

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUIZ EDUARDO SILVA MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO DO MODELO TUMOR
ASCÍTICO DE EHRLICH**

São Luís
2022

LUIZ EDUARDO SILVA MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO DO MODELO TUMOR
ASCÍTICO DE EHRLICH**

Trabalho de conclusão de curso em formato de artigo apresentado à Universidade Federal do Maranhão como exigência para obter o título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: **Prof. Dr^a. Ana Paula
Silva de Azevedo dos Santos**

**São Luís
2022**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Martins, Luiz Eduardo Silva.

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO DO MODELO TUMOR
ASCÍTICO DE EHRLICH / Luiz Eduardo Silva Martins. - 2022.
33 f.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.
Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Maranhão, São Luís, 2022.

1. Citocinas. 2. Inflamação. 3. Macrófago. 4.
Modelo Murino. 5. Óxido Nítrico. I. Santos, Ana Paula
Silva de Azevedo dos. II. Título.

LUIZ EDUARDO SILVA MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO DO MODELO TUMOR
ASCÍTICO DE EHRLICH**

Trabalho de conclusão de curso em formato de
artigo apresentado à Universidade Federal do
Maranhão como exigência para obter o título de
Bacharel em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
(Orientadora)

Dr. André Alvares Marques Vale
(1º Titular)

Profa. Dra. Thiare Silva Fortes da Cunha
(2º Titular)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por dar esperança na vinda de um futuro melhor para todos.

Agradeço a minha mãe, Tereza Cristina Silva, por me fazer dar os primeiros passos na direção da Biologia e da Ciência, por me inspirar sendo uma professora e pesquisadora excelente e principalmente por todo carinho, cuidado, compreensão e amor, sendo uma mãe que todo filho sonha em ter.

Agradeço ao meu pai, William Jacob de Souza Martins, por me ensinar desde cedo importância de fazer o certo, independente das dificuldades. A ser uma pessoa honesta e acima de tudo nunca desistir, sempre animando a mim e com certeza toda a família com a marcante frase: “a luta continua”.

Meu agradecimento especial a professora Dra. Ana Paula de Azevedo dos Santos, que me aceitou no LIAC e que me orientou durante toda minha iniciação científica e monografia, sempre me ensinando muito sobre imunologia e câncer. Ao professor Eduardo Bezerra, que tornou a cadeira de botânica muito divertida e interessante e que foi de fundamental ajuda quando eu me sentia perdido no curso de Ciências Biológicas.

Aos amigos que fiz no laboratório, Ana Luiza e Danrley, por terem me ensinado tudo que eu sei sobre cultura de células e por tornar os momentos cansativos e de ansiedade mais tranquilos. Ao André Vale, por me ensinar do zero a manipulação e o cuidado com camundongos para o repique do Ehrlich, pelas aulas de citometria e por todas as dúvidas tiradas durante o nosso convívio no LIAC. A Sulayne, também pelas aulas de citometria, por ensinar muito sobre o CP e por me auxiliar nos meus primeiros passos no mundo dos programas estatísticos.

Aos amigos da minha turma, Guilherme Marques (Marquinhos) e Gabriela Lobato, pelas boas risadas, conversas, pelos jogos, pelas festas, pelos passeios e confraternizações. A minha amiga Larissa Helena, pelos conselhos, informações, lembretes e pelos ocasionais puxões de orelha, mas principalmente, pelo carinho e pela companhia nos mil filmes de terror que assistimos juntos.

Aos amigos que carrego desde infância e adolescência, Victor Rogério, Andrews Corrêa, João Victor e Mauro de Oliveira, por todos os bons momentos que passamos juntos, pelos conselhos, pelas horas de debate sobre os mais diversos e loucos temas, pelas gargalhadas intermináveis, pelas madrugadas de aventuras em mundos que criamos juntos e por tornarem os momentos difíceis mais leves. A minha vizinha, Laís Jansen, pelas boas conversas, pelas longas caminhadas na praça, pelos filmes assistidos e pelas idas ao McDonald's e outras hamburguerias.

Aos meus primos Samir e Alexandre, pelos bons momentos que passamos juntos, pelas longas conversas e risadas nas madrugadas que passamos acordados na casa de Vovó Marinalva. Ao meu primo Daniel, pelas aventuras que vivemos por Campos e Gargaú e por sempre acreditar em mim.

A todos os membros da família Martins e da família Silva, aos meus avôs e avós, tios e tias e aos meus primos e primas, que sempre demonstraram amor e carinho e me motivaram com palavras de incentivo. Em especial a minha tia Deborah, por todos os conselhos, incentivos e principalmente pelas divertidas conversas de temas políticos. Em especial também ao meu tio Israel (Mestre), pelos conselhos, pelas risadas, pelas horas de vídeo game jogadas e por ter me introduzido desde cedo a clássicos da literatura e do

cinema (Star Wars e Senhor dos Anéis). Ao meu padrinho Jorge Gama e minha madrinha Glória Avelar, por todo carinho, incentivo e auxílio durante toda a minha vida.

Agradeço a Universidade Federal do Maranhão, pela oportunidade de me tornar bacharel em Ciências Biológicas, e a todos os professores e demais funcionários da Instituição que colaboram para que o Curso tenha excelência. Agradeço à FAPEMA pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa e pela bolsa de Iniciação Científica.

“Ouça-me bem, amor
Preste atenção, o mundo é um moinho
Vai triturar teus sonhos, tão mesquinho
Vai reduzir as ilusões a pó”
(Cartola)

Manuscrito do artigo a ser submetido a Revisa Brasileira de Cancerologia

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO DO MODELO
TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

Folha de rosto

Caracterização do Perfil Inflamatório do Modelo Tumor Ascítico de Ehrlich

Characterization of the Inflammatory Profile of the Ehrlich Ascitic Tumor Model

Caracterización del perfil inflamatorio del modelo de tumor Ascítico de Ehrlich

Luiz Eduardo Silva Martins¹: Graduando da Universidade Federal do Maranhão, curso de ciências biológicas, São Luís (MA), Brasil; silvamartins.ed@gmail.com; Orcid 0000-0002-3145-1811

Ana Paula Silva de Azevedo Dos Santos²: Docente da Universidade Federal do Maranhã, Departamento de Ciências Fisiológicas, Coordenadora do programa de pós graduação em ciências da saúde; São Luís (MA), Brasil; ana.azevedo@ufma.br; Orcid 0000-0002-6404-0103.

Autor correspondente: Luiz Eduardo Silva Martins; Rua Dois Mil, Quadra 21 Casa 18, Parque Aurora – 65051854, (98)991382404, silvamartins.ed@gmail.com

Critérios de autoria: Todos os autores contribuíram substancialmente na concepção e/ou no planejamento do estudo, na obtenção, na análise e/ou interpretação dos dados, na revisão crítica e na aprovação final da versão publicada.

Agradecimentos:

Declaração de conflito de interesses: Nada a declarar

Fontes de financiamento: FAPEMA e CAPES finance 001.

Resumo

Introdução: O modelo murino do tumor ascítico de Ehrlich é muito utilizado para diversas investigações acerca do câncer, porém ainda existem lacunas sobre o padrão inflamatório a ele associado. **Objetivo:** Investigar o padrão inflamatório na progressão do tumor e na produção de citocinas *in vivo* e *in vitro*. **Metodologia:** Para o estabelecimento do modelo, um inóculo e 200µL da suspensão de células tumorais (1×10^7 células/mL) foi aplicada no peritônio. Os animais foram pesados ao longo de 6, 9 e 12 dias e após a eutanásia, foram determinados o volume, aspecto, a celularidade, viabilidade das células tumorais e o padrão de citocinas na ascite. No ensaio *in vitro*, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram estimulados com sobrenadante da ascite e/ou lipopolissacarídeo para a avaliação da produção de citocinas e óxido nítrico. **Resultados:** Durante o desenvolvimento do tumor, foi observado ganho progressivo de peso dos camundongos, aumento do volume da ascite e aumento da celularidade com diminuição da viabilidade. Foi observado um aumento na produção de IL-6, com redução de IL-10 e INF- γ e manutenção dos níveis de TNF. No tratamento dos macrófagos estimulados com LPS, a ascite de 12 dias induziu uma redução na produção de IFN- γ e TNF nos tempos de 24 e 48h e, independentemente do tempo da ascite (6, 9 ou 12 dia), a produção de IL-6 foi diminuída em 24h, mas se manteve em 48h. Houve redução na produção de óxido nítrico nos macrófagos tratados e aumento de viabilidade em alguns grupos. **Conclusão:** Apesar da detecção de citocinas antitumorais na ascite, houve melhora na viabilidade das células tumorais, até o nono dia do desenvolvimento do tumor. Os resultados *in vitro* indicam que os macrófagos expostos ao sobrenadante tumoral perdem a capacidade de produzir citocinas importantes para combater o tumor.

Palavras-chave: Inflamação; Macrófagos; Modelo murino; Citocinas e Oxido Nítrico

Introduction: The murine model of ascitic Ehrlich tumor is widely used for several cancer investigations, but there are still gaps about the inflammatory pattern associated with it. **Objective:** To investigate the inflammatory pattern in tumor progression and cytokine production *in vivo* and *in vitro*. **Methodology:** To establish the model, an inoculum and 200µL of tumor cell suspension (1×10^7 cells/mL) was applied to the peritoneum. The animals were weighed over 6, 9 and 12 days and after euthanasia, the volume, appearance, cellularity, viability of tumor cells and cytokine pattern in the ascites

were determined. In the in vitro assay, macrophages of the RAW 264.7 strain were stimulated with ascites supernatant and/or lipopolysaccharide for the evaluation of cytokine and nitric oxide production. **Results:** During tumor development, progressive weight gain of the mice, increased ascites volume and increased cellularity with decreased viability were observed. An increase in IL-6 production was observed, with a decrease in IL-10 and INF- γ and maintenance of TNF levels. In the treatment of LPS-stimulated macrophages, 12-day ascites induced a reduction in IFN- and TNF production at 24 and 48h, and regardless of the time of ascites (6, 9 or 12 day), IL-6 production was decreased at 24h but maintained at 48h. There was a reduction in nitric oxide production in treated macrophages and increased viability in some groups. **Conclusion:** Despite the detection of antitumor cytokines in ascites, there was improvement in tumor cell viability by the ninth day of tumor development. The in vitro results indicate that macrophages exposed to tumor supernatant lose their ability to produce cytokines important for fighting the tumor.

Keywords: Inflammation; Macrophages; Murine model; Cytokines and Nitric Oxide

Introducción: El modelo murino del tumor ascítico de Ehrlich es muy utilizado para diversas investigaciones sobre el cáncer, sin embargo existen lagunas sobre el patrón inflamatorio a él asociado. **Objetivo:** Investigar el papel de la inflamación en la progresión del tumor y en la producción de citocinas in vivo e in vitro. **Metodología:** Para establecer el modelo, se aplicó un inóculo y 200 μ L de suspensión de células tumorales (1×10^7 células/mL) en el peritoneo. Los animales se pesaron durante 6, 9 y 12 días y, tras la eutanasia, se determinó el volumen, el aspecto, la celularidad, la viabilidad de las células tumorales y el patrón de citocinas en la ascitis. En el ensayo in vitro, se estimularon macrófagos de la cepa RAW 264.7 con sobrenadante de ascitis y/o lipopolisacárido para evaluar la producción de citocinas y óxido nítrico. **Resultados:** Durante el desarrollo del tumor, se observó un aumento progresivo del peso de los ratones, un incremento del volumen de ascitis y un aumento de la celularidad con disminución de la viabilidad. Se observó un aumento de la producción de IL-6, con una reducción de IL-10 e INF- γ y un mantenimiento de los niveles de TNF. En el tratamiento de macrófagos estimulados con LPS, la ascitis de 12 días indujo una reducción de la producción de IFN- y TNF a las 24 y 48h e, independientemente del tiempo de ascitis (6, 9 o 12 días), la producción de IL-6 disminuyó a las 24h, pero se mantuvo a las 48h. Se

observó una reducción de la producción de óxido nítrico en los macrófagos tratados y un aumento de la viabilidad en algunos grupos. **Conclusión:** A pesar de la detección de citocinas antitumorales en la ascitis, se produjo una mejora de la viabilidad de las células tumorales al noveno día de desarrollo del tumor. Los resultados in vitro indican que los macrófagos expuestos al sobrenadante tumoral pierden la capacidad de producir citocinas importantes para combatir el tumor.

Palabras clave: Inflamación; Macrófagos; Modelo murino; Citoquinas y Óxido Nítrico

Introdução

Um dos modelos mais estabelecidos para o estudo do câncer é feito através do tumor de Ehrlich. Trata-se de um tumor murino agressivo e de rápido crescimento, facilmente transplantável de um camundongo para outro¹. Quando as células tumorais são inoculadas no peritônio, o câncer se desenvolve na sua forma ascítica, que provavelmente é formada pelo aumento da permeabilidade vascular peritoneal gerada pela inflamação promovida pelo tumor¹.

Uma vez que o tumor se instala, o processo inflamatório costuma gerar um quadro anêmico, aumento progressivo do tamanho do peritônio, hemodiluição, insuficiência cardíaca e morte². A agressividade e progressão tumoral, assim como o tempo de vida, depende da linhagem de camundongos utilizadas e do volume total de células inoculadas³. Essa característica faz com que o tumor de Ehrlich seja um excelente modelo para diversas investigações.

No microambiente gerado pelo tumor, não há grande participação de linfócitos, visto que as células tumorais não expressam moléculas do MHC de classe I, fazendo com que o macrófago seja a célula imunológica principal no combate ao tumor⁴. Em diversos tipos de câncer, os macrófagos associados a tumores (TAM's) costumam ter uma alta plasticidade, sendo capazes de se aclimatar e adquirir um perfil específico dependendo da combinação de citocinas do microambiente tumoral⁵.

Os TAM's podem ser ativados pela via clássica, gerando um perfil inflamatório, hostil ao tumor ou pela via alternativa, se transformando em um macrófago

mais tolerogênico e menos inflamatório⁶. Os macrófagos ativados por LPS (lipopolissacarídeo) ou Interferon Gamma estão associados a uma resposta mais inflamatória, podendo secretar IL-12, IL-18, IL-1, TNF e aumentar a quantidade de NO presente no microambiente tumoral, o que pode ser favorável a combater o tumor através da destruição das células malignas⁷.

Macrófagos ativado para um perfil menos inflamatório estão do outro lado do espectro da resposta imunológica, sendo estimulados por diversas citocinas como IL-4, IL-13 e IL-10, por complexos imunes, receptores Toll-like, glicocorticoides e fator de crescimento transformante- β (TGF- β)^{8,9}. Esse perfil de macrófagos produzem alta quantidade de IL-10 e tendo função no controle parasitário, remodelação de tecidos e nas atividades fagocíticas. Por outro lado, em tumores, macrófagos com perfil não inflamatório estão relacionados com supressão da resposta imune adaptativa, auxiliando na progressão, crescimento, metástase e angiogênese tumoral^{8,9}

Além das citocinas e fatores de crescimento, uma molécula que está bastante relacionada com processos inflamatórios, no combate e até na progressão tumoral é o óxido nítrico (NO)¹⁰. Um grupo de enzimas são responsáveis pelas sínteses do NO dentro do organismo, uma delas é chamada de iNOS (Óxido Nítrico Sintase Induzida), que é expressa por diversas células presentes dentro no microambiente tumoral, incluindo os macrófagos e as próprias células do câncer¹¹.

Em camundongos portadores do tumor de Ehrlich, foi verificado que o óxido nítrico apresentou um efeito antitumoral na região peritoneal onde se desenvolve a forma ascítica do tumor, nesse caso o NO afetou o funcionamento normal das mitocôndrias e estimulou a apoptose nas células tumorais. Experimentos com Diazepam mostraram uma redução na quantidade macrófagos recrutados para o local do tumor e uma diminuição na concentração de NO, o que foi benéfico para a progressão do tumor.^{12, 13}.

Dada a importância do tumor de Ehrlich para o estudo do câncer e a lacuna de conhecimento sobre alguns aspectos do modelo, esse trabalho investigou alguns fatores relacionados ao perfil inflamatório da forma ascítica do tumor, verificando a produção de citocinas, de óxido nítrico e como os macrófagos são afetados pela presença do sobrenadante tumoral.

METODOLOGIA

Experimentos *IN VIVO*

Foram utilizados 12 camundongos da linhagem Swiss com 30 dias de idade fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão e aclimatados durante 5 dias ao Biotério Experimental, com água e ração *ad libitum*, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e com umidade e temperatura monitorada. O trabalho foi realizado conforme as diretrizes do Conselho Nacional de Controle da *Experimentação Animal (CONCEA)* e aprovado pela *Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFMA como parte do projeto “ESTUDO E MANUTENÇÃO DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH”*, processo n. 012975/2008-43.

Os animais foram separados de forma randômica em 3 grupos com 4 camundongos em cada. Foi inoculada no peritônio dos animais uma suspensão contendo 1×10^7 /mL de células tumorais de Ehrlich ressuspendidas em PBS (Phosphate Buffered Saline) no volume de 200 μ L, induzindo o crescimento tumoral na sua forma ascítica¹⁴.

Após a inoculação, os animais foram pesados e separados nos grupos conforme o tempo de desenvolvimento da ascite por 6, 9 e 12 dias. O procedimento de eutanásia foi realizado com a administração de uma sobredose de solução anestésica (solução 2:1:1, Ketamina 100mg/mL, Cloridrato de Xilasina 20mg/mL, PSB, via intramuscular).

No dia da eutanásia, os animais foram pesados e a ascite coletada em ambiente estéril. O aspecto das ascite foi observado e categorizado em seroso (coloração amarelada) ou hemorrágico (coloração avermelhada). Para a verificação da celularidade, uma alíquota da ascite de 1mL foi diluída em PBS. Em seguida, a suspensão foi corada com azul de tripan (0,04%) na diluição de 1:10. As células não coradas (viáveis) e coradas (mortas) foram contadas na câmara de Neubauer, com a objetiva de 40x. Para a obtenção do sobrenadante, a ascite foi centrifugada a 170g, a 4°C por 10 minutos¹⁵.

Experimentos *IN VITRO*

Para o ensaio *in vitro*, foi realizada a cultura da linhagem de macrófagos RAW-264.7 em meio RPMI suplementado com Soro Fetal Bovino (10%), em frascos de cultura celular de 75cm² em estufa a 37°C e 5% de CO². Após a adesão e a formação da monocamada, os macrófagos foram retirados da garrafa com auxílio do *cell scraper*, contados e tiveram sua concentração ajustada para $2 \cdot 10^6$ células/mL e plaqueadas em placas de cultura de 96 poços de fundo chato com um volume final 100 μ L.

Os macrófagos foram tratados com os sobrenadantes das acites obtidos no 6º, 9º e 12º isoladamente ou estimulados com Lipopolissarídeo (LPS) de *E. coli* (1µg/mL) (297-473-0 Sigma-Aldrich) uma hora antes (LPS→Sob), simultaneamente (LPS=Sob) ou uma hora depois (Sob→LPS). Como controles, foram utilizados macrófagos mantidos apenas em meio de cultura (Controle Negativo) ou estimulados apenas com LPS (Controle Positivo). As placas de cultura foram mantidas na estufa durante 24 e 48h. Após esses tempos, os sobrenadantes foram retirados para determinação de citocinas e de NO. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Dosagem de citocinas e NO

O método de dosagem de citocina foi realizado no sobrenadante da ascite e na cultura de macrófagos. As citocinas foram dosadas através do *Mouse Inflammation kit* (BD Bioscience) conforme as orientações do fabricante. Brevemente, as amostras foram incubadas com *beads* de intensidade de fluorescência diferente, sensibilizadas para as respectivas citocinas: IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10 e Il-6. Na placa de 96 poços, foram adicionados 25µL por poço, da amostra padrão fornecida pelo fabricante, dos sobrenadantes do tumor e dos sobrenadantes das culturas. Em seguida receberam 25µL de cada reagente “cytokine beads” para marcar a produção de cada citocina e 25µL de anticorpo conjugado ao fluorocromo PE. Após 2 horas de incubação, as amostras foram lavadas. Os dados foram adquiridos em citometro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e os dados analisados no software FCAP ARRAY Versão 3.0 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Para dosagem de NO, foram transferidos 50 µL de sobrenadante da cultura de macrófagos para uma placa de 96 poços e adicionados mais 50µL de reagente de Griess. A placa foi mantida em temperatura ambiente ao abrigo de luz durante 10 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro de microplaca com filtro de 540nm, com branco constituído por meio RPMI mais reagente de Griess¹⁶.

Testes estatístico

Os tratamentos estatísticos da amostra foram realizados com os testes de normalidade De Shapiro-Wilk. Foram usados os testes ANOVA one way, com pós-teste

de Tukey para os dados considerados paramétricos e Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn para os dados não-paramétricos, com nível de significância de 5%. Todas as análises foram feitas no software *GraphPad Prism*, versão 8.0

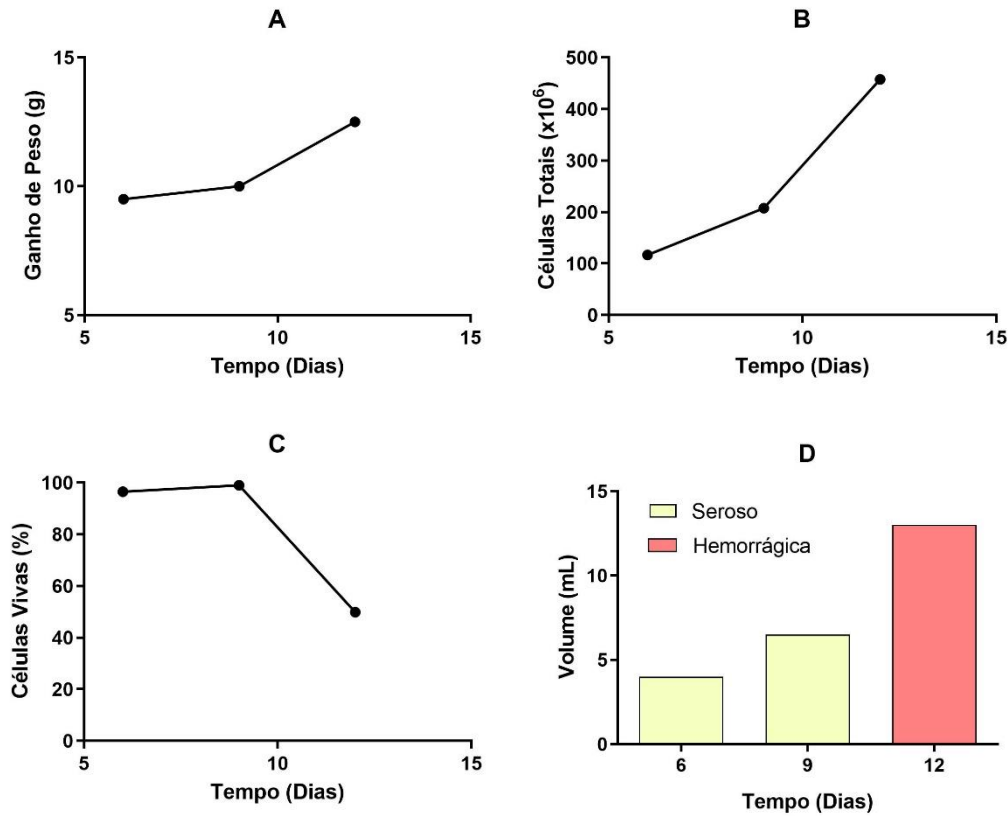
Resultados

Características da ascite

Durante o desenvolvimento do tumor ascítico houve um ganho progressivo de peso dos animais ao decorrer dos dias, sendo o maior ganho no décimo segundo dia. A celularidade e o volume da ascite aumentaram de forma independente com o passar dos dias, principalmente entre o nono e o décimo segundo dia. Por outro lado, a viabilidade celular apresentou um pequeno aumento do sexto para o nono dia e depois sofreu uma

diminuição expressiva no decimo segundo dia. Com o desenvolvimento da ascite, o aspecto deixou de ser seroso e tornou-se hemorrágico no decimo segundo dia.

Figura 1: Característica da ascite do tumor de Ehrlich. (A) Ganho de peso dos animais; (B) Celularidade da ascite; (C) Viabilidade da ascite; (D) Volume e aspecto da ascite durante os dias 6, 9 e 12 de progressão tumoral. Dados apresentados por média.



Perfil das citocinas do sobrenadante ascítico

Houve uma redução progressiva de IL-10 com o desenvolvimento do tumor, apresentando a maior concentração no sexto dia com redução até o decimo segundo dia. Ao analisar as concentrações de IL-6, foi possível observar uma estabilidade no sexto e nono dia, com um aumento significativo ocorrendo no décimo segundo dia.

As concentrações de IFN- γ apresentaram uma redução ao longo do desenvolvimento do tumor, com uma diminuição significativa no décimo segundo dia. As concentrações de TNF e MCP-1 não apresentaram diferença estatisticamente significativa durante o desenvolvimento do tumor e a citocina IL-12p70 não foi detectada nas amostras.

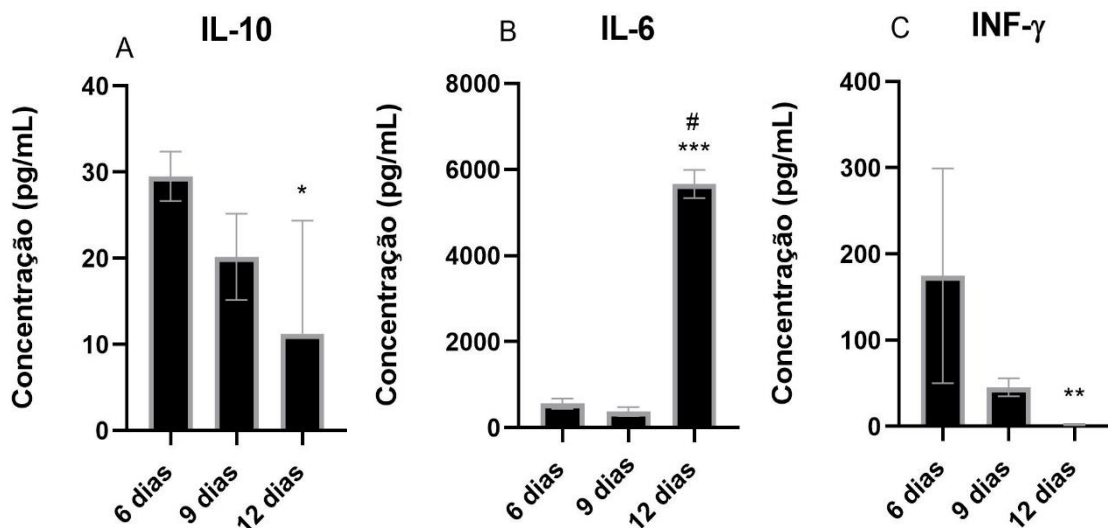


Figura 2: Perfil de citocinas durante do desenvolvimento da ascite do tumor de Ehrlich. Concentração das citocinas (A) IL-10, (B) IL-6 e (C) IFN- γ nos dias 6, 9 e 12 do desenvolvimento do tumor. O símbolo * representa diferença significativa quando comparado com o dia 6 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$) e o símbolo # representa diferença significativa comparado com o dia 9 (# $p < 0,05$). Dados apresentados em média \pm SD pg/mL. Para as citocinas IL-10 e IL-6 foi utilizado o teste estatístico ANOVA one way, com pós-teste de Tukey. Para a citocina INF- γ foi utilizado o teste estatístico Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

Efeito do sobrenadante ascítico na viabilidade da cultura de macrófagos RAW 264.7

O tratamento com o sobrenadante do tumor não foi capaz de reduzir a viabilidade dos macrófagos quando estimulados com LPS, mostrando uma frequência semelhante ao controle. Notavelmente, foi observado que no tratamento com sobrenadante de seis dias e estímulo simultâneo e de nove dias com o estímulo de uma hora antes ou simultâneo, a viabilidade foi maior que o controle no tempo de 24h (Figura 3A). Após 48h, a viabilidade permaneceu igual ao controle, exceto no tratamento com sobrenadante de doze dias e estimulado com LPS uma hora antes, que mostrou uma

elevação da viabilidade (Figura 3B). A viabilidade não foi diferente entre as células do controle positivo e as do controle negativo (linha tracejada).

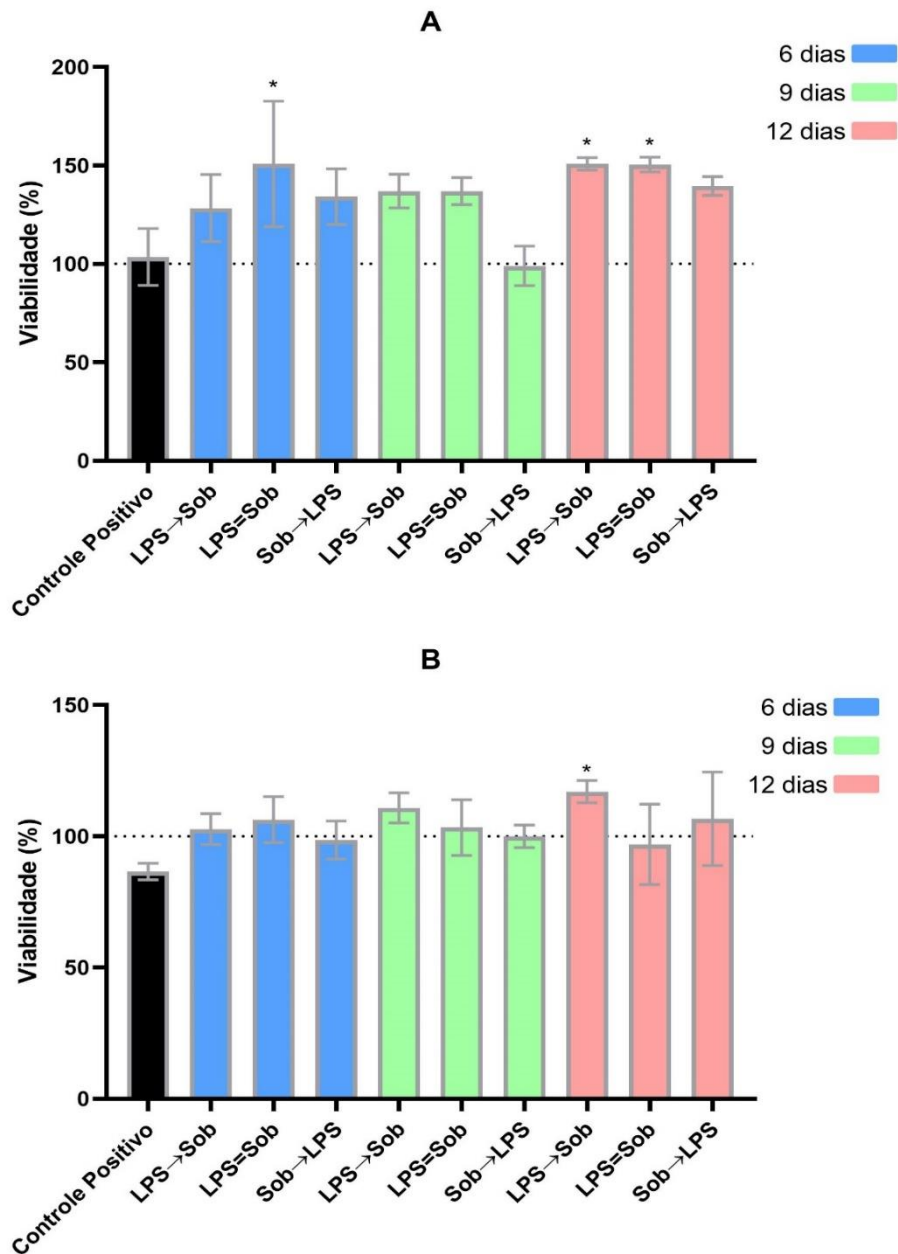


Figura 3: **Viabilidade de macrófagos tratados com a ascite nos diferentes tempos de desenvolvimento estimulados com LPS.** (A) Percentual de células viáveis em 24h tratadas com sobrenadante de 6, 9 e 12 dias, estimulados com LPS uma hora antes, simultaneamente ou uma hora depois. (B) Percentual de células viáveis em 48h tratadas com sobrenadante de 6, 9 e 12 dias, estimulados com LPS uma hora antes, simultaneamente ou uma hora depois. O símbolo * representa diferença significativa entre os grupos comparados com o Controle LPS com valor de (* $p < 0,05$). A linha tracejada indica a frequência da viabilidade dos macrófagos mantidos em meio. Dados

apresentados em média \pm SD. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA one way, com pós-teste de Tukey

Efeito do sobrenadante ascítico na modulação do perfil de citocinas produzidas pelos macrófagos RAW 264.7

A detecção de IL-6 no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com LPS em 24h mostrou que o tratamento com o sobrenadante de 6, 9 e 12 dias reduziu a concentração da citocina quando comparado com o controle positivo (Figura 4 A). Por outro lado, em 48h de cultura houve uma redução significativa de IL-6 no grupo controle positivo e uma manutenção da citocina nos grupos tratados com os sobrenadantes, sugerindo uma manutenção dos níveis de IL-6 ao longo do tempo pelos macrófagos (Figura 4B).

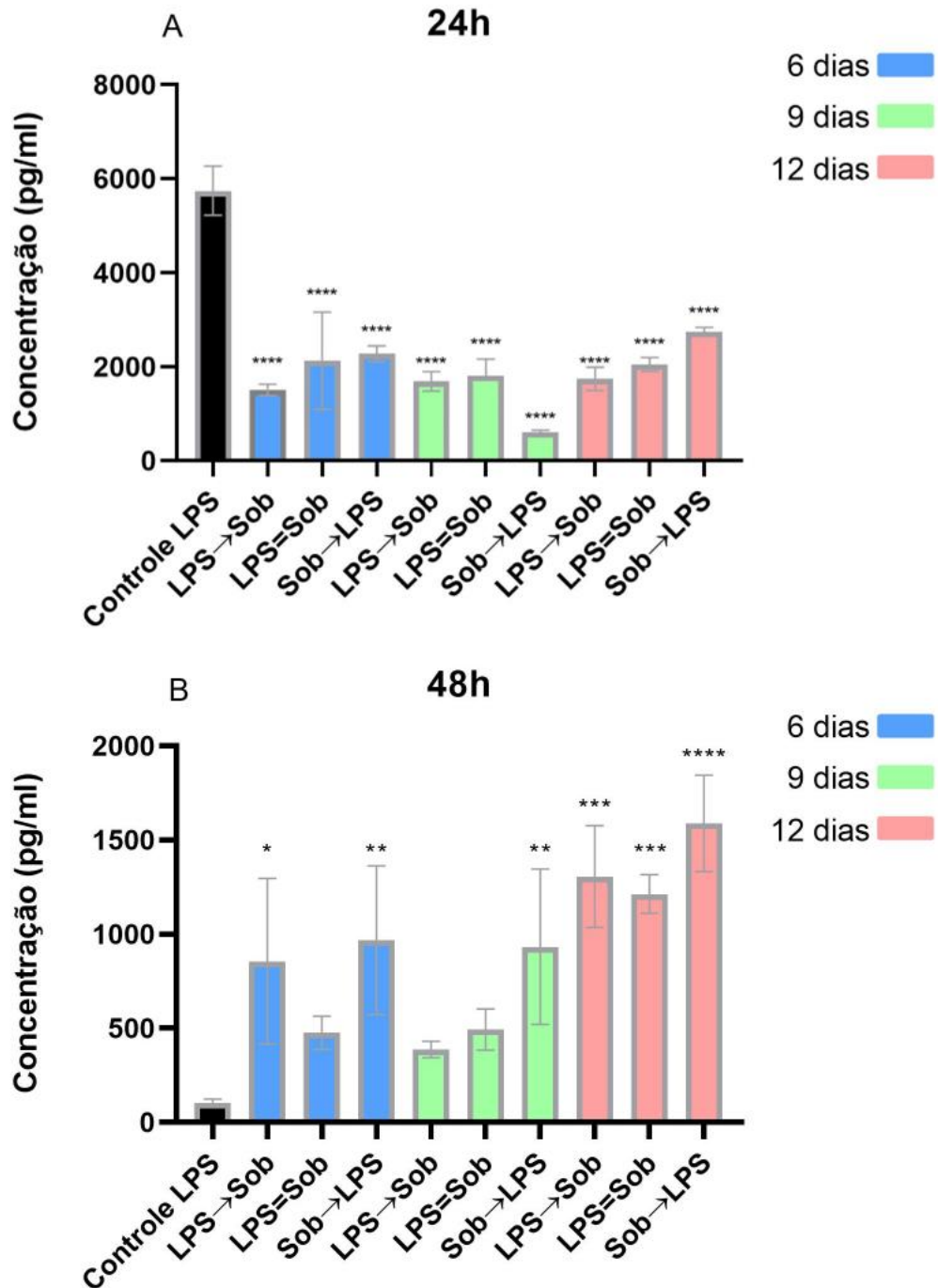


Figura 4: Concentração de IL-6 no sobrenadante da cultura de macrófagos. (A) Análise das concentrações de IL-6 em 24h e (B) 48h com células tratadas com sobrenadante de 6, 9 e 12 dias e estimuladas com LPS uma hora antes (LPS→Sob), simultaneamente (LPS=Sob) e uma hora depois (Sob→LPS). O símbolo * representa a diferença significativa quando comparado com o controle positivo (*p< 0,05; **p< 0,01;

*** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). Não houve concentração detectável de IL-6 nos macrófagos mantidos apenas com meio. Dados apresentados em média \pm SD pg/mL. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA one way, com pós-teste de Tukey.

Na análise da concentração de IFN- γ em 24 horas, todos os macrófagos tratados com sobrenadante de 6 e 9 dias apresentaram uma concentração significativamente maior que o controle positivo. Independentemente do tempo de estímulo com LPS, os dados mostraram que a produção de IFN- γ foi diminuindo com o tratamento da ascite, chegando a valores não detectados na ascite de 12 dias (Figura 5A).

Na leitura de 48 horas, houve um fenômeno semelhante ao de 24 horas. Os macrófagos tratados com sobrenadante de 6 e 9 dias apresentaram uma maior concentração e relação aos controles e no tratamento com sobrenadante de 12 dias, a concentração de IFN- γ no grupo estimulado 1 hora antes foi significativamente maior que o controle (Figura 5B). A concentração de IFN- γ foi em média menor em 48 horas quando comparada com a leitura de 24 horas.

Em relação a produção de TNF e os resultados mostraram uma redução significativa na concentração da citocina em todos os grupos tratados com sobrenadante de 9 e 12 dias (Figura 6A).

Na leitura de 48 horas, as concentrações foram semelhantes às encontradas na leitura de 24 horas. Houve redução significativa de TNF nos macrófagos com estímulo simultâneo ao tratamento com sobrenadante de 6 e 9 dias. No grupo tratado com sobrenadante de 12 dias, os macrófagos estimulados simultaneamente e 1 hora depois também sofreram uma redução significativa em relação ao controle (Figura 6B).

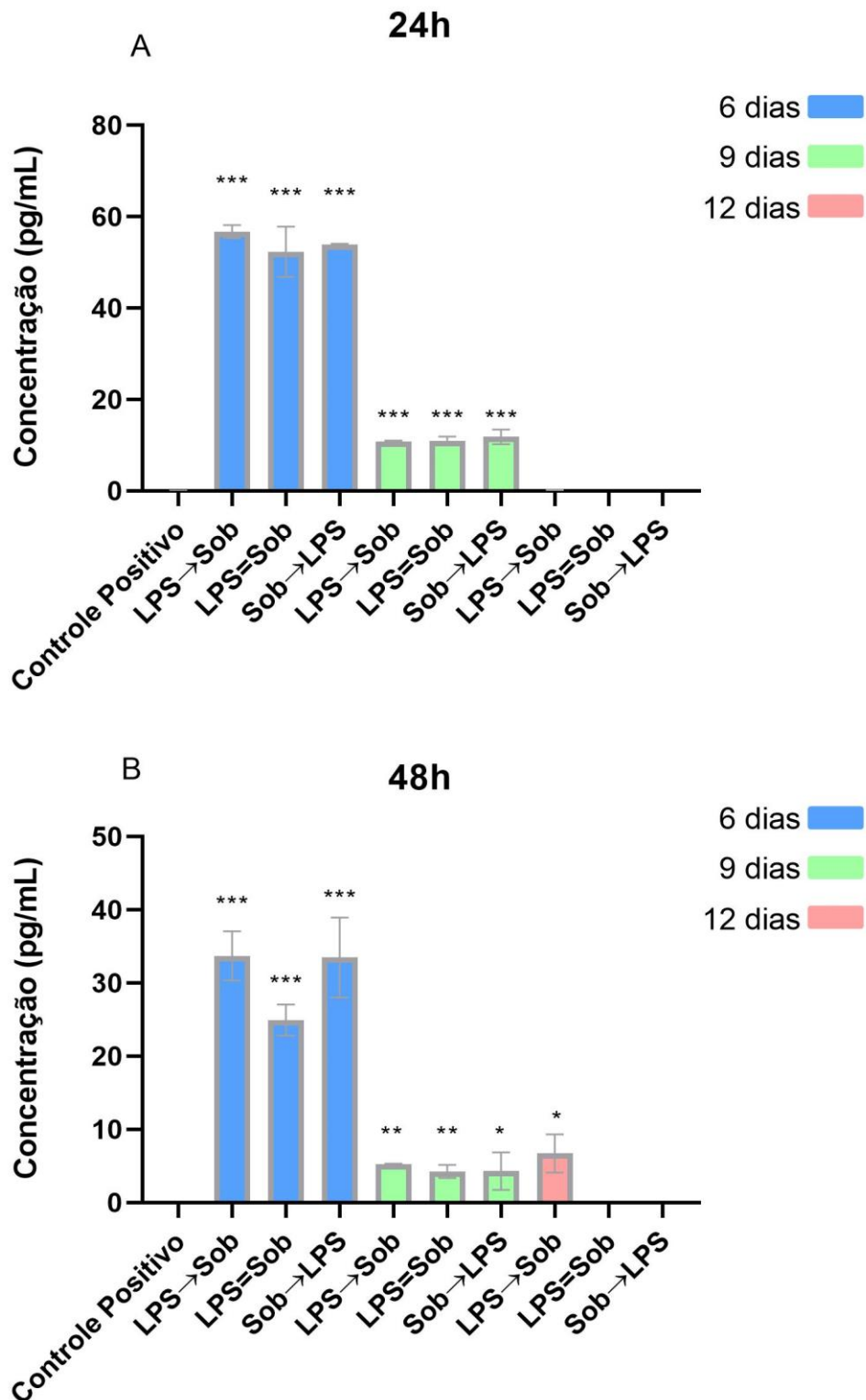


Figura 5. Concentração de IFN- γ no sobrenadante da cultura de macrófagos. (A) Análise das concentrações em 24h e (B) em 48h com células tratadas com sobrenadante de 6, 9 e 12 dias e estimuladas com LPS uma hora antes (LPS→Sob), simultaneamente (LPS=Sob) e uma hora depois (Sob→LPS). O símbolo * representa a diferença significativa quando comparado com Controle Positivo no mesmo tempo (* $p < 0,05$; ** $p <$

0,01; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). Não houve concentração detectável de IFN- γ controles. Dados apresentados em média \pm SD pg/mL. Para os tratamentos feitos com ascite de 6 e 9 dias foi utilizado o teste estatístico ANOVA one way, com pós-teste de Tukey. Para os tratamentos com ascite de 12 dias foi utilizado o teste estatístico Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

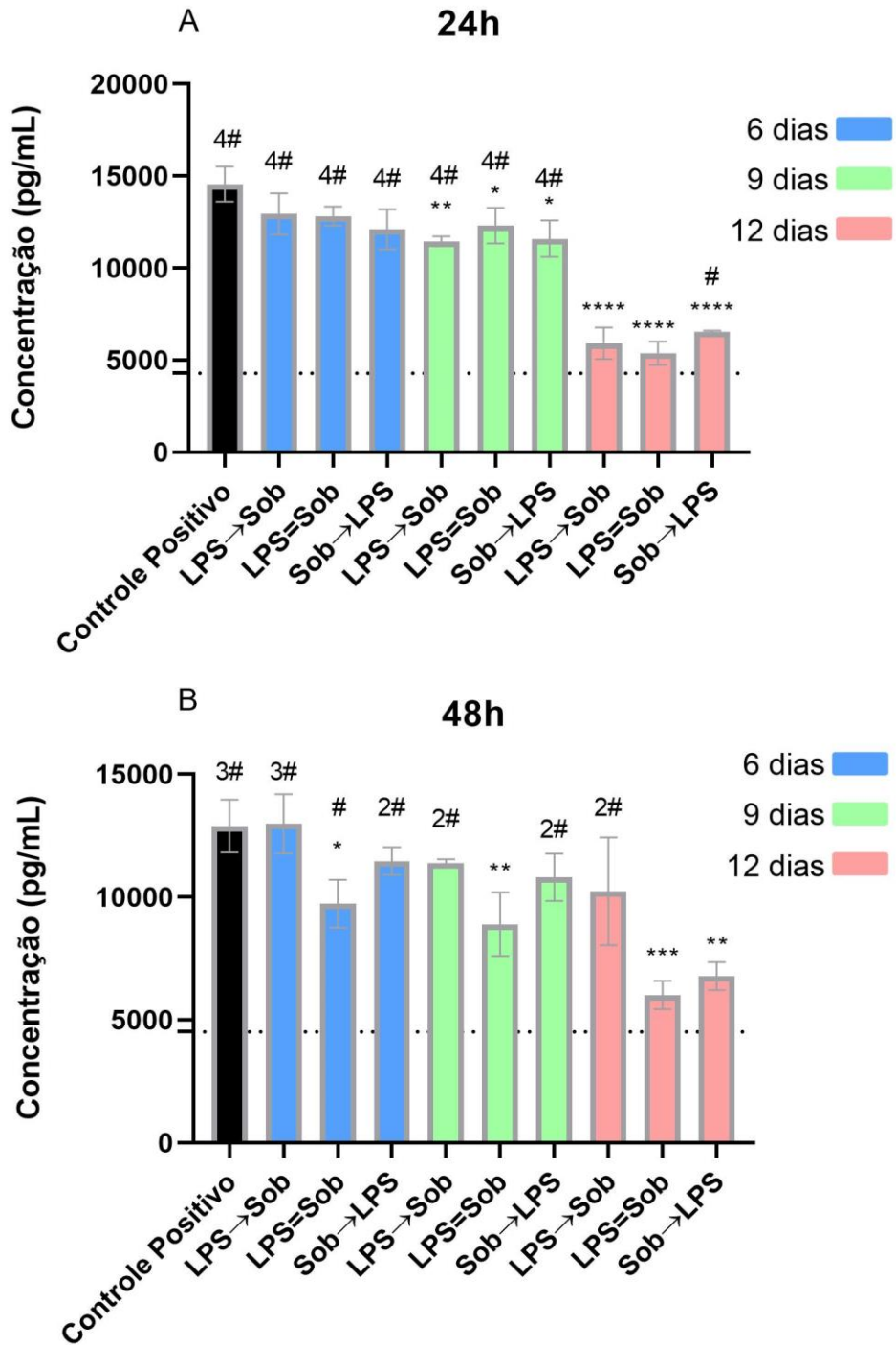


Figura 6: Concentração de TNF no sobrenadante da cultura de macrófagos. (A) Análise das concentrações em 24h e (B) em 48h com células tratadas com sobrenadante de 6, 9 e 12 dias e estimuladas com LPS uma hora antes (LPS→Sob), simultaneamente (LPS=Sob) e uma hora depois (Sob→LPS). O símbolo * representa a diferença significativa quando comparado com Controle Positivo. (*p< 0,05; **p< 0,01; ***p<0.001; ****p<0.0001). O símbolo # representa diferença significativa quando comparado ao Controle Negativo (#p< 0,05; 2#p< 0,01; 3#p<0.001; 4#p<0.0001). A linha tracejada indica a frequência média da concentração da citocina em sobrenadante de cultura de macrófagos mantidos em meio. Dados apresentados em média +/- SD pg/mL. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA one way, com pós-teste de Tukey.

Efeito do sobrenadante ascítico na produção de Óxido Nítrico (NO) da cultura de macrófagos RAW 264.7

NA cultura de 24h, os macrófagos tratados com sobrenadante de 6 dias não apresentaram uma diferença significativa na produção de NO em relação aos controles. Nos tratamentos com sobrenadante de 9 dias, os macrófagos estimulados simultaneamente e 1 hora depois apresentaram uma diminuição significativa em relação ao controle positivo. No tratamento com 12 dias, todos os grupos apresentaram uma diminuição significativa na produção de NO (Figura 8A).

Na análise realizada após 48 horas, todos os macrófagos tratados com sobrenadante de 6 e 9 dias apresentaram concentrações significativamente maiores que o controle negativo. Houve um aumento na produção de NO em todos os grupos em relação ao de 24 horas. No tratamento com sobrenadante de 6 dias, o tratamento com estímulo simultâneo apresentou uma concentração significativamente maior de NO em relação ao controle positivo. No tratamento com sobrenadante de 12 dias os grupos estimulados 1 hora antes e 1 hora depois apresentaram concentrações de NO significativamente menores que o grupo controle LPS (Figura 8B).

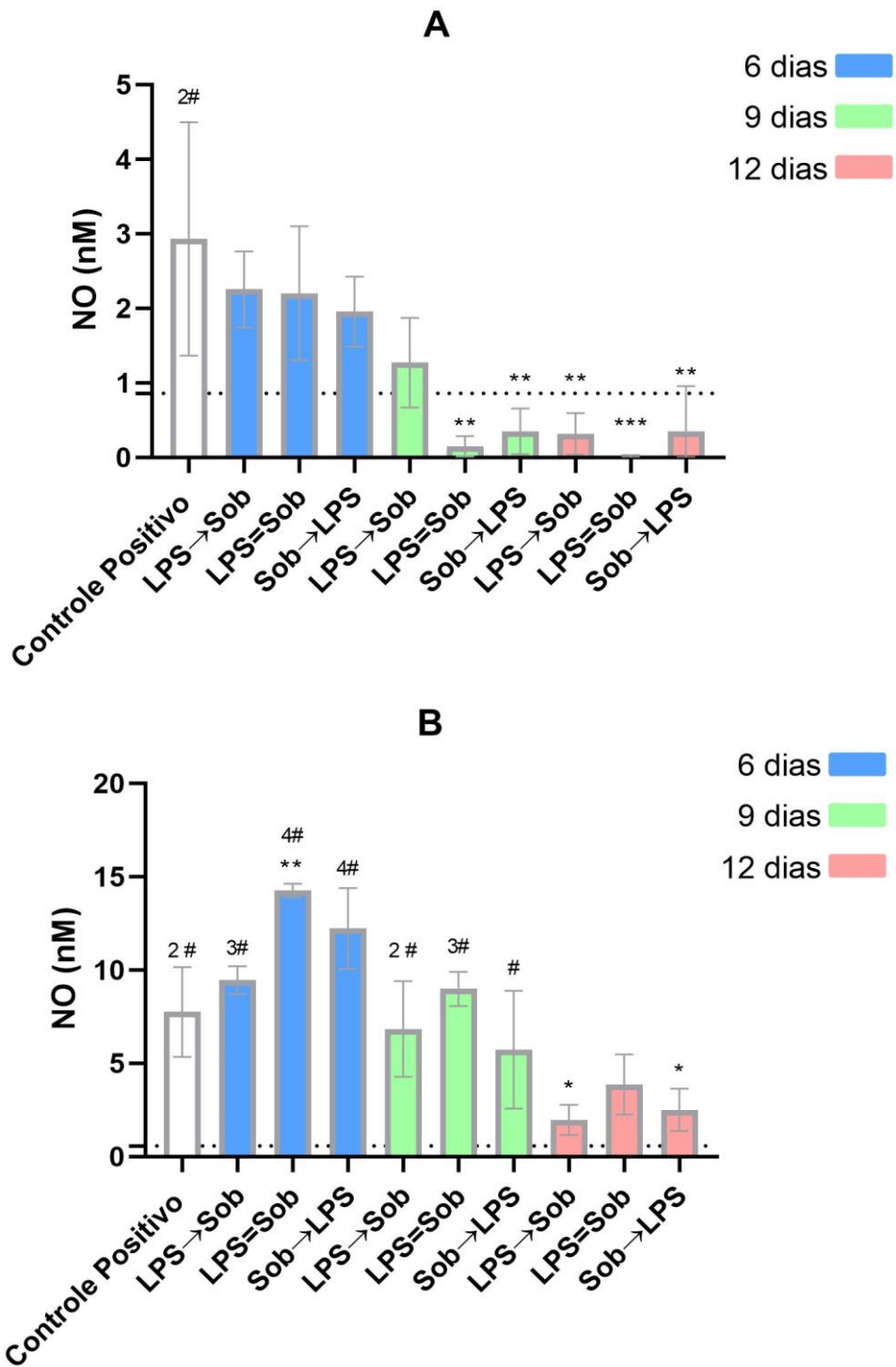


Figura 8: Concentração de NO no sobrenadante da cultura de macrófagos. (A) Análise das concentrações em 24h e (B) em 48h com células tratadas com sobrenadante de 6, 9 e 12 dias e estimuladas com LPS uma hora antes (LPS→Sob), simultaneamente

(LPS=Sob) e uma hora depois (Sob→LPS). O símbolo * representa diferença significativa quando comparado com Controle Positivo. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). O símbolo # representa diferença significativa quando comparado ao Controle Negativo (# $p < 0,05$; 2# $p < 0,01$; 3# $p < 0,001$; 4# $p < 0,0001$). A linha tracejada indica a frequência média da concentração NO em sobrenadante de cultura de macrófagos mantidos em meio. Dados apresentados em média +/- SD nM. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA one way, com pós-teste de Tukey.

A análise da concentração da citocina IL-10 foi realizada no sobrenadante da cultura de macrófagos tratados com sobrenadante das ascites de 6, 9 e 12 dias, com os diferentes tipos de estímulo com LPS em 24 e 48h. Os resultados não apresentaram diferença estatística.

Discussão

Com o passar do tempo foi observado aumento da celularidade e volume da ascite, semelhante ao encontrado por Fecchio et al³. Esse aumento de volume pode ser uma das causas que explica o aumento do peso dos animais¹⁷. Apesar do aumento da celularidade, a viabilidade diminuiu, isso acontece devido ao quadro inflamatório, que reduz o aporte de nutrientes capazes de chegar no microambiente tumoral^{17, 18}. Pode-se perceber que o aspecto da ascite se torna hemorrágico no decimo segundo dia, devido ao extravasamento de sangue e para dentro da cavidade peritoneal, causada pelo aumento de permeabilidade dos vasos em decorrência desse processo inflamatório intenso^{2, 17}.

Ao observamos o perfil das citocinas presentes na ascite, é possível perceber uma queda na concentração de IL-10, uma citocina fundamental para controle da resposta inflamatória. Em casos em que um processo inflamatório agudo se torna demasiadamente persistente, a IL-10 pode ser expressa com objetivo de estabelecer a homeostase no organismo^{19,20}. A menor concentração de IL-10 é observada principalmente no decimo segundo dia, quando o processo inflamatório está mais acentuado, sendo isso percebido pelo aspecto hemorrágico da ascite, indicando uma perda na capacidade de controlar da inflamação.

De forma contrária, foi possível observar um aumento da IL-6, com o pico no decimo segundo dia. O papel da IL-6 é estimular o processo inflamatório durante períodos de estresse, podendo ser causados, por infecção e por lesões nos tecidos²¹. Alta concentração de IL-6 costuma ser uma característica comum dentro do microambiente tumoral de diversos tipos de câncer²². O aumento da concentração de IL-6 aliada a diminuição de IL-10 pode ser um fator relevante que explica o processo inflamatório intenso observado nos camundongos de 12 dias. Uma vez que a baixa presença de IL-10 pode indicar uma perda do controle da resposta inflamatória juntamente com o estímulo inflamatório provocado pela presença da IL-6.

IFN- γ é uma citocina sintetizada principalmente por linfócitos T e por células natura killer, estimulando uma resposta inflamatória antitumoral. Uma das principais células ativadas pelo INF- γ é o macrófago, que desenvolve um perfil classicamente ativado e produtor de NO^{10, 23}. Além dos efeitos sobre os macrófagos, estudos em linhagens celulares e em modelos animais demonstraram que o INF- γ tem propriedades antitumorais, que ajudam na eliminação do tumor²⁴. É possível observar uma diminuição da concentração de INF- γ no sobrenadante tumoral do sexto dia para o decimo segundo dia, podendo indicar uma perda da capacidade de ativação de macrófagos tumorocidas, sendo benéfico para o desenvolvimento do tumoral.

O TNF é uma citocina produzida principalmente por macrófagos e que age em diversos mecanismos pró inflamatórios provocando apoptose em células tumorais²³. Durante a progressão do tumor houve uma flutuação nas concentrações de TNF que não se mostraram significativamente diferentes entre si. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura, que mostram essa flutuação na quantidade TNF durante o desenvolvimento do câncer²⁵.

Nos tratamentos realizados com os macrófagos da linhagem Raw 264.7, o sobrenadante e o estímulo com LPS não afetaram de forma significativa a viabilidade da maioria dos macrófagos, com exceção de 3 grupos em 24 horas e 1 grupo em 48 horas. O aumento detectado nesses grupos pode ser explicado pela presença de fatores que podem ser secretados pelas células tumorais e que estimulam a proliferação celular, como Fator de Transformação do Crescimento β^5 .

Nos tratamentos, todos os grupos do tempo de 24 horas apresentam uma redução na concentração de IL-6 em relação ao controle LPS e em macrófagos, o LPS

funciona como estímulo para produção de IL-6²⁶. Foi possível perceber que o sobrenadante impediu boa parte da produção dessa citocina nos macrófagos tratados. De 24 para 48 horas, houve a diminuição da concentração dessa citocina em todos os grupos e principalmente no controle. Nas 48 horas, a maioria dos grupos tratados com sobrenadante mantiveram concentrações de IL-6 maiores que o controle.

O sobrenadante casou inicialmente uma produção menor de IL-6, mas que com o passar do tempo foi mais capaz de resistir a perda da citocina. Esse achado indica macrófagos com um perfil que se afasta da inflamação aguda e se aproxima das características de inflamação crônica, com uma menor quantidade inicial de IL-6, porém que se mantém presente por mais tempo²⁷.

Em 24 horas, não houve produção INF- γ nos controles, ao contrário dos grupos tratados com sobrenadante de 6 e 9 dias, em que foi observado aumento significativo da concentração de INF- γ . Um resultado semelhante foi observado nas 48 horas. A falta da produção de IFN- γ nos controles é esperada, já que os macrófagos não são produtores primários dessa citocina, sendo principalmente produzida por células T e NK²⁸. Porém, macrófagos podem ser estimulados a produzir IFN- γ quando estão em contato com as citocinas IL-12 e IL-18²⁹. Essas citocinas podem ser produzidas por macrófagos ativados para um perfil mais inflamatório, que estariam mais presentes no tumor de 9 e principalmente de 6 dias.

Foi observado em 24 horas que os macrófagos tratados com sobrenadante de 9 e 12 dias tiveram uma produção menor de TNF em relação ao controle positivo. O TNF pode ser produzido por macrófagos que são estimulados com LPS ou INF- γ e tem um papel importante no combate as células tumorais^{30, 31}. Foi demonstrado que a ascite tem uma redução da concentração de INF- γ com o passar dos dias, com a menor quantidade no dia 12, o que poderia fazer com que os macrófagos tivessem um estímulo a menos para a produção de TNF. Além disso, os sobrenadantes de 9 e 12 dias também conseguiram combater o efeito do estímulo do LPS para produção de TNF.

Houve uma redução de 24 para 48 horas na concentração de TNF nos grupos controles e nos grupos tratados. Interessantemente, houve uma menor concentração de TNF nos grupos que foram estimulados simultaneamente com LPS, indicando que quando o tratamento é feito junto ao estímulo, os macrófagos têm uma menor capacidade de manter os níveis de TNF ao longo do tempo.

O NO é produzido por macrófagos ativados como método de combater as células tumorais, sendo a baixa produção ou a falta de NO um traço comum de macrófagos mais tolerogênicos³². Nos tratamentos, foi possível perceber que o sobrenadante de 9 e 12 dias diminuíram a produção de NO em relação ao controle positivo, indicando que os TAMs no tumor de Ehrlich, tem pouca capacidade de produção dessa molécula⁶.

Após 48 horas, a produção geral de NO aumentou, o que é esperado já que se leva um tempo do momento do estímulo até a produção do óxido. Porém, no tratamento com sobrenadante de 12 dias estimulado uma hora antes e depois, a produção se manteve menor que os controles, mostrando que de fato o sobrenadante dessa fase ascítica é mais competente em inibir a produção de NO.

Conclusão

Ao observamos o perfil das citocinas produzidas no sobrenadante tumoral, é possível inferir que no sexto dia da evolução do câncer, há o início da resposta inflamatória. No nono dia, a concentração das citocinas começa a mudar, indicando uma perda da capacidade do controle da inflamação, que se agrava no decimo segundo dia, em que há alta produção de IL-6 e baixa produção de IL-10. A diminuição de INF- γ sugere uma perda na capacidade de ativar macrófagos com perfil inflamatório antitumoral.

Nos tratamentos com o sobrenadante tumoral, é notável que principalmente na ascite de 12 dias, há uma subversão na produção de citocinas em relação aos macrófagos controle, sendo notável que essa subversão aconteça mesmo nos tratamentos em macrófagos que foram previamente estimulados com LPS. Evidenciando que os macrófagos associados o tumor ascítico de Ehrlich tem menos capacidade produzir IL-6, TNF e NO, que são importantes recursos para o combate ao câncer.

As mudanças na inflamação ocorrida durante o desenvolvimento tumoral, parece estimular macrófagos menos competentes na eliminação de células tumorais, indicando o uso do TAMs como forma de escape da resposta imune.

Referências

1. Mayer KD. The pathogenicity of the Ehrlich ascites tumour. *Br J Exp Pathol.* 1966;47(5):537-544
2. Hartveit F. The immediate cause of death in mice with Ehrlich's ascites carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;65(3):359-365. doi:10.1111/apm.1965.65.3.359
3. Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation.* 1990;14(1):125-132. doi:10.1007/BF00914035
4. Chen L, Watkins JF. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. *Nature.* doi.org/10.1038/225734a0
5. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* doi.org/10.1038/ni.1937
6. Sica A, Larghi P, Mancino A, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.* 2008;18(5):349-355. doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.004
7. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:948098. doi.org/10.1155/2012/948098
8. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13. doi.org/10.12703/P6-13
9. Symchych TV *, Fedosova NI, Chumak AV, et al. Functions of tumor-associated macrophages and macrophages residing in remote anatomical niches in Ehrlich carcinoma bearing mice. *Exp Oncol.* 2020;42(3):197-203. doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-3.14928
10. Somasundaram V, Basudhar D, Bharadwaj G, et al. Molecular Mechanisms of Nitric Oxide in Cancer Progression, Signal Transduction, and Metabolism. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30(8):1124-1143. doi.org/10.1089/ars.2018.7527
11. Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol.* 2015;6:334-343. doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.009

12. Nishikawa M, Chang B, Inoue M. Inducible NO synthase inhibits the growth of free tumor cells, but enhances the growth of solid tumors. *Carcinogenesis*. 2004;25(11):2101-2105. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh218>.
13. Sakai M, Fonseca ES, Dagli ML, Palermo-Neto J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. *Life Sci*. 2006;78(16):1777-1783. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.08.015>
14. FREITAS, J. Manual básico de oncologia experimental: Tumor de Ehrlich. Belém: Editora da Universidade do Estado do Pará, 2018
15. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Appendix 3:. doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21
16. Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta*. 1998;274(2):177-188. [doi.org/10.1016/s0009-8981\(98\)00060-6](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(98)00060-6)
17. Rivenson A, Schnelle V, Moroson H, et al. Variable response of spleen to ehrlich's tumor according to the physical form (ascitic or solid) of the tumor. *Experientia*. 1981;37(2):195-197. [doi:10.1007/BF01963229](https://doi.org/10.1007/BF01963229)
18. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):23-63. [doi:10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30](https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30)
19. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(5):331-344. [doi:10.1016/j.cytogfr.2010.09.002](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002)
20. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10):a016295. Published 2014 Sep 4. [doi:10.1101/cshperspect.a016295](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295)
21. Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol*. doi.org/10.1007/s13277-016-5098-7
22. Wu C, Xue Y, Wang P, et al. IFN- γ primes macrophage activation by increasing phosphatase and tensin homolog via downregulation of miR-3473b. *J Immunol*. 2014;193(6):3036-3044. [doi:10.4049/jimmunol.1302379](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302379)
23. Sun T, Yang Y, Luo X, et al. Inhibition of tumor angiogenesis by interferon- γ by suppression of tumor-associated macrophage differentiation. *Oncol Res*. 2014;21(5):227-235. [doi:10.3727/096504014X13890370410285](https://doi.org/10.3727/096504014X13890370410285)

24. Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol Ser.* 1992;56:3-34
25. Gentile LB, Queiroz-Hazarbassanov N, Massoco Cde O, Fecchio D. Modulation of Cytokines Production by Indomethacin Acute Dose during the Evolution of Ehrlich Ascites Tumor in Mice. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:924028. doi.org/10.1155/2015/924028
26. Gabay, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 8 (Suppl 2), S3 (2006). doi.org/10.1186/ar1917
27. Keppel MP, Saucier N, Mah AY, et al. Activation-specific metabolic requirements for NK Cell IFN- γ production. *J Immunol.* 2015;194(4):1954-1962. doi:10.4049/jimmunol.1402099
28. Darwich L, Coma G, Peña R, et al. Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology.* 2009;126(3):386-393. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02905.x
29. Wang X, Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?. *Acta Pharmacol Sin.* 2008;29(11):1275-1288. doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00889.x
30. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, et al. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1998;187(4):601-608. doi:10.1084/jem.187.4.601
31. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med.* 1997;186(10):1757-1762. doi:10.1084/jem.186.10.1757
32. Kashfi K, Kannikal J, Nath N. Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of iNOS-Derived NO. *Cells.* 2021;10(11):3194. Published 2021 Nov 16. doi.org/10.3390/cells10113194