipo regulador, convertendo-se em Tregs (DANNENMANN et al., 2013). Entretanto, em nosso trabalho não foram vistas diferenças significativas no acúmulo dessa célula entre os tumores de animais pós-sepse e naïve. A raridade desse tipo celular pode ter contribuído para não termos encontrado diferenças através do método de citometria de fluxo.

Posteriormente, foram avaliados componentes humorais possivelmente associados ao aumento de progressão tumoral no pós-sepse. Verificamos aumento de TNF- α , TGF- β , CCL2 e CXCL12 no soro de animais pós-sepse portadores de tumor. TGF- β está diretamente relacionado ao recrutamento de monócitos e diferenciação de macrófagos no microambiente tumoral, levando a inibição de funções efetoras dos TAM, que assim adquirem papel mais protumoral (BIERIE; MOSES, 2010; MANTOVANI et al., 2010). Além disso, é descrito que pode aumentar a resposta a outros mecanismos de sinalização quimiotática, como no caso de CXCL12/CXCR4, através da inibição da internalização do CXCR4 (BIERIE; MOSES, 2010; WANG et al., 2001). Em nossos dados de análise de expressão gênica, houve redução da expressão gênica de Cxcr4 em TAM de animais pós-sepse. Especulamos que o aumento de TGF- β possa ter acarretado inibição da internalização do CXCR4, haja vista expressão do receptor na superfície dos macrófagos, analisada por citometria de fluxo, ter sido equivalente entre os grupos naïve e pós-sepse.

Em razão de termos observado o aumento de CXCL12 no soro de camundongos sobreviventes à sepse portadores de tumor, questionamos qual seria a importância do eixo CXCL12/CXCR4 na progressão tumoral neste modelo. Dessa forma, foi realizada a inibição do receptor CXCR4 *in vivo* através do antagonista AMD3100 nos dias 10 e 14 após a inoculação, resultando na prevenção do aumento de progressão tumoral relacionado ao pós-

seps. Esses dados são condizentes com a literatura corrente, haja vista o aumento da expressão de CXCR4 estar associada a pior prognóstico, aumento de progressão, angiogênese e linfangiogênese (COJOC et al., 2013; CUI et al., 2011).

Outrossim, CXCL12/CXCR4 é importante para a presença de TAM no microambiente tumoral. O acúmulo de TAM obedece a um gradiente de hipóxia, o qual é, entre outros, mediado por CXCR4 (KNOWLES; HARRIS, 2007). Este encontra-se hiperexpresso nas condições de baixa oxigenação tissular em decorrência do aumento intranuclear de HIF-1 (SCHIOPPA et al., 2003). Em nossos resultados, encontramos que a progressão tumoral do período pós-seps está associada ao maior acúmulo de TAM, com aumento de proliferação extramedular, mostrada pela maior expressão da proteína de ciclo celular Ki67. A inibição de CXCR4 acarretou a prevenção do acúmulo precoce de TAM nos tumores de animais pós-seps. Estes resultados apresentam plausibilidade biológica, tendo em vista Beider e colaboradores (2014) terem mostrado que células de mieloma múltiplo recrutam monócitos através de CXCL12/CXCR4, o qual também está associada à diferenciação a macrófagos e polarização no sentido M2 (BEIDER et al., 2014).

Além disso, pelo menos em parte, a inibição do acúmulo de TAM através do bloqueio de CXCR4 foi devida à redução da proliferação extramedular. Dá suporte a esse achado o entendimento de que a ligação de CXCL12 ao CXCR4 desencadeia várias funções celulares, como sobrevivência e proliferação (TEICHER; FRICKER, 2010). De modo interessante, é aparente que haja um *crosstalk* entre a CXCR4/CXCL12 e a sinalização através de vias não-canônicas Wnt, uma vez que Wnt5a e PKC (participantes da via não-canônica dependente de cálcio) são necessários para o *homing* de células T mediado por CXCL12 (GHOSH et al., 2009). Em nossos resultados, entretanto, os TAM apresentaram maior expressão de genes da via não-canônica Wnt de polarização celular num plano, mas não da via de Wnt/Cálcio.

A inibição de CXCR4 acarretou a prevenção do acúmulo de Tregs no baço e no linfonodo inguinal induzida pelo pós-CLP. Isso pode ter contribuído para a redução de progressão tumoral nos camundongos pós-seps, haja vista a importância já previamente mostrada por Cavassani e colaboradores (2010) de Tregs na expansão tumoral em sobreviventes de seps (CAVASSANI et al., 2010). Zou e colaboradores (2004) mostraram que a sinalização via CXCR4 é importante para manutenção do *pool* de Tregs na medula óssea, tendo a inibição do receptor acarretado mobilização de Tregs para a circulação periférica (ZOU et al., 2004). Com base nisso, supomos que a inibição de CXCR4 nos

animais pós-sépticos possa levar à mobilização de Tregs do baço e linfonodos por perda da sinalização de *homing* para esses órgãos.

Até o presente, havia poucas evidências também da participação da via CXCL12/CXCR4 na sepse. Por exemplo, Delano e colaboradores (2011) evidenciaram que a mobilização de neutrófilos na sepse aguda é fortemente dependente de sinalização via CXCL12 (DELANO et al., 2011). Ainda, mostrou-se que linfócitos de pacientes sépticos apresentam hiperexpressão de CXCR4 e aumento de resposta quimiotática ao CXCL12 (DING et al., 2006). O emprego de um agonista de CXCR4 melhorou desfechos em modelo experimental de sepse aguda (FAN et al., 2012). No nosso conhecimento, não havia previamente estudos avaliando a participação dessa via no período de imunossupressão pós-sepse.

A despeito de ter fornecido evidências para o entendimento da progressão tumoral no período pós-sepse, o conjunto de dados levantados neste trabalho também apresenta algumas limitações dignas de nota. Por exemplo, não foi verificada a progressão tumoral em período de tempo após 60 dias da CLP. Portanto, não podemos afirmar qual seria o comportamento tumoral após esse período. Além disso, não foram avaliados parâmetros relacionados à iniciação tumoral a partir de tecidos saudáveis. Sendo assim, ainda não se pode especular qual seria a relação do pós-sepse com a iniciação neoplásica. Adicionalmente, a avaliação de metástases foi realizada apenas nos camundongos sobreviventes à sepse 14 dias após a CLP. Ademais, o papel de TAM e de CXCL12/CXCR4 foi avaliado apenas na progressão tumoral, e não no desencadeamento de metástases espontâneas e na colonização pulmonar.

Apesar de termos mostrado a associação causal entre o acúmulo de macrófagos associados ao tumor e a progressão tumoral pós-sepse, não ficou ainda estabelecido quais seriam os mecanismos através dos quais os TAM estariam induzindo esse efeito. Um mecanismo possível é o aumento da indução de neoangiogênese dependente de TAM, haja vista sua importância central para esse processo (LIN et al., 2006; RIABOV et al., 2014). Porém, essa relação não ficou aqui mostrada. Na comparação da análise de expressão gênica de TAM derivados de animais naïve com TAM derivados de sobreviventes de sepse, uma importante limitação foi o isolamento de TAM. A pureza obtida após as técnicas de isolamento foi de aproximadamente 80%, sendo, porém, constante entre os grupos. Ainda, apesar de termos mostrado que a inibição de CXCL12 acarreta menor progressão tumoral,

menor acúmulo de TAM e Tregs e menor proliferação extramedular de TAM, não foi mostrada a fonte produtora dessa quimiocina.

Em suma, o presente trabalho mostrou o aumento da progressão tumoral em animais previamente submetidos à sepse, assim como aumento da carga metastática e redução de sobrevida. Foi evidenciado que o efeito de aumento da progressão tumoral é prolongado, ocorrendo mesmo após 60 dias da indução de sepse. Verificamos também que ocorre aumento da população de TAM nos tumores pós-sepse, estando esse tipo celular provavelmente envolvido causalmente no aumento de progressão tumoral. O acúmulo de TAM nessas condições foi provocado, pelo menos em parte, por aumento de proliferação extramedular e por mediação dependente de CXCL12/CXCR4. Apesar de apresentarem diferenças muito tênues em relação aos controles naïve, os TAM derivados de animais pós-sepse mostraram ter um perfil mais próximo de M2, o que especulamos poder estar associado a um perfil mais protumoral. Mostramos ainda que a via CXCL12/CXCR4 participa do processo de aumento da progressão tumoral em camundongos sobreviventes à sepse. A inibição dessa via resultou em redução da progressão tumoral e diminuição do acúmulo de TAM induzido pelo estado pós-sepse. A Figura 57 sintetiza esses achados.

Figura 57 - O aumento da progressão tumoral em camundongos sobreviventes à sepse está associado a aumento da população de TAM e é dependente da via CXCL12/CXCR4. A progressão tumoral em camundongos sobreviventes à sepse está associada a uma maior infiltração por TAM. O aumento da proliferação extramedular de TAM está associado a esse acúmulo. Adicionalmente, a via CXCL12/CXCR4 participa do processo de aumento da progressão tumoral e possivelmente está relacionada ao aumento de TAM no microambiente tumoral.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- Houve aumento de progressão tumoral de melanoma B16 em camundongos sobreviventes à sepse, levando a redução de sobrevida;
- Ocorreu aumento da carga de metástases em camundongos sobreviventes à sepse;
- Tumores de animais sobreviventes à sepse apresentaram acúmulo de TAM;
- A análise de expressão gênica de TAM de animais sobreviventes à sepse mostrou redução da expressão de genes relacionados ao MHC-II e à ativação leucocitária;
- Macrófagos derivados de medula óssea de animais sobreviventes à sepse induziram o aumento da progressão tumoral de melanoma B16;
- Houve aumento de CXCL12 no soro de animais pós-sepse portadores de tumor;
- A inibição da sinalização de CXCL12 através do bloqueio do receptor CXCR4 induziu redução da progressão tumoral, aumento de sobrevida e redução do acúmulo de TAM em camundongos sobreviventes à sepse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAVENA, P. et al. Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. **Cancer research**, v. 65, n. 7, p. 2964–71, 1 abr. 2005.

ALVES-FILHO, J. C.; SPILLER, F.; CUNHA, F. Q. Neutrophil paralysis in sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 34 Suppl 1, n. 17, p. 15–21, set. 2010.

ANGUS, D. C. The lingering consequences of sepsis: a hidden public health disaster? **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 304, n. 16, p. 1833–4, 27 out. 2010.

ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. **Critical care medicine**, v. 29, n. 7 Suppl, p. S109–16, jul. 2001.

BACON, K. B.; HARRISON, J. K. Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. **Journal of neuroimmunology**, v. 104, n. 1, p. 92–7, 3 abr. 2000.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361–71, maio 2009.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer cell**, v. 7, n. 3, p. 211–7, mar. 2005.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539–45, 17 fev. 2001.

BEALE, R. et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. **Infection**, v. 37, n. 3, p. 222–32, jun. 2009.

BEATTY, G. L. et al. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6024, p. 1612–6, 25 mar. 2011.

BEIDER, K. et al. Multiple myeloma cells recruit tumor-supportive macrophages through the CXCR4/CXCL12 axis and promote their polarization toward the M2 phenotype. **Oncotarget**, v. 5, n. 22, p. 11283–96, 30 nov. 2014.

BENJAMIM, C. F. et al. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. **Blood**, v. 105, n. 9, p. 3588–95, 1 maio 2005.

BERG, D. J. et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. **The Journal of clinical investigation**, v. 98, n. 4, p. 1010–20, 15 ago. 1996.

BIERIE, B.; MOSES, H. L. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 1, p. 49–59, fev. 2010.

BISWAS, S. K. et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). **Blood**, v. 107, n. 5, p. 2112–22, 1 mar. 2006.

BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. **Seminars in immunopathology**, 9 maio 2013.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–96, out. 2010.

BONE, R. C. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644, 1 jun. 1992.

BOWDISH, D. M. E.; GORDON, S. Conserved domains of the class A scavenger receptors: evolution and function. **Immunological reviews**, v. 227, n. 1, p. 19–31, jan. 2009.

BRAULT, M. S.; KURT, R. A. Impact of Tumor-Derived CCL2 on Macrophage Effector Function. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2005, n. 1, p. 37–43, jan. 2005.

BRYNCZKA, C.; MERRICK, B. A. The p53 transcriptional target gene *wnt7b* contributes to NGF-inducible neurite outgrowth in neuronal PC12 cells. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 76, n. 7, p. 795–808, set. 2008.

BURGER, J. A.; KIPPS, T. J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. **Blood**, v. 107, n. 5, p. 1761–7, 1 mar. 2006.

BURGER, J. A.; PELED, A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. **Leukemia**, v. 23, n. 1, p. 43–52, jan. 2009.

CARSON, W. F. et al. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. **Epigenetics**, v. 6, n. 3, p. 273–283, 1 mar. 2011.

CAVALLO, F. et al. 2011: the Immune Hallmarks of Cancer. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 60, n. 3, p. 319–26, mar. 2011.

CAVASSANI, K. A. et al. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. **Blood**, v. 115, n. 22, p. 4403–11, 3 jun. 2010.

CERADINI, D. J. et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. **Nature medicine**, v. 10, n. 8, p. 858–64, ago. 2004.

- CHALUPKA, A. N.; TALMOR, D. The economics of sepsis. **Critical care clinics**, v. 28, n. 1, p. 57–76, vi, jan. 2012.
- CHEN, J.; CHEN, Z. The effect of immune microenvironment on the progression and prognosis of colorectal cancer. **Medical oncology (Northwood, London, England)**, v. 31, n. 8, p. 82, ago. 2014.
- CHO, H. J. et al. Bone marrow-derived, alternatively activated macrophages enhance solid tumor growth and lung metastasis of mammary carcinoma cells in a Balb/C mouse orthotopic model. **Breast cancer research : BCR**, v. 14, n. 3, p. R81, jan. 2012.
- COJOC, M. et al. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. **OncoTargets and therapy**, v. 6, p. 1347–61, jan. 2013.
- CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263–6, 27 jan. 2006.
- CORTEZ-RETAMOZO, V. et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 7, p. 2491–6, 14 fev. 2012.
- COUSSENS, L. M. et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. **Genes & Development**, v. 13, n. 11, p. 1382–1397, 1 jun. 1999.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–7, 2010.
- COUSSENS, L. M.; ZITVOGEL, L.; PALUCKA, A. K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6117, p. 286–91, 18 jan. 2013.
- CRUMP, M. P. et al. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. **The EMBO journal**, v. 16, n. 23, p. 6996–7007, 1 dez. 1997.
- CUI, K. et al. The CXCR4-CXCL12 pathway facilitates the progression of pancreatic cancer via induction of angiogenesis and lymphangiogenesis. **The Journal of surgical research**, v. 171, n. 1, p. 143–50, nov. 2011.
- CURIEL, T. J. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nature medicine**, v. 10, n. 9, p. 942–9, set. 2004.
- CURIEL, T. J. Regulatory T cells and treatment of cancer. **Current opinion in immunology**, v. 20, n. 2, p. 241–6, abr. 2008.
- D'INCALCI, M. et al. Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. **British journal of cancer**, v. 111, n. 4, p. 646–50, 12 ago. 2014.

DAHLKE, E. et al. Systematic review of melanoma incidence and prognosis in solid organ transplant recipients. **Transplantation research**, v. 3, n. 1, p. 10, jan. 2014.

DANAI, P. A. et al. The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. **Chest**, v. 129, n. 6, p. 1432–40, jun. 2006.

DANNENMANN, S. R. et al. Tumor-associated macrophages subvert T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 3, p. e23562, 1 mar. 2013.

DE MONTE, L. et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 3, p. 469–78, 14 mar. 2011.

DEBNATH, B. et al. Small molecule inhibitors of CXCR4. **Theranostics**, v. 3, n. 1, p. 47–75, jan. 2013.

DELANO, M. J. et al. Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 2, p. 911–8, 15 jul. 2011.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Critical care medicine**, v. 41, n. 2, p. 580–637, fev. 2013.

DING, Z. et al. Up-regulation of functional CXCR4 expression on human lymphocytes in sepsis. **Critical care medicine**, v. 34, n. 12, p. 3011–7, dez. 2006.

DITTMER, J.; LEYH, B. The impact of tumor stroma on drug response in breast cancer. **Seminars in cancer biology**, 6 jun. 2014.

DOMBROVSKIY, V. Y. et al. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. **Critical care medicine**, v. 35, n. 5, p. 1244–50, maio 2007.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 137–48, ago. 2004.

ELINAV, E. et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 11, p. 759–71, nov. 2013.

FAN, H. et al. Beneficial effect of a CXCR4 agonist in murine models of systemic inflammation. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 130–7, fev. 2012.

FENG, Y. et al. Pillars article: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996. 272: 872-877. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 11, p. 6076–81, 1 jun. 2011.

- GALLIMORE, A M.; SIMON, A K. Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5886–93, 6 out. 2008.
- GERMANO, G. et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. **Cancer cell**, v. 23, n. 2, p. 249–62, 11 fev. 2013.
- GHEORGHEOSU, D.; DEHELEAN, C. Development of the B16 murine melanoma model. **Annals of RSCB**, v. XVI, n. 2, 2011.
- GHOSH, M. C. et al. Activation of Wnt5A signaling is required for CXC chemokine ligand 12-mediated T-cell migration. **Blood**, v. 114, n. 7, p. 1366–73, 13 ago. 2009.
- GREER, L. F.; SZALAY, A. A. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. **Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence**, v. 17, n. 1, p. 43–74, 2002.
- GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–99, 19 mar. 2010.
- HAABETH, O. A. W.; BOGEN, B.; CORTHAY, A. A model for cancer-suppressive inflammation. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 7, p. 1146–1155, 1 out. 2012.
- HAGEMANN, T. et al. “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 6, p. 1261–8, 9 jun. 2008.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.
- HIRBE, A. C.; MORGAN, E. A.; WEILBAECHER, K. N. The CXCR4/SDF-1 chemokine axis: a potential therapeutic target for bone metastases? **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 11, p. 1284–90, jan. 2010.
- HODI, F. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 8, p. 711–723, 2010.
- HOTCHKISS, R. S. et al. Depletion of Dendritic Cells, But Not Macrophages, in Patients with Sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 5, p. 2493–2500, 1 mar. 2002.
- HOTCHKISS, R. S.; MOLDAWER, L. L. Parallels between cancer and infectious disease. **The New England journal of medicine**, v. 371, n. 4, p. 380–3, 24 jul. 2014.
- HOWLADER, N. et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011**. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/>.
- HU, M. et al. Decreased intratumoral Foxp3 Tregs and increased dendritic cell density by neoadjuvant chemotherapy associated with favorable prognosis in advanced gastric cancer.

International journal of clinical and experimental pathology, v. 7, n. 8, p. 4685–94, jan. 2014.

HUDSON, J. D. et al. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 10, p. 1375–82, 15 nov. 1999.

IMTIYAZ, H. Z. et al. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 8, p. 2699–714, ago. 2010.

JACOB, D.; DAVIS, J.; FANG, B. Xenograftic tumor models in mice for cancer research, a technical review. **Gene Ther Mol Biol**, v. 8, p. 213–219, 2004.

JENKINS, S. J. et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 332, n. 6035, p. 1284–8, 10 jun. 2011.

JENSEN, T. O. et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 20, p. 3330–7, 10 jul. 2009.

JOHNS, J. L.; CHRISTOPHER, M. M. Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals. **Veterinary pathology**, v. 49, n. 3, p. 508–23, maio 2012.

JOYCE, J. A; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239–52, abr. 2009.

KAHN, J. et al. Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation. **Blood**, v. 103, n. 8, p. 2942–9, 15 maio 2004.

KARIN, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 431–6, 25 maio 2006.

KETCHAM, A. et al. The development of spontaneous metastases after the removal of a “primary” tumor. II. Standardization protocol of 5 animal tumors. **Cancer**, v. 14, p. 875–82, 1961.

KNOWLES, H.; HARRIS, A. L. Macrophages and the hypoxic tumour microenvironment. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 4298–4314, 2007.

KOVRT, H. E. et al. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. **PLoS medicine**, v. 2, n. 9, p. e284, set. 2005.

KOONTONGKAEW, S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. **Journal of Cancer**, v. 4, n. 1, p. 66–83, jan. 2013.

KRÓL, M. et al. Macrophages mediate a switch between canonical and non-canonical Wnt pathways in canine mammary tumors. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e83995, jan. 2014.

LANGER, C. J. Emerging Immunotherapies in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): The Role of Immune Checkpoint Inhibitors. **American journal of clinical oncology**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 28 mar. 2014.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical care medicine**, v. 31, n. 4, p. 1250–6, abr. 2003.

LEVY, M. M. et al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. **Intensive care medicine**, v. 36, n. 2, p. 222–31, fev. 2010.

LEWIS, C.; MURDOCH, C. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. **The American journal of pathology**, v. 167, n. 3, p. 627–35, set. 2005.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–33, jan. 2007.

LIN, E. Y. et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. **Cancer research**, v. 66, n. 23, p. 11238–46, 1 dez. 2006.

LOBERG, R. D. et al. CCL2 as an Important Mediator of Prostate Cancer Growth In Vivo through the Regulation of Macrophage Infiltration. **Neoplasia**, v. 9, n. 7, p. 556–562, jul. 2007.

MA, Q. et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9448–53, 4 ago. 1998.

MAHONEY, K. H.; HEPPNER, G. H. FACS analysis of tumor-associated macrophage replication: differences between metastatic and nonmetastatic murine mammary tumors. **Journal of leukocyte biology**, v. 41, n. 3, p. 205–11, mar. 1987.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–555, 1 nov. 2002.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436–444, 24 jul. 2008.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in cancer biology and therapy. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 1, p. 27–39, fev. 2010.

MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, n. 4, p. 453–61, jan. 2008.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime reports**, v. 6, n. March, p. 13, jan. 2014.

MASCILINI, F. et al. Clinical utility of trabectedin for the treatment of ovarian cancer: current evidence. **OncoTargets and therapy**, v. 7, p. 1273–84, jan. 2014.

MCCLURE, C. et al. MicroRNA 21 (miR-21) and miR-181b couple with NFI-A to generate myeloid-derived suppressor cells and promote immunosuppression in late sepsis. **Infection and immunity**, v. 82, n. 9, p. 3816–25, set. 2014.

MELLMAN, I.; COUKOS, G.; DRANOFF, G. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 480–9, 22 dez. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Atlas on-line de Mortalidade Instituto Nacional do Câncer**. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.: [s.n.]. Disponível em: <<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo02/consultar.xhtml;jsessionid=83305A865168B14569C208314BEE4342#>>. Acesso em: 4 dez. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil (INCA, Ed.) Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=1>>. Acesso em: 4 dez. 2014.

MUKHOPADHYAY, S. et al. MARCO, an innate activation marker of macrophages, is a class A scavenger receptor for Neisseria meningitidis. **European journal of immunology**, v. 36, n. 4, p. 940–9, abr. 2006.

MÜLLER, A. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 50–6, 1 mar. 2001.

MURPHY, P. M. et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 1, p. 145–76, mar. 2000.

NASCIMENTO, D. C. et al. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. **Critical care medicine**, v. 38, n. 8, p. 1718–25, ago. 2010.

NASCIMENTO, D. C. **Participação da interleucina-33 e citocinas do tipo 2 na ativação alternativa de macrófagos e no estabelecimento da imunossupressão induzida pela sepse**. [s.l.] Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.

NAUTS, H. C.; SWIFT, W. E.; COLEY, B. L. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research. **Cancer research**, v. 6, p. 205–16, abr. 1946.

NEYEN, C. et al. Macrophage scavenger receptor a promotes tumor progression in murine models of ovarian and pancreatic cancer. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 7, p. 3798–805, 1 abr. 2013.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 49–61, jul. 2014.

NOZAWA, H.; CHIU, C.; HANAHAN, D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 33, p. 12493–8, 15 ago. 2006.

OJALVO, L. S. et al. Gene expression analysis of macrophages that facilitate tumor invasion supports a role for Wnt-signaling in mediating their activity in primary mammary tumors. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 184, n. 2, p. 702–12, 15 jan. 2010.

OMS. **Who Cancer Day 2013**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.who.int/cancer>. Acesso em: 4 dez. 2014.

OSAWA, R.; SINGH, N. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: a systematic review. **Critical care (London, England)**, v. 13, n. 3, p. R68, jan. 2009.

OTTO, G. P. et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. **Critical care (London, England)**, v. 15, n. 4, p. R183, jan. 2011.

PIETRAS, K.; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Experimental cell research**, v. 316, n. 8, p. 1324–31, 1 maio 2010.

QUARTIN, A. A. et al. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. **JAMA**, v. 277, n. 13, p. 1058–63, 2 abr. 1997.

RIABOV, V. et al. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. **Frontiers in physiology**, v. 5, n. March, p. 75, jan. 2014.

RIEDY, M. C.; STEWART, C. C. Inhibitory role of interleukin-6 in macrophage proliferation. **Journal of leukocyte biology**, v. 52, n. 1, p. 125–7, jul. 1992.

RIGO, A. et al. Macrophages may promote cancer growth via a GM-CSF/HB-EGF paracrine loop that is enhanced by CXCL12. **Molecular cancer**, v. 9, n. 1, p. 273, jan. 2010.

RISS, J. et al. Cancers as wounds that do not heal: differences and similarities between renal regeneration/repair and renal cell carcinoma. **Cancer research**, v. 66, n. 14, p. 7216–24, 15 jul. 2006.

RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–6, jan. 2009.

SACCANI, A. et al. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. **Cancer research**, v. 66, n. 23, p. 11432–40, 1 dez. 2006.

- SALES-JÚNIOR, J. A. L. S. et al. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de terapia intensiva Brasileiras * An Epidemiological Study of Sepsis in Intensive. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, p. 9–17, 2006.
- SCHÄFER, M.; WERNER, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 8, p. 628–38, ago. 2008.
- SCHIOPPA, T. et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, n. 9, p. 1391–402, 3 nov. 2003.
- SEBBAGH, M.; BORG, J.-P. Insight into planar cell polarity. **Experimental cell research**, v. 328, n. 2, p. 284–295, 1 nov. 2014.
- SHAND, F. H. W. et al. Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 21, p. 7771–6, 27 maio 2014.
- SHERSTON, S. N. et al. Predictors of cancer risk in the long-term solid-organ transplant recipient. **Transplantation**, v. 97, n. 6, p. 605–11, 27 mar. 2014.
- SHERWOOD, V. WNT Signaling: an Emerging Mediator of Cancer Cell Metabolism? **Molecular and cellular biology**, v. 35, n. 1, p. 2–10, 1 jan. 2015.
- SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in cancer biology**, v. 18, n. 5, p. 349–55, out. 2008.
- SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. **Cancer letters**, v. 267, n. 2, p. 204–15, 28 ago. 2008a.
- SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. **Cancer letters**, v. 267, n. 2, p. 204–15, 28 ago. 2008b.
- SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 1, p. 9–29, 2014.
- SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical care (London, England)**, v. 8, n. 4, p. R251–60, ago. 2004.
- SKOBE, M.; FUSENIG, N. E. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 3, p. 1050–5, 3 fev. 1998.
- SMYTH, G. K. Limma: Linear Models for Microarray Data. In: GENTLEMAN, R. et al. (Eds.). **Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor**. New York: Springer, 2005. p. 397–420.
- SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 86, n. 5, p. 1065–73, nov. 2009.

- STEINHAUSER, M. L. et al. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 1, p. 392–9, 1 jan. 1999.
- TANG, X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. **Cancer letters**, v. 332, n. 1, p. 3–10, 10 maio 2013.
- TASHIRO, K. et al. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. **Science (New York, N.Y.)**, v. 261, n. 5121, p. 600–3, 30 jul. 1993.
- TEICHER, B. A; FRICKER, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 16, n. 11, p. 2927–31, 1 jun. 2010.
- THELEN, M.; THELEN, S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? **Journal of neuroimmunology**, v. 198, n. 1-2, p. 9–13, 31 jul. 2008.
- TOMIOKA, H. et al. Characteristics of suppressor macrophages induced by mycobacterial and protozoal infections in relation to alternatively activated M2 macrophages. **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, p. 635451, jan. 2012.
- TYMOSZUK, P. et al. In situ proliferation contributes to accumulation of tumor-associated macrophages in spontaneous mammary tumors. **European journal of immunology**, v. 44, n. 8, p. 2247–62, ago. 2014.
- VINCENT, J.-L.; MARTINEZ, E. O.; SILVA, E. Evolving concepts in sepsis definitions. **Critical care clinics**, v. 25, n. 4, p. 665–75, vii, out. 2009.
- WANG, J. et al. Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 52, p. 49236–43, 28 dez. 2001.
- WANG, W. et al. Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. **Trends in cell biology**, v. 15, n. 3, p. 138–45, mar. 2005.
- WANG, Y.-C. et al. Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. **Cancer research**, v. 70, n. 12, p. 4840–9, 15 jun. 2010.
- WEYCKER, D. et al. Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. **Critical care medicine**, v. 31, n. 9, p. 2316–23, set. 2003.
- WILLIAMS, M. D. et al. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. **Critical care (London, England)**, v. 8, n. 5, p. R291–8, out. 2004.
- WOLCHOK, J. D. et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 2, p. 122–33, 11 jul. 2013.

YAMAGUCHI, H.; PIXLEY, F.; CONDEELIS, J. Invadopodia and podosomes in tumor invasion. **European journal of cell biology**, v. 85, n. 3-4, p. 213–8, abr. 2006.

ZABEL, B. A et al. Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 5, p. 3204–11, 1 set. 2009.

ZAGZAG, D. et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 86, n. 12, p. 1221–32, dez. 2006.

ZEISBERGER, S. M. et al. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. **British journal of cancer**, v. 95, n. 3, p. 272–81, 7 ago. 2006.

ZHANG, Q. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e50946, jan. 2012.

ZOU, L. et al. Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. **Cancer research**, v. 64, n. 22, p. 8451–5, 15 nov. 2004.

ZOU, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 4, p. 263–74, abr. 2005.

APÊNDICES E ANEXOS

9. APÊNDICES

9.1. TABELA DE QUALIDADE DOS RNA ISOLADOS E RNA ESCOLHIDOS

Grupo	Experimento	Amostra	A260/280	A260/230	Selecionado
TAM naïve	1	1	1,534	0,367	não
TAM naïve	1	2	1,639	0,364	não
TAM CLP	1	1	1,277	0,589	não
TAM CLP	1	2	1,425	0,207	não
TAM naïve	2	1	1,965	0,773	não
TAM naïve	2	2	1,172	0,329	não
TAM naïve	2	3	1,826	0,973	sim
TAM CLP	2	1	1,739	0,436	não
TAM CLP	2	2	1,683	0,279	não
TAM CLP	2	3	1,674	1,38	não
TAM naïve	3	1	1,774	0,407	não
TAM naïve	3	2	-0,714	-0,014	não
TAM naïve	3	3	1,417	0,274	não
TAM naïve	3	4	1,833	0,09	não
TAM CLP	3	1	1,638	0,421	não
TAM CLP	3	2	1,355	0,015	não
TAM CLP	3	3	1,912	0,396	sim
TAM CLP	3	4	1,599	0,125	não
M0 naïve	4	1	1,885	2,042	sim
M0 naïve	4	2	1,885	1,909	sim
M0 naïve	4	3	1,879	1,434	não
M0 naïve	4	4	1,881	2,431	sim
M0 naïve	4	5	1,904	3,031	sim
M1	4	1	1,879	2,07	sim
M1	4	2	1,769	-2,272	não
M1	4	3	1,87	2,18	sim
M1	4	4	1,874	0,655	sim
M1	4	5	1,873	2,122	sim
M2	4	1	1,899	1,031	não
M2	4	2	1,918	2,16	sim
M2	4	3	1,969	3,82	sim
M2	4	4	1,936	2,241	sim
M2	4	5	1,946	1,867	sim
M0 CLP	4	1	1,84	1,84	sim
M0 CLP	4	2	1,923	2,22	sim
M0 CLP	4	3	1,814	2	sim
M0 CLP	4	4	1,765	1,23	não
M0 CLP	4	5	1,886	2,159	sim
TAM naïve	5	1	1,903	4,678	não
TAM naïve	5	2	1,882	1,6	sim

Grupo	Experimento	Amostra	A260/280	A260/230	Selecionado
TAM naïve	5	3	1,95	2,22	sim
TAM naïve	5	4	2,018	1,949	sim
TAM CLP	5	1	1,87	1,654	sim
TAM CLP	5	2	1,629	1,875	sim
TAM CLP	5	3	2,08	2,263	não
TAM CLP	5	4	1,735	11,9	não
TAM CLP	5	5	1,365	0,073	não

9.2. TABELA DE POSICIONAMENTO DOS RNA SELECIONADOS NAS LÂMINAS PARA ANÁLISE DE *MICROARRAY*

Lâmina/Posição	Grupo	Experimento	Amostra
Lâmina 1 - Posição 1	M2	4	5
Lâmina 1 - Posição 2	TAM CLP	5	3
Lâmina 1 - Posição 3	M1	4	3
Lâmina 1 - Posição 4	TAM naïve	2	3
Lâmina 1 - Posição 5	TAM CLP	5	1
Lâmina 1 - Posição 6	M2	4	3
Lâmina 1 - Posição 7	TAM naïve	5	3
Lâmina 1 - Posição 8	M0 naïve	4	2
Lâmina 2 - Posição 1	M0 naïve	4	4
Lâmina 2 - Posição 2	TAM naïve	5	4
Lâmina 2 - Posição 3	M2	4	4
Lâmina 2 - Posição 4	M0 CLP	4	3
Lâmina 2 - Posição 5	M0 naïve	4	5
Lâmina 2 - Posição 6	M1	4	1
Lâmina 2 - Posição 7	TAM CLP	3	3
Lâmina 2 - Posição 8	M0 CLP	4	1
Lâmina 3 - Posição 1	M0 CLP	4	2
Lâmina 3 - Posição 2	M2	4	2
Lâmina 3 - Posição 3	M0 naïve	4	1
Lâmina 3 - Posição 4	M1	4	5
Lâmina 3 - Posição 5	TAM naïve	5	2
Lâmina 3 - Posição 6	M0 CLP	4	5
Lâmina 3 - Posição 7	TAM CLP	5	2
Lâmina 3 - Posição 8	M1	4	4

9.3. TABELA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA ANÁLISE DE MICROARRAY (GRUPO TAM PÓS-SEPSE *VERSUS* TAM NAÏVE)

<i>Rank</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i>
1	Mm.458003	-4.75676804588118	0.0011
2	Mm.458003	-4.40555663642324	0.0004
3	Ighm	-3.03124482194565	0.0004
4	Cd2	-2.90732275506367	0.0028
5	Ltb	-2.87799914824734	0.003
6	Ccr7	-2.75910103186935	0.0017
7	Gpr132	-2.57479406711084	0.0013
8	Ifitm1	-2.46302129544764	0.007
9	Retnlg	-2.45229325295019	0.0072
10	Ifitm1	-2.44479929141797	0.0074
11	P2ry10	-2.35297019188179	0.0021
12	Cd83	-2.34744590625918	0.0018
13	Cd52	-2.23375796505854	0.0021
14	Sorl1	-2.23088858495022	0.0097
15	Hmha1	-2.18120613176102	0.0017
16	Mcpt4	-2.18005323237091	0.0031
17	Lilra6	-2.1663176266787	0.01
18	H2-DMb1	-2.14199580902949	0.0017
19	Tcrb-J	-2.14074622562786	0.0022
20	Itgb7	-2.13486614158349	0.0011
21	Gm14548	-2.10725764533485	0.0072

<i>Rank</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i>
22	Cd24a	-2.10092187437442	0.0067
23	Nfkbid	-2.08486400214162	0.0038
24	Cytip	-2.08092927466215	0.0045
25	A_55_P2038452	-2.08070630757463	0.0037
26	Fgd3	-2.04815950893294	0.0031
27	Pira7	-2.03684392063207	0.0093
28	Snx20	-2.0366996241773	0.0038
29	AI790276	-2.0046267860613	0.0017
30	Arhgap4	-1.99971412821203	0.001
31	Rac2	-1.99868426111844	0.0076
32	Cyp4f18	-1.99726526031519	0.0034
33	Myo1g	-1.9503412501666	0.0018
34	Ncf4	-1.93437091161804	0.0068
35	Pmaip1	-1.90973362674121	0.002
36	A430104N18Rik	-1.90578902106742	0.0055
37	Gmfg	-1.89503023801536	0.0013
38	Wdfy4	-1.89290159578259	0.0016
39	Coro1a	-1.88060709154098	0.0083
40	Ramp3	-1.87273229059157	0.0004
41	Hcst	-1.82987248335588	0.0031
42	Cd74	-1.81532995356565	0.0026
43	H2-Eb1	-1.81508786064638	0.0017
44	Cd86	-1.80275859960415	0.002

<i>Rank</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i>
45	Cd300ld	-1.79359885370097	0.01
46	Satb1	-1.78692756234018	0.002
47	ENSMUST00000096862	-1.77106127770786	0.0042
48	Traf1	-1.76539366798279	0.0047
49	6330407A03Rik	-1.75325225382664	0.0083
50	H2-Ab1	-1.74531196604591	0.0027
51	Csf2rb	-1.73719709350665	0.0079
52	Ramp3	-1.73065715656961	0.001
53	Ccdc88b	-1.72701350643822	0.0031
54	A_55_P2066017	-1.7197366351271	0.0018
55	Cd6	-1.70544745121297	0.0011
56	Selplg	-1.70045526912832	0.0017
57	Cyp4f18	-1.69495811141695	0.0072
58	Cd3d	-1.67922649147629	0.0017
59	H2-Ab1	-1.67757204175041	0.0051
60	Plbd1	-1.64293385626537	0.0083
61	Nlrp1a	-1.62689652012707	0.0072
62	Cxcr4	-1.62078492839879	0.0064
63	Marco	1.6176	0.0067
64	Cd5	-1.61487642008264	0.0067
65	Rhof	-1.60768916801834	0.0022
66	H2-Ob	-1.59584113825878	0.0059
67	Cpa3	-1.57318201543962	0.0018

<i>Rank</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i>
68	Gimap6	-1.57039309041738	0.0093
69	Btg1	-1.57036405356722	0.007
70	Itk	-1.53371394565941	0.0027
71	Il2rb	-1.50649490780836	0.0017
72	C130026I21Rik	-1.48782463800167	0.0031
73	Il4i1	-1.44373949157213	0.0079
74	Ccl5	-1.44092179184186	0.0074
75	Stap1	-1.4389239934871	0.0067
76	Cd209a	-1.42103235536697	0.0063
77	Il6ra	-1.41344223533977	0.0072
78	Arhgap15	-1.41321057812475	0.0098
79	A_55_P2180861	-1.39731568768095	0.0092
80	Rgs2	-1.36692891270498	0.0047
81	A_55_P2011341	-1.35445581435452	0.0087
82	Lair1	-1.35363326710578	0.0044
83	Tnfrsf18	-1.32236054632397	0.01
84	Stat4	-1.30100574164094	0.0072
85	Sp140	-1.24135461517863	0.0047
86	Chaf1a	1.2383	0.0079
87	Zfp532	1.2202	0.0024
88	Zap70	-1.2187094889396	0.0087
89	Ppap2a	1.2148	0.0027
90	Ccdc6	1.207	0.0079

<i>Rank</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i>
91	St8sia4	-1.20490530192446	0.0027
92	Ttl12	-1.13786182607086	0.0074
93	Fzd9	1.1343	0.0026
94	Cd7	-1.13239986273924	0.0017
95	Acox3	-1.10148743688511	0.0093
96	Sytl3	-1.09052383068385	0.0079
97	Tbc1d10c	-1.08503929611308	0.0031
98	A_55_P1996431	1.0677	0.0083
99	Lat	-1.06297395064643	0.0093
100	Slc6a17	1.05	0.0027
101	Cdc6	1.0478	0.0099
102	Rhobtb3	1.0462	0.006
103	Dnahc7a	1.0371	0.0071
104	Trim12a	-1.02081926818491	0.0072
105	Gm4902	-1.00331979458361	0.001
106	Aif1l	1.0013	0.0031
107	C130071C03Rik	1.0005	0.0072
108	Csprs	-1.00021788081098	0.0075
109	Sall2	0.9873	0.0044
110	Crlf2	-0.971798987831935	0.0057
111	Fzd6	0.9702	0.0077
112	Filip1	0.9671	0.002
113	AI467606	-0.967073254224418	0.0049

<i>Rank</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i>
114	Plxnb1	0.9594	0.0051
115	Atp8b4	-0.958052617941357	0.0072
116	Bcat1	0.9256	0.0098
117	Sec14l2	0.9238	0.0055
118	Lyplal1	0.9148	0.0086
119	Hunk	0.9147	0.0017
120	Klra22	-0.913472157856542	0.007
121	Alx1	0.897	0.0032
122	Cc2d2a	0.8857	0.0063
123	Dnaic2	0.8851	0.0093
124	Gpr114	-0.880423145820481	0.0018
125	Exo1	0.8775	0.0084
126	Aldh3b1	0.8613	0.007
127	Casc4	0.8519	0.007
128	Inadl	0.8442	0.0027
129	Tap2	-0.84082810110346	0.0049
130	Tnik	0.8371	0.0011
131	Flt3	-0.829609799575122	0.0017
132	D630045J12Rik	0.8285	0.0016
133	Gpm6a	0.8254	0.0031
134	Ddah1	0.822	0.0049
135	Cpt1c	0.8153	0.0049
136	Nrip3	0.8078	0.0021

<i>Rank</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i>
137	Kctd1	0.7953	0.0084
138	Nkd2	0.7862	0.0045
139	Uggt2	0.7839	0.0027
140	Sh3bp4	0.7765	0.0067
141	C530008M17Rik	0.7753	0.01
142	Acta1	0.7633	0.0049
143	Lmo7	0.7514	0.0023
144	Abcc2	0.751	0.0093
145	Hoxa11	0.735	0.0017
146	Fam18a	0.7322	0.01
147	Sgip1	0.7187	0.0031
148	Dcbld1	0.7098	0.0079
149	Tmem98	0.7084	0.0098
150	Hoxa5	0.7032	0.0027
151	Daam2	0.6979	0.0073
152	Bicd1	0.6894	0.0011
153	Frem1	0.6892	0.007
154	A_55_P1957993	0.688	0.0099
155	Kif7	0.6857	0.0067
156	Kcnmb4	0.6764	0.0034
157	Arhgef5	0.6761	0.0011
158	Calr4	0.6752	0.0027
159	Dok7	0.636	0.0097

<i>Rank</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i>
160	Ctnnbip1	0.627	0.0086
161	Stx1a	0.6247	0.01
162	Pydc3	-0.621975245469535	0.006
163	Gli3	0.6044	0.0072
164	Smoc1	0.6036	0.0079

10. ANEXOS

10.1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO</p> <p>Comissão de Ética em Experimentação Animal</p> <p>3602-3301</p>
---	---	---

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 141/2012, sobre o projeto intitulado “*Melanoma B16F10 em camundongos sobreviventes a sepse: papel de linfócitos T reguladores na modulação de macrófagos associados ao tumor*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Eduardo Magalhães Rego** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 28 de janeiro de 2013.

We certify that the protocol nº 141/2012, entitled “*B16F10 melanoma in post-septic mice: role of regulatory T lymphocytes in modulating tumor associated macrophages*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 01/28/2013.

Ribeirão Preto, 28 de janeiro de 2013.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP

MANUSCRITO

11. MANUSCRITO

Trabalho enviado para a revista Cancer Immunology Research.

Title: Post-sepsis state induces tumor-associated macrophage accumulation through CXCR4/CXCL12 and favors tumor progression in mice

Authors: José Maurício Segundo Correia Mota ^{1,2}, Caio Abner Vitorino Leite ², Lucas Eduardo Botelho de Souza ³, Paulo Henrique Melo ², Daniele Carvalho Bernardo Nascimento ², Virginia Mara de Deus Wagatsuma ^{1,4}, Jessica Temporal ⁴, Florêncio Figueiredo Cavalcanti-Neto ⁵, Houtan Noushmehr ⁴, José Carlos Farias Alves-Filho ², Fernando de Queiroz Cunha ², Eduardo Magalhães Rego ¹.

Authors' Affiliations: ¹Hematology/Oncology Division, Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; ²Laboratory of Inflammation and Pain, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; ³Laboratory of Gene Transfer, Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo; ⁴OMICS Laboratory, Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, ⁵Laboratory of Pathology, Department of Pathology, University of Brasília

Running title: Role of TAM in post-sepsis tumor progression

Key words: tumor progression, post-sepsis, tumor-associated macrophage, CXCL12, CXCR4

Corresponding author: Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego. Hematology/Oncology Division, Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. 3900 Bandeirantes Ave. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. 14048-900. Phone: +55 16 21019361. Email: emrego@hcrp.fmrp.usp.br.

ABSTRACT

Survivors from sepsis present an immunosuppressive state that was associated with higher long-term mortality and risk of opportunistic infections, however whether it contributes to neoplastic proliferation remains unclear. Tumor-associated macrophages (TAM) are demonstrated to support malignant cells proliferation, survival and angiogenesis. We addressed the relationship between post-sepsis state, tumor progression and TAM accumulation, phenotype and genetic profile, using a model of B16 melanoma after the resolution of sepsis in mice. In addition, we characterized the serum concentrations of TNF- α , TGF- β , CCL2 and CXCL12, and determined the effect of *in vivo* CXCR4/CXCL12 inhibition in this context. Sepsis-surviving mice showed increased tumoral progression both in short and long term and shorter survival. There was increased TAM accumulation, TAM local proliferation and serum levels of TGF- β , CXCL12 and TNF- α . Naïve mice inoculated with B16 together with macrophages from post-sepsis mice presented higher tumoral progression and shorter survival. TAM from post-sepsis presented decreased expression of MHC-II and leukocyte activation-related genes. The inhibition of CXCR4/CXCL12 prevented the post-sepsis-induced tumor progression, TAM accumulation and TAM *in situ* proliferation. Collectively, our data shows that post-sepsis state was associated with TAM accumulation through CXCR4/CXCL12, which contributed to B16 melanoma progression.

INTRODUCTION

Sepsis is a worldwide leading cause of mortality (1), and despite the fact that the implementation of early-goals based approaches have positively impacted in the outcome (2), patients who survive from a first sepsis episode remain for a long term under a higher relative risk of death (3,4) and of opportunistic infections (5). Post-sepsis state has been associated with an increased immunosuppressive phenotype of T regulatory lymphocytes (Tregs) (6), macrophages and dendritic cells (Munoz et al., 1991; Hotchkiss et al., 2013a). Döcke and colleagues reported the monocyte/macrophage dysfunction that occurs after sepsis, which was characterized by human leukocyte antigens (HLA) down-regulation and low tumor necrosis factor (TNF) production. Accordingly, Takahashi and colleagues showed that post-sepsis induced alternatively activated macrophages (M2-polarized) with no antibacterial activity in mice (10).

One important issue is to determine if the post-sepsis immunosuppressive state increases the incidence or affects the evolution of neoplasms, similarly to what has been observed in organ recipients under immunosuppressive treatments (11). Cavassani and colleagues reported that the post-sepsis state resulted in the increase of tumor expansion in a Lewis carcinoma model (12). Post-sepsis shares several mechanisms implicated in the development of pro-tumoral microenvironment described in cancer (13). This supports the idea of a link between increased tumor progression in post-sepsis and microenvironmental changes.

The tumor inflammatory stroma, which contains tumor associated macrophages (TAM), neutrophils, dendritic cells, lymphocytes, pericytes and fibroblasts provides a number of distinct and complexes mediators and mechanisms proved to promote tumor growth, adjacent tissue invasion and metastasis (14–16). In this context, TAM act as major players of

tumor progression stimulating cell proliferation, survival, angiogenesis and immune escape (17). Clinically, TAM accumulation has been demonstrated to be a predictor of mortality in several cancer types (18).

Among the mechanisms associated with TAM accumulation, CCL2 has been classically implicated in early monocyte recruitment to the tumor microenvironment (19). In addition, Tymoszuk and colleagues recently reported the contribution of *in situ* TAM proliferation using a mouse model of spontaneous breast cancer (20). On the other hand, CXCR4/CXCL12 axis is important to keep TAM in tumoral hypoxic areas, thus contributing for neoangiogenesis and oxygen delivery (21,22).

In order to evaluate the relationship between post-sepsis state, tumor progression and TAM we analyzed intratumoral macrophage accumulation, phenotype and genetic profile using a model of B16 melanoma expansion after the resolution of cecal and ligation-induced sepsis in mice.

MATERIALS AND METHODS

Mice

6-8-wk-old male C57BL/6 mice were obtained from the animal facility of the Ribeirão Preto Medical School, kept in appropriate cages in temperature-controlled rooms with 12 h dark-light cycles and received food and water *ad libitum*. The experimental protocols and procedures were previously approved by the local Ethics Committee (protocol number: 141/2012) and were in accordance with the Declaration of Helsinki and the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Cells

B16-F10-luc (B16, Caliper Lifesciences, Hopkinton, MA, USA) was cultured in RPMI containing 10% heat-inactivated FCS (Gibco, Grand Island, NY, USA), 100 UI/mL penicillin (Gibco), 0,1 mg/mL streptomycin (Gibco) and amphotericin B 2 µg/mL (Gibco). Prior to use, cells were detached with trypsin-EDTA 0,25% (Gibco) with 70%-80% of confluence and washed in PBS for two times.

Sepsis and post-sepsis model

Severe sepsis was induced by cecal and ligation puncture (CLP), as described elsewhere (23). To induce survival and post-sepsis state, animals were treated with ertapenem (20 mg/kg, ip., 6 h after surgery, and each 12 h for three days), as previously described (6). The controls received the same regimen of ertapenem.

Assays to evaluate tumor progression

Naïve or post-sepsis mice (15 days after CLP) were subcutaneously inoculated in the right flank with B16 melanoma. Different inoculums were tested (100,000; 30,000 or 10,000 cells) to determine the most suitable to our model. Tumor volumes were calculated as previously described (24). Tumor burden was measured through bioluminescence quantification (IVIS Lumina, Caliper Lifesciences) after D-luciferin (150 mg/kg, ip.). Overall survival was monitored for 50 days.

Assays to evaluate metastasis in post-sepsis mice

Mice received 30,000 cells s.c. 15 days after CLP induction. Animals were killed after 21 days and organs were harvested and scrutinized using magnification of 1000X in optical microscope (Zeiss, Germany) to detect spontaneous metastasis. We evaluated the rate of metastasis per organ and per mice. Also, we counted the number of metastatic sites in the lungs. In another set of experiments, post-sepsis (15 days after CLP) or naïve mice were inoculated with 30,000 cells (sc., right flank). Fourteen days after, primary tumors were surgically removed. Animals were then followed to assess mortality due to metastasis, as previously described (25). Additionally, post-sepsis or naïve mice were submitted to lung colonization assay (30,000 cells, injected i.v. through retro-orbital plexus). At D+18, mice were killed and *ex vivo* pulmonary tumor burden was measured through bioluminescent signal.

Tissue digestion and flow cytometry

Tumor-bearing post-sepsis or naïve mice were killed at D+14 and tumor was harvested. Tumor was digested using collagenase type II 1 mg/mL (Sigma) and DNase type I 0.1 mg/mL (Sigma) to prepare single cells suspension. Immunostaining was made with anti-CD45 (eBiosciences, CA, USA), -F4/80 (eBiosciences) and -CD206 (Abd Serotec, UK) for assessment of TAM accumulation through flow cytometry (FACS CANTO, BD Biosciences, NJ, USA). CXCR4 expression in TAM was evaluated using anti-CXCR4 (BD Biosciences). For measurement of TAM proliferation anti-Ki67 (BioLegend, CA, USA) was used. The data were analyzed using FCS Express 3.0 (De Novo software, CA, USA).

Immunofluorescence

TAM accumulation was also measured by immunofluorescence assay (Leica DMI6000 B, Leica microsystems) using anti-F4/80 (rat anti-mouse, 1:50, Caltag Laboratories, UK), followed by anti-rat Alexa Fluor 488 (1:100, Life Technologies, NY, USA). Nuclei were revealed with Hoechst 33342 (1 µg/mL, Life Technologies).. Total F4/80⁺ cells per field (magnification of 100 X) were quantified using Image J 1.44 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

ELISA

Serum and tumor and inguinal lymph nodes were harvested to detect IFN-γ, IL-10, TNF-α, TGF-β, CXCL12 and by ELISA CCL2 (Duo Set, R&D Systems kits, MN, USA). Results were expressed in pg/mL (serum or lymph node supernatant) or pg/protein (tumor).

TAM isolation

Single cells suspensions from tumors were prepared as described above. Next, tumor extracts were carefully submitted to a Percoll (Sigma) gradient (70%/30%) and centrifuged (1800 RPM, 23 min, 4° C). The lymphomononuclear correspondent layer was isolated, washed in PBS and diluted in 1% FBS supplemented-RPMI and cultured for 40 minutes at 37° C. Three vigorous washes ensured only the adherent cells remained in the plate. Prior to use, adherent cells were removed using a cell scraper. This method could reach a 70 to 80 % purity of TAM (CD45⁺F4/80⁺), as confirmed through flow cytometry.

RNA isolation from TAM

After that, RNA was isolated using a specific kit (Quick-RNA™ MicroPrep, Zymo Research, CA, USA), following manufacturer instructions. RNA concentrations and absorbance ratios (A260/A230 and A260/A280) were determined using NanoVue spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, UT, USA). The best 4 samples from 12 of each studied group were selected to further processing for microarray analysis.

RNA preparation for microarray

RNA preparation for microarray assay was made following manufacturer instructions (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). To isolate Cy-3 labeled-cRNA, we used RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA, USA). Quantifications were made using NanoVue (GE Healthcare Lifesciences). The concentrations of Cy3 (pmol/μL), cRNA (ng/μL) and 260/280 ratio were determined. cRNA were hybridized in microarray slides following two random sequential lotteries (Sure Print G3 Mouse Gene Expression 8x60k Microarray, G4852A, Agilent Technologies, Slide 1: 252800516673, Slide 2: 252800516674, Slide 3: 252800516788). Slides were scanned (G4900DA SureScan Microarray Scanner, Agilent Technologies) and data was extracted through Agilent Feature Extraction Software (Agilent Technologies).

Microarray data analysis

The microarray data was imported and analyzed using the *open source software tool, Bioconductor 3.0* (<http://www.bioconductor.org>). All statistical tests were done using R (version 3.1.1). We used limma package (26) to perform quality, normalization and differential analysis. Normalization was done applying *quantile* normalization, to ensure the

distribution of probe intensities for each sample in a set of arrays are the same. One sample replicate from TAM naïve group (TAM.naive, rep2) was identified as an outlier due to low RNA concentrations and poor genetic material quality and therefore was removed from subsequent downstream analysis. Principal Component Analysis (PCA) methods were used to identify the relationship between groups of samples. A list of differentially expressed genes was defined with a log2 fold of 0.58 or greater (for up-regulated genes) and -0.58 and less (for down-regulated genes) with a FDR < 0.01. Pathway analyses were analyzed using Nextbio database (<http://www.nextbio.com>). Hierarchical heatmaps were made using default parameters. All data were deposited for public access in Gene Expression Omnibus (GEO). The accession code is GSE64498.

Bone marrow-derived macrophage co-inoculation with B16 cells

Animals were killed by anesthetic overdose 15 days after sepsis and bone marrow cells were collected using a 26G syringe and 2 washes of 3 mL of RPMI through lower leg bones. Red blood cells were lysed and the remaining cells were cultured in 10 mL L929 medium (RPMI supplemented with 10% FBS and 20% of L929 supernatant). In the third day, 10 mL of L929 medium were added to the cultures. At the seventh day, the plates were washed with PBS to remove debris and dead cells, and adherent cells were removed using a cell scraper. Then, BMDM were subcutaneously co-inoculated with B16 cells in a proportion of 1:3 (10,000 and 30,000 cells, respectively) in naïve recipients. Tumor progression was assessed by tumor volumes and bioluminescent signal after D-luciferin (150 mg/kg, ip.) injection at D+21. Survival was evaluated daily until D+50.

Role of CXCR4/CXCL12 in TAM accumulation

In order to inhibit CXCR4/CXCL12 signaling, we designed an experiment in which 15-day CLP animals were inoculated with B16 (30,000 cells, sc.). Then, the animals were administered with the specific inhibitor AMD3100 (5 mg/kg, ip., at D+10 and D+15). Tumor progression, overall survival, TAM accumulation and TAM extra medullar proliferation at D+14 were measured.

Statistical analysis

All non-microarray data were analyzed with GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad software, CA, USA). Parametric data were tested with ANOVA followed by the Bonferroni post-test or Student's t test, when appropriate. Non-parametric data were analyzed using the Fisher's exact test and Kaplan-Meier curves were analyzed by log-rank test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Post-sepsis state was associated with increased tumor progression

In order to determine the number of cells needed to induce tumor, naïve and post-sepsis mice were inoculated with 10,000, 30,000 or 100,000 B16 melanoma cells 15 days after cecal and ligation puncture (CLP, see Methods). We observed tumor development in all mice that received 30,000 or 100,000 cells. Interestingly, only 40% of naïve mice developed macroscopic tumors until D+42 when inoculated with 10,000 B16 cells, in contrast to post-sepsis groups, in which 80% developed tumor (Fisher's exact test: $p = 0.02$; data not shown). Based on these results, we selected 30,000 B16 cells as the inoculum for further assays.

Post-sepsis mice showed increased tumor volumes and reduced overall survival (data not shown for 10,000 and 100,000 B16 cells). When inoculated with 30,000 B16 cells, significantly larger tumor volumes were detected in post-sepsis mice (**Figure 1A**), which presented shorter survival than naïve tumor-bearing controls (**Figure 1B**). The results were also confirmed by bioluminescence measurement (**Figures 1C and 1D**). Additionally, we did not detect differences in a blindfolded microscopic analysis of tumor necrosis and hemorrhage between naïve and post-sepsis mice (data not shown).

Moreover, the long-lasting effects of sepsis were evaluated by subcutaneously inoculating mice with 30,000 B16 cells 30 (**Figure S1, A and B**) or 60 days (**Figure S1, C and D**) after CLP. In both situations, post-sepsis groups presented larger tumors and shorter survival.

Post-sepsis state led to higher metastatic burden

Figure S2 depicts the used experimental protocols to evaluate metastasis and lung colonization. An increased number of spontaneous metastatic lesions in the lungs was observed at D+21 after inoculation in post-sepsis mice (**Figure S2, Panel B**). Mortality due to metastasis was evaluated by removing the primary tumors and following up the survival (See Methods). Mice did not present local recurrence of melanoma lesions. Increased mortality due to metastasis in post-sepsis group was detected (**Figure S2, Panel C**). In addition, lung colonization after 30,000 B16 cells intravenous injection was also increased in post-sepsis mice (**Figure S2, Panel D**), as evaluated by bioluminescence quantification at D+18.

Increased numbers of TAM in tumors from post-sepsis mice

First, we observed that the percentage of leukocytes (CD45⁺) was increased in tumor samples of sepsis-surviving animals (data not shown). Post-sepsis mice showed higher percentages of TAM at D+14 (**Figure 2A**) as well as absolute TAM numbers were increased (**Figure 2B**). The results were confirmed after gating on CD45⁺ cells (data not shown). Differences in TAM percentages were not detected at D+21 (**Figure 2C**), in contrast to the absolute numbers (**Figure 2D**). Representative plots are presented in **Figure 2E**. Immunofluorescence staining for F4/80⁺ cells in frozen tumor sections further demonstrated the higher TAM accumulation in post-sepsis mice (**Figure 2, Panels F-I**).

Furthermore, we observed increased percentages of Tregs in the spleen and draining lymph node of post-sepsis tumor bearing mice, but no differences in intratumoral Tregs (data not shown).

Serum levels of CXCL12, TNF- α and TGF- β were increased in post-sepsis tumor-bearing mice

In an attempt to understand the mechanism underlying the post-sepsis increase of TAM accumulation, we screened chemokines and cytokines related to the inflammatory process and to macrophage recruitment (**Figure 3**). The levels of CCL2 (**Figure 3B**) and CXCL12 (**Figure 3C**) were increased in the serum of post-sepsis mice injected with vehicle in comparison to naïve mice. The presence of the tumor by itself also increased CXCL12 levels (**Figure 3C**). Post-sepsis tumor-bearing mice compared to naïve injected with tumor cells, presented higher levels of TNF- α (**Figure 3D**), TGF- β (**Figure 3A**) and CXCL12 (**Figure 3C**). The levels of IFN- γ and IL-10 were not different among the groups (data not shown). We also quantified the same chemo/cytokines within the tumor mass of naïve and

post-sepsis mice. Only TNF- α concentrations were increased in tumor masses from post-sepsis mice (**Figure 3, Panels E-H**).

TAM from post-sepsis mice exhibit differences in gene expression

Since we have had demonstrated a quantitative early increase of TAM accumulation in post-sepsis mice, we decided to compare the global gene expression of TAM from naïve and post-sepsis mice using Agilent microarrays with almost 60,000 probes (39,430 mRNA and 16,251 long non coding RNAs). M1 and M2-polarized macrophages were used for comparison.

Figure 4A depicts the Principal Component Analysis for the aforementioned groups, using an unsupervised approach. The differences between TAM from naïve and TAM from post-sepsis were only mild and their gene expression profiles were distinct from M1 and M2-macrophages.

Then, we focused our analysis in the differences between TAM from post-sepsis and TAM from naïve mice. We identified 61 genes to be up-regulated and 98 genes to be down-regulated (**Table 1**) using log2 fold cutoffs at $|0.58|$ and adjusted p-value (False Discovery Rate) $< 1\%$ (**Figure 4B**). Among the down-regulated genes we detected genes associated with leukocyte activation (e.g. *Cd83*, which is a marker of dendritic cell maturation; *Cd86*, which is a marker of macrophage classic or M1 activation). Also, genes related to major histocompatibility complex type II (e.g. *H2-Eb1* and *H2-Ab1*) were down-regulated. Among chemokines-related genes, *Ccl5* and *Cxcr4* were down-regulated in TAM from post-sepsis mice.

Macrophages from post-sepsis mice facilitated tumor progression

In order to evaluate whether macrophages derived from post-sepsis mice could contribute to tumor progression, we co-inoculated bone marrow-derived macrophage (BMDM) from naïve or post-sepsis mice with B16 cells in naïve recipients (**Figure 5A**). BMDM from post-sepsis or naïve mice were primarily in a M0 as indicated by the low flow cytometric expression of CD206 and TNF- α (data not shown).

BMDM from post-sepsis led to larger tumor volumes (**Figure 5B**) and shorter overall survival (Figure 5C) of the recipients. All animals co-inoculated with BMDM from post-sepsis mice died within 50 days, whereas approximately 60% of animals co-inoculated with BMDM from naïve survived in the same time span. Tumor burden increase was confirmed by bioluminescence quantification at D+21 (**Figures 5D and 5E**).

CXCR4/CXCL12 inhibition reverted the increase of tumor progression and TAM accumulation associated with post-sepsis

Based on the increased levels of CXCL12 detected in the serum of post-sepsis mice, we investigated if the pharmacological inhibition of this pathway could reverse the effect of post-sepsis on tumor progression. AMD3100 administration, a specific antagonist of CXCR4/CXCL12 pathway was administered at D+10 and D+15 after B16 cell inoculation. As shown in **Figure 6A**, AMD3100 reverted the increase of post-sepsis-induced tumor volumes increase but resulted in non-significant changes in tumor volumes in the naïve group. Post-sepsis and naïve tumor-bearing mice that received AMD3100 presented longer overall survival than vehicle-treated controls (**Figure 6B**). The percentage of TAM expressing CXCR4 was similar between naïve and post-sepsis groups (**Figure 6C**). CXCR4/CXCL12

blockade through AMD3100 inhibited TAM accumulation associated with post-sepsis state (**Figure 6D and 6E**).

The percentage of TAM expressing Ki67 was increased in post-sepsis mice tumors and the inhibition of CXCR4/CXCL12 by AMD3100 reverted this finding. Of note, Ki67 levels were not increased in CD45⁺ cells (**Figure S3, Panels A-C**).

DISCUSSION

Here we describe the increase of melanoma B16 progression in sepsis surviving mice, which was associated with tumor microenvironmental TAM accumulation through CXCR4/CXCL12 signaling. In addition, post-sepsis state was associated with an increased spontaneous pulmonary metastatic burden and increased lung colonization. The effect of sepsis on B16 melanoma tumor progression proved to be long-lasting, since it was observed even when the neoplastic cells were inoculated after 30 or 60 days from CLP-induced sepsis. Accordingly, Weycker and colleagues have shown that patients with sepsis present an increased long-term mortality (3). Also, Otto and colleagues proved that sepsis survivors are at higher risk of opportunistic infections after a period between 16 to 150 days following sepsis resolution (5). If clinical post-sepsis state is associated with higher tumor incidence, tumor progression or metastasis still remains elusive.

TAM accumulation is a relevant marker of unfavorable prognosis in cancer (18). It has been associated to increased tumor progression, neoangiogenesis and immune escape in several tumor types (17,27). We assessed TAM (F4/80⁺CD206⁺) through flow cytometry and immunofluorescence and found it was heavily accumulated in post-sepsis mice tumors in an early stage of tumor progression (D+14) when the tumor size were not different between the

groups. In a later phase (D+21) relative amounts of TAM have shown no difference between the groups.

Classically, TAM accumulation depends on blood stream-derived monocyte infiltration mediated by CCL2, CCL7, VEGF and other cytokines (27–29). However, Tymoszuk and colleagues demonstrated *in situ* proliferation of CD11b^{lo}F4/80^{hi} cells through BrdU labeling and Ki67 staining in a model of spontaneous breast cancer (20). This suggests an important contribution of *in situ* TAM proliferation. Corroborating these findings, we observed that Ki67 positivity in TAM cells was increased in post-sepsis mice. This could represent a contribution of local macrophage proliferation for TAM accumulation in post-sepsis state.

We confirmed the importance of post-sepsis macrophage to tumor progression by co-inoculating BMDM together with B16 cells in naïve mice. Post-sepsis derived BMDM co-inoculation resulted in higher tumor progression and less overall survival. Cho and colleagues found that the inoculation of M2-polarized macrophage provoked increased progression and metastasis in a breast cancer model, possibly due to increased angiogenesis (30).

In order to check whether TAM from post-sepsis mice have acquired a M2-like phenotype, the global gene expression profile of isolated TAM was analyzed. The Principal Component Analysis showed a distinct clustering of TAM from naïve and TAM from post-sepsis mice. However, TAM from both groups did not present proximity neither to M2 or M1-macrophages. Sixty-one genes were up-regulated and 98 genes were down-regulated in post-sepsis-derived TAM compared to naïve-derived TAM. Genes related to M2-phenotype, such as *Il10*, *Arg1* and *Fizz1*, were not differentially expressed. Of note, *Marco*, a gene up-regulated in IL-10-induced M2-macrophages (31), showed higher expression in TAM from post-sepsis mice. However, it is unclear whether *Marco* is a M2-marker or a marker of innate

macrophage activation (32). On the other hand, reduced expression of leukocyte activation and major histocompatibility complex type II (MHC-II)-related genes were detected in these cells. In addition, *Cd86*, which is a co-stimulatory molecule-related gene, was down-regulated. The latter two molecules are more likely associated with M1 rather than M2-polarization (31).

Since TGF- β has been implicated in monocyte recruitment, monocyte-to-macrophage differentiation and acquisition of protumoral functions by TAM (33), we assessed its serum levels, which were increased in post-sepsis tumor bearing mice. In addition, CXCL12 serum levels were increased in these mice. Along this line, Wang and colleagues reported that TGF- β increases the response of CXCL12 chemotactic signaling (34). Based on these results, we tested whether CXCR4/CXCL12 inhibition through AMD3100 administration would affect tumor progression and TAM accumulation. Blocking signaling through CXCR4 *in vivo* reversed the effect of post-sepsis on tumor size and improved overall survival.

These findings were also associated with the reduction of TAM accumulation. CXCR4/CXCL12 is a known pathway implicated in TAM accretion in hypoxic areas of tumor microenvironment (22). Our results are in agreement with Beider and colleagues, who described that multiple myeloma cells recruit monocytes to their microenvironmental niche, differentiate them to macrophage and polarize into M2-like phenotype through CXCR4/CXCL12 (35). The impediment of TAM accumulation was, at least in part, dependent on the reduction of TAM extramedullary proliferation, since we observed reduced numbers of Ki67⁺F4/80⁺ cells.

Other cells may take part in the post-sepsis-associated tumor progression. In this regard, Cavassani and colleagues had previously assessed post-sepsis neoplastic expansion and demonstrated the Treg-dependent tumor burden increase using a heterotopic Lewis lung

carcinoma model (12). Zhou and colleagues have demonstrated the frequent association of Tregs and TAM within the tumor microenvironment and reported that Treg/TAM co-localization is associated with worse outcome in patients with hepatocellular cancer (36). This could be relevant in the context of our findings, since previous works have demonstrated the role of Tregs in post-sepsis immunosuppressive state (6). However, we could not detect significant differences in Tregs quantification in the tumor microenvironment of post-sepsis mice.

In summary, sepsis has a long-lasting effect which may favor neoplastic expansion. In our model, TAM accumulated in the tumor microenvironment of post-sepsis subjects in an early phase, which is, at least in part, dependent on CXCR4/CXCL12 signaling. The evaluation of such phenomena in the clinical setting should be a matter of future concern. Specifically, it is important to determine if sepsis-surviving patients present higher risk of cancer development, progression or mortality, and if CXCR4/CXCL12 blockade could reverse this effect.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Giuliana Bertozi, Priscila Scheucher and Amélia Goes de Araújo for their technical assistance.

REFERENCES

1. Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, Dobb G, Levy M, Martin G, et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. *Infection*. 2009;37:222–32.
2. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013;41:580–637.
3. Weycker D, Akhras KS, Edelsberg J, Angus DC, Oster G. Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2003;31:2316–23.
4. Quartin AA, Schein RM, Kett DH, Peduzzi PN. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA*. 1997;277:1058–63.
5. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care*. 2011;15:R183.
6. Nascimento DC, Alves-Filho JC, Sônego F, Fukada SY, Pereira MS, Benjamim C, et al. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2010;38:1718–25.
7. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*. 1991;88:1747–54.
8. Carson WF, Cavassani KA., Dou Y, Kunkel SL. Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics*. 2011;6:273–83.
9. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:260–8.
10. Takahashi H, Tsuda Y, Takeuchi D, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections. *Crit Care Med*. 2004;32:1879–85.
11. Dahlke E, Murray CA, Kitchen J, Chan A-W. Systematic review of melanoma incidence and prognosis in solid organ transplant recipients. *Transplant Res*. 2014;3:10.
12. Cavassani KA, Carson WF, Moreira AP, Wen H, Schaller MA, Ishii M, et al. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood*. 2010;115:4403–11.
13. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:862–74.

14. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
15. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini P-L. 2011: the Immune Hallmarks of Cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60:319–26.
16. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2010;420:860–7.
17. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol*. 2013;35:585–600.
18. Zhang Q, Liu L, Gong C, Shi H, Zeng Y, Wang X, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*. 2012;7:e50946.
19. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C, et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:2491–6.
20. Tymoszuk P, Evens H, Marzola V, Wachowicz K, Wasmer M-H, Datta S, et al. In situ proliferation contributes to accumulation of tumor-associated macrophages in spontaneous mammary tumors. *Eur J Immunol*. 2014;44:2247–62.
21. Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A, Biswas SK, Doni A, Rapisarda A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med*. 2003;198:1391–402.
22. Knowles H, Harris AL. Macrophages and the hypoxic tumour microenvironment. *Front Biosci*. 2007;12:4298–314.
23. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, Bland KI, et al. Cecal Ligation and Puncture. *Shock*. 2005;24:52–7.
24. Jacob D, Davis J, Fang B. Xenograftic tumor models in mice for cancer research, a technical review. *Gene Ther Mol Biol*. 2004;8:213–9.
25. Ketcham A, Kinsey D, Wexler H, Mantel N. The development of spontaneous metastases after the removal of a “primary” tumor. II. Standardization protocol of 5 animal tumors. *Cancer*. 1961;14:875–82.
26. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;1–13.
27. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*. 2009;86:1065–73.

28. Loberg RD, Ying C, Craig M, Yan L, Snyder LA., Pienta KJ. CCL2 as an Important Mediator of Prostate Cancer Growth In Vivo through the Regulation of Macrophage Infiltration. *Neoplasia*. 2007;9:556–62.
29. Qian B, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;475:222–5.
30. Cho HJ, Jung JI, Lim DY, Kwon GT, Her S, Park JH, et al. Bone marrow-derived, alternatively activated macrophages enhance solid tumor growth and lung metastasis of mammary carcinoma cells in a Balb/C mouse orthotopic model. *Breast Cancer Res*; 2012;14:R81.
31. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
32. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13:453–61.
33. Brierie B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:49–59.
34. Wang J, Guan E, Roderiquez G, Calvert V, Alvarez R, Norcross MA. Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages. *J Biol Chem*. 2001;276:49236–43.
35. Beider K, Bitner H, Leiba M, Gutwein O, Koren-Michowitz M, Ostrovsky O, et al. Multiple myeloma cells recruit tumor-supportive macrophages through the CXCR4/CXCL12 axis and promote their polarization toward the M2 phenotype. *Oncotarget*. 2014;5:11283–96.
36. Zhou J, Ding T, Pan W, Zhu L-Y, Li L, Zheng L. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2009;125:1640–8.
37. Bimal S, Sinha S, Singh SK, Narayan S, Kumar V, Verma N, et al. *Leishmania donovani*: CD2 biased immune response skews the SAG mediated therapy for a predominant Th1 response in experimental infection. *Exp Parasitol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;131:274–82.
38. Oh J, Riek a. E, Weng S, Petty M, Kim D, Colonna M, et al. Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation. *J Biol Chem* [Internet]. 2012;287:11629–41.
39. Cho SG, Attaya M, Monaco JJ. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature*. 1991;353:573–6.
40. Qu C, Brinck-Jensen NS, Zang M, Chen K. Monocyte-derived dendritic cells: Targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *Int J Infect Dis*. International Society for Infectious Diseases; 2014;19:1–5.

41. Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*. 2003;197:1467–76.
42. Widera G, Flavell RA. The nucleotide sequence of the murine I-E beta b immune response gene: evidence for gene conversion events in class II genes of the major histocompatibility complex. *EMBO J*. 1984;3:1221–5.
43. Cavnar MJ, Zeng S, Kim TS, Sorenson EC, Ocuin LM, Balachandran VP, et al. KIT oncogene inhibition drives intratumoral macrophage M2 polarization. *J Exp Med*. 2013;210:2873–86.
44. Tchernychev B, Furie B, Furie BC. Peritoneal macrophages express both P-selectin and PSGL-1. *J Cell Biol*. 2003;163:1145–55.
45. Lacaze P, Raza S, Sing G, Page D, Forster T, Storm P, et al. Combined genome-wide expression profiling and targeted RNA interference in primary mouse macrophages reveals perturbation of transcriptional networks associated with interferon signalling. *BMC Genomics*. 2009;10:372.
46. Tomioka H, Tatano Y, Maw WW, Sano C, Kanehiro Y, Shimizu T. Characteristics of suppressor macrophages induced by mycobacterial and protozoal infections in relation to alternatively activated M2 macrophages. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:635451.
47. Karlsson L, Peterson PA. The alpha chain gene of H-2O has an unexpected location in the major histocompatibility complex. *J Exp Med*. 1992;176:477–83.
48. Han X, Wilbanks GD, Devaja O, Ruperelia V, Raju KS. IL-2 enhances standard IFNgamma/LPS activation of macrophage cytotoxicity to human ovarian carcinoma in vitro: a potential for adoptive cellular immunotherapy. *Gynecol Oncol*. 1999;75:198–210.
49. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *J. Clin. Invest*. 2012;122:787-95.
50. Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol*. 2014;15:423–30.

TABLES AND FIGURE LEGENDS

Table 1 - Differentially expressed genes in Post-sepsis TAM compared with naïve TAM.

Genes related to leukocyte activation, macrophage polarization and MHC type II complex				
Gene	Fold-change	p	Function	Reference
<i>Cd2</i>	-2.91	0.0028	Adhesive properties; co-stimulatory molecule	Bimal et al., 2012
<i>Ccr7</i>	-2.76	0.0017	CCL19 and CCL21 receptor; related to classic macrophage activation	Oh et al., 2012
<i>H2-DMb1</i>	-2.14	0.0017	MHC class II-related molecule	Cho et al., 1991
<i>Cd24a</i>	-2.10	0.0067	Cell adhesion molecule; DC marker	Qu et al., 2014
<i>Cd74</i>	-1.82	0.0026	MIF receptor; related to classic macrophage activation	Leng et al., 2003
<i>H2-Eb1</i>	-1.82	0.0017	MHC class-II-related	Widera and Flavell, 1984
<i>Cd86</i>	-1.80	0.002	Co-stimulatory molecule, related to classic macrophage activation	Cavnar et al., 2013

<i>Selplg</i>	-1.70	0.0017	P-selectin glycoprotein ligand; cell adhesion molecule	Tchernychev et al., 2003
<i>H2-Ab1</i>	-1.68	0.0027	MHC class-II-related molecule	Lacaze et al., 2009
<i>Cxcr4</i>	-1.62	0.0064	CXCL12 receptor; TAM accumulation in hypoxic areas	Solinas et al., 2009 Schioppa et al., 2003
<i>Marco</i>	1.62	0.0067	Scavenger receptor; related to alternative macrophage activation	Tomioka et al., 2012
<i>H2-Ob</i>	-1.60	0.0059	MHC class-II-related molecule	Karlsson and Peterson, 1992
<i>Il2rb</i>	-1.51	0.0017	IL-2 receptor β chain; IL-2 is a cofactor for macrophage classic activation	Han et al., 1999
<i>Ccl5</i>	-1.44	0.0074	Pro-inflammatory chemokine; M1 macrophage marker	Sica and Mantovani, 2012
<i>Cd209a</i>	-1.42	0.0063	C-type lectin; mediates recognition and phagocytosis	Xi-Jiang Lu, 2013
<i>Il6ra</i>	-1.41	0.0072	IL-6 receptor; modulates macrophage	Mauer et al., 2014

phenotype

Table 1 - Differences in gene expression comparison between TAM from post-sepsis and TAM from naïve mice were only mild. It was considered a fold-change of 0.58 to up regulated genes and -0.58 to down regulated genes. Statistical significance was set at $p < 0.01$. Among all, 61 genes were found to be up-regulated and 98 down-regulated. This table brings only the selected genes that could be in such a way related to TAM functions. Genes associated with leukocyte activation, macrophage polarization and MHC-II were depicted here. MHC-II, major histocompatibility complex type II. MIF, macrophage migration inhibitory factor. TAM, tumor associated macrophage. DC, dendritic cell.

Figure 1. Post-sepsis state was associated to increased tumor progression. (A) Post-sepsis mice developed increased tumor volumes in comparison to naïve mice after the s.c. inoculation of B16 melanoma cells. $n = 6$ (naïve) or $n = 7$ (post-sepsis). Graph is representative of four independent experiments. (B) Overall survival was reduced in post-sepsis tumor-

bearing mice. *n* - 17 (naïve inoculated with B16 cells), *n* - 19 (post-sepsis inoculated with B16 cells) or *n* - 7 (post-sepsis injected with vehicle). Results calculated from four independent experiments. (C) The post-sepsis-related tumor progression was confirmed through bioluminescence measurement (total flux = photons/second). *n* - 7 (naïve) or *n* - 8 (post-sepsis). Graph is representative of two independent experiments. (D) Three representative mice of each group analyzed at D+21 for the tumor bioluminescence quantification. As the scale indicates, the redder the signal, the greater is the tumor burden. Data are represented as the means $\pm$ S.E.M. or Kaplan-Meier curves when appropriate. * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$; *** indicates $p < 0.001$.

Figure 2. TAM accumulation was increased in the tumor microenvironment of sepsis surviving mice. (A-B) TAM (F4/80⁺CD206⁺) infiltrates were increased in post-sepsis tumor samples at D+14 when compared to naïve group. *n* - 6 (naïve, D+14), *n* - 7 (post-sepsis, D+14). (C-D) By D+21, the relative difference was not detected, in contrast to the difference in the absolute numbers of TAM. *n* - 6 (naïve, D+21) and *n* - 6 (post-sepsis, D+21). Graph is representative of two independent experiments. (E) Representative dots plots of flow cytometry analysis performed at D+14. (F) Immunofluorescent analysis of TAM accumulation at D+14. *n* - 6 (naïve), *n* - 5 (post-sepsis). Graph is representative of two independent experiments. (G-I) Representative microphotographs of tumors from (G) naïve or (I-H) post-sepsis mice at D+14. (H) Detail of the extracellular F4/80⁺ staining in two cells. Bars indicate the scales. Green: F4/80⁺ (macrophage, TAM) and Blue: Hoechst 33342 (nuclei). The horizontal red lines represent the mean and individual data are presented as scattered dot plots. Groups were compared using the Student's t test. * indicates *p* < 0.05; ** indicates *p* < 0.01; *** indicates *p* < 0.001.

Figure 3. Differential cytokine profiles in serum and tumor samples of post-sepsis and naïve mice. (A) Post-sepsis tumor bearing mice presented increased TGF-β concentrations in serum. (B) CCL2 serum concentrations were higher in post-sepsis mice injected with vehicle, but not in the other groups. (C) CXCL12 serum concentrations were increased in post-sepsis mice injected with vehicle and in naïve tumor bearing mice when compared to naïve mice injected with vehicle. Post-sepsis tumor bearing mice showed higher amounts of CXCL12 compared to all groups. (D) TNF-α serum concentrations were higher in post-sepsis tumor bearing, in comparison to the remaining experimental groups. (E to G) Differences in TGF-β, CCL2 and CXCL12 intratumoral concentrations were not statistically significant among groups. (H) TNF-α intratumoral concentrations were higher in post-sepsis tumor bearing mice, in comparison to the other groups. *n* - 5 per group. Graphs are representative of two

independent experiments. Filled circles indicate naïve mice; unfilled squares indicate post-sepsis mice. The horizontal red lines represent the mean and individual data are presented as scattered dot plots. * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$; *** indicates $p < 0.001$.

Figure 4. Comparison between the gene expression profiles of TAM from post-sepsis and naïve mice. (A) First two principal components are plotted elucidating the group relationship between TAM from naïve and from post-sepsis mice. (B) Volcano plot comparing TAM from post-sepsis to TAM from naïve mice. Fold change was set at 0.58 for up-regulated and 0.58 for down-regulated gene expression. Significance was set at FDR < 0.01. 98 genes were down-regulated (green) and 61 were up-regulated (red). mRNAs: messenger RNAs, lncRNAs: long non-coding RNAs, UNK: unknown RNA, FDR: false discovery rate, M1: M1-polarized macrophage, M2: M2-polarized macrophage.

Figure 5. Bone marrow (BM) derived macrophages (Mφs) from post-sepsis mice increased tumor progression. (A) Experimental protocol. (B). Recipients of Post-sepsis Mφs presented increased tumor progression in comparison to controls. *n* - 10 (naïve Mφs) and *n* - 9 (Post-sepsis Mφs). (C) Mice injected with Post-sepsis Mφs + B16 cells presented increased mortality. *n* - 10 (naïve Mφs) and *n* - 9 (Post-sepsis Mφs). (D) Increased tumor burden in Post-sepsis Mφs group was confirmed at D+21 through bioluminescent signal quantification

after D-luciferin (150 mg/kg, ip.) administration. $n = 7$ (naïve Mφs) and $n = 5$ (Post-sepsis Mφs). Graphs are representative of two independent experiments. The horizontal red lines represent the mean and individual data are presented as scattered dot plots. * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$; *** indicates $p < 0.001$.

Figure 6. CXCR4/CXCL12 blockade reverted the post-sepsis effect on tumor progression and TAM accumulation. (A) The tumor volumes of post-sepsis treated with AMD3100 were not different from untreated naïve mice. $n = 6$ (naïve plus vehicle), $n = 10$ (naïve plus AMD3100), $n = 5$ (post-sepsis plus vehicle) and $n = 12$ (post-sepsis plus AMD3100). The arrows indicate the days in which AMD3100 was administered. (B) Overall survival was improved after CXCR4/CXCL12 blockade. Both naïve and post-sepsis mice that received AMD3100 showed survival improvement compared to their untreated counterparts. $n = 5$ (post-sepsis without tumor), $n = 6$ (naïve plus vehicle), $n = 11$ (naïve plus AMD3100), $n =$

7 (post-sepsis plus vehicle) and $n = 13$ (post-sepsis plus AMD3100). (C) TAM (CD45⁺F4/80⁺) from naïve and post-sepsis mice expressed the same levels of CXCR4. $n = 5$ (naïve) and $n = 6$ (post-sepsis). (D) AMD3100 reverted the TAM accumulation in tumors of post-sepsis mice at D+14. $n = 5$ (naïve plus vehicle), $n = 5$ (naïve plus AMD3100), $n = 5$ (post-sepsis plus vehicle) and $n = 5$ (post-sepsis plus AMD3100). (E) Representative dot plots of post-sepsis plus vehicle group and post-sepsis plus AMD3100 group. All graphs are representative of two independent experiments. The horizontal red lines represent the mean and individual data are presented as scattered dot plots. * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$; *** indicates $p < 0.001$.