



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA POR FOSFOLIPÍDIO  
OXIDADO DO LÍQUIDO SURFACTANTE E MODULAÇÃO  
DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES**

**LUANA DA COSTA LOUREIRO**

**MANAUS – AMAZONAS**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA POR FOSFOLIPÍDIO  
OXIDADO DO LÍQUIDO SURFACTANTE E MODULAÇÃO  
DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES**

**LUANA DA COSTA LOUREIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

**Orientador: Prof. Dr. CARLOS ARTERIO SORGI**

**Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. LUCIA HELENA FACCIOLI**

**MANAUS – AMAZONAS**

**2017**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L892a Loureiro, Luana da Costa  
Atividade antiproliferativa por fosfolípido oxidado do líquido  
surfactante e modulação de macrófagos associados a tumores /  
Luana da Costa Loureiro. 2017  
87 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Arterio Sorgi  
Coorientadora: Lucia Helena Faccioli  
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Fosfolípidios. 2. Terapia. 3. Macrófagos. 4. Câncer. I. Sorgi,  
Carlos Arterio II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus irmãos e a todos os amigos que me apoiaram, torceram e me motivaram durante essa jornada.

## *Agradecimentos*

Agradeço primeiramente a Deus, a Jesus e ao Espírito Santo, pela força, fé, esperança e presença, em todos os dias.

À meu orientador, Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi, pela oportunidade oferecida, pela paciência e ensino.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Helena Faccioli, pela oportunidade em conhecer e desenvolver este trabalho em seu laboratório, pelo apoio e ensino.

Aos meus pais, Antônio e Juracileide, por sempre acreditarem e apoiarem meus estudos, pelos incentivos, pelas “injeções” de fé e ânimo, pelo cuidado e investimento durante todo esse período de estudos. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Luma, Tarcisio, Ricardo, Thiago, Júnior, Jéssica e Amanda. Vocês são a melhor família!

Aos meus sobrinhos lindos, Luiz Gustavo, Luísa, Lívia, Lorenzo e Pietro. Como os amo!

À minha família como um todo (impossível citar nomes), tios, tias, primos e primas, os de perto e os distantes, que sempre apoiaram, investiram e torceram!

À todo o pessoal do LIIP (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses) e LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética), Mouzarlem (Mouzard), Morgana (Morgs), Karina (Ká), Gisele (Gi), Mirella (Mi), Luana (Lu), Leonardo (Léo), Fabiana (Fabi), Priscilla Cardoso (Pri), Priscilla Tartari (Pri), Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiani, Edson, Marcella, Ricardo, Polyane (Poly), Nadiele (Nadi), Ana Paula, Carol e Alyne. Gente, vocês não tem noção do quanto foram importantes para este trabalho. A singularidade de cada um de vocês ficará em meu coração! Obrigada por todo ensino, apoio, paciência, conversas e pela amizade!

A todas as pessoas que conheci em Manaus e em Ribeirão Preto, e que hoje posso chamar de amigos! Deus colocou cada um de vocês na minha vida, no momento certo!

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas, ao Programa de Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), e Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (USP-RP) pela oportunidade e parceria desenvolvida.

À Secretaria do PPGIBA, Ana Paula e Edson, pela ajuda de sempre.

À Capes pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

**“O fim de uma coisa vale mais do que o seu começo.”**

**Eclesiastes 7: 8a**

## RESUMO

O metabolismo de lipídios e suas funções biológicas, principalmente no processo de re-estruturação das membranas celulares e seus efeitos na imunologia celular é motivo de abordagem de estudo, conhecida como Terapia de Lipídios de Membrana (TLM). As proporções e composições de lipídios de membrana estão modificadas em pacientes com câncer, como também em outras patologias. O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres, e células do sistema imune como os macrófagos (MA) atuam como importantes mediadores da resposta tumoral. O fenótipo M1 é essencial na resposta imune contra tumores. Porém já se sabe que células tumorais podem modular o fenótipo de MA, favorecendo o perfil pró-tumoral (M2). No líquido surfactante (LS) pulmonar, podem ocorrer a formação de fosfolipídios oxidados gerados por ação do ozônio no processo respiratório, sendo importantes alvos de desenvolvimento da TLM. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da fosfatidilcolina oxidada em células tumorais pulmonar (LL/2) *in vitro*, e correlacionar a TLM utilizada com a modulação de MA associados ao câncer. Nossos resultados demonstraram que *PaldoPC* não foi citotóxico para células tumorais de LL/2, porém, apresentou efeito antiproliferativo nas culturas tumorais em longo período de tratamento. Também demonstramos que o tratamento com *PaldoPC* modulou a produção de NO, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, KC e MCP-1 em MA em co-cultura com LL/2, de modo dependente da polarização dos MA. Além disso, observamos o aumento na produção de PGE<sub>2</sub> nos diferentes perfis MA em associação com LL/2, e o tratamento com *PaldoPC* aumentou a produção de PGE<sub>2</sub> nos M1 em co-cultura com LL/2. Assim, concluímos que a fosfatidilcolina oxidada do líquido surfactante *PaldoPC* possui potencial terapêutico no câncer (LL/2), com efeito direto sobre as células cancerosas, ou indireto na modulação de macrófagos.

**Palavras chave:** Fosfolipídios, terapia, macrófagos e câncer.

## ABSTRACT

The lipid metabolism and its biological functions, mainly in the process of restructuring the lipid membrane and its effect on cellular immunology, is target for studies, as known as Membrane Lipid Therapy (MLT). It is already known that the proportions and composition of membrane lipids are modified in cancer patients, as well as in other pathologies. Lung cancer is the leading cause of cancer death among men and women, and cells from the immune system such as macrophages (MA) act as important mediators of tumor response. The M1 phenotype is essential in the immune response against tumors. However, it is well known that tumor cells can modulate the MA phenotype, become pro-tumor (M2). In the pulmonary liquid surfactant (LS), there are oxidized phospholipids that can be generated by ozone action in the respiratory process, also been important target to development MLT. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of the oxidized phosphatidylcholine *Pa/do*PC on pulmonary tumor cells (LL/2) in vitro, and to correlate the MLT used with the MA modulation associated with cancer. Our results demonstrated that *Pa/do*PC did not induce cytotoxic for LL/2, but presented an anti-proliferative effect on tumor cultures in long treatment period. We also demonstrated that *Pa/do*PC treatment had effect on NO, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, KC and MCP-1 modulation on MA co-culture with LL/2, and dependent of MA polarization profiles. We also observed that the co-culture of MA with LL/2 increased the production of PGE<sub>2</sub> in different MA phenotypes, and treatment with *Pa/do*PC increased the production of PGE<sub>2</sub> on M1 in co-culture with LL/2. Thus, we conclude that the surfactant liquid oxidized phosphatidylcholine *Pa/do*PC had therapeutic potential for cancer (LL/2), which presented direct effect on cancer cells, or indirect effect on macrophage modulation.

**Key words:** Phospholipids, therapy, macrophages and cancer.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AC	Adenocarcinoma
ACS	American Cancer Society
ALPs	Alquil-fosfolipídios
APCs	Células apresentadoras de antígenos
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CCE	Carcinoma de células escamosas
COX	Ciclooxigenase
CPCNP	Carcinoma de pulmão de células não pequenas
CPPC	Câncer pulmonar de pequenas células
DP	Receptor de prostaglandina D
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
EUA	Estados Unidos da América
HBSS	HBSS - Hank's Balanced Salt Solution
HepG2	Células de hepatoma humano
HETEs	Hidroieicosatetraenóicos
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
IL-	Interleucina
INCA	Instituto nacional do câncer
IFN- $\gamma$	Interferon gama
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LL/2	Carcinoma pulmonar de Lewis
LOX	Lipoxigenase
LPC	Lisofosfatidilcolina (lisolecitina)
LPS	Lipopolissacarídeo
LS	Líquido surfactante
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas

M1	Macrófago ativado pela via clássica
M2	Macrófago ativado pela via alternativa
MA	Macrófagos
MATs	Macrófagos associados a tumores
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
M-CSF	Fator de estimulação de colônias de macrófagos
MDMO	Macrófagos derivados de medula óssea
MIF	Média da intensidade de fluorescência
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NO	Óxido nítrico
O <sub>3</sub>	Ozônio
OMS	Organização mundial da saúde
oxLDL	Fosfolipídios oxidados do LDL
oxPAPC	1-palmitoil-2-araquidonil-sn- glicero-3-fosforilcolina
oxPC	Fosfatidilcolinas oxidadas
oxPLS	Fosfolipídios oxidados do líquido surfactante
PaldoPC	1-palmitoil-2-(9'-oxo-nonanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina
PAFr	Receptor do fator de ativação de plaquetas
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PG	Prostaglandinas
PGEs	Prostaglandinas E-sintase
PI	Fosfatidilinositol
PGPC	1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosfocolina
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A2
POPC	Palmitoil-oleil-fosfatidilcolina
POPG	Palmitoil-oleil-fosfatidilglicerol
POVPC	1-palmitoil-2-(5-oxovaleroil)-sn-glicero-3-fosfocolina
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PS	Fosfatidilserina

RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador beta
TLM	Terapia de lipídios de membrana
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs	Células T Regulatórias
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química dos fosfolipídios comerciais utilizados .....	35
<b>Figura 2.</b> Citotoxicidade dos fosfolipídios em células tumorais .....	47
<b>Figura 3.</b> Efeito dos fosfolipídios na atividade citostática tumoral.....	49
<b>Figura 4.</b> Viabilidade celular de LL/2 em co-cultura com MDMO ativados ou não pela via clássica ou alternativa .....	51
<b>Figura 5.</b> Efeito dos fosfolipídios na produção de NO por MDMO ativados ou não pela via clássica ou alternativa, e em associação com células LL/2 .....	53
<b>Figura 6.</b> Regulação da expressão de mRNA de MDMO em co-cultivo com LL/2 e tratados com fosfolipídios .....	55
<b>Figura 7.</b> Produção de citocinas e quimiocinas por M0, tratados com fosfolipídios, e em co-cultivo com LL/2 .....	57
<b>Figura 8.</b> Produção de citocinas e quimiocinas por M1, tratados com fosfolipídios, e em co-cultivo com LL/2 .....	59
<b>Figura 9.</b> Produção de citocinas e quimiocinas por M2, tratados com fosfolipídios, e em co-cultivo com LL/2 .....	61
<b>Figura 10.</b> Produção de prostaglandinas por MDMO, em co-cultivo com células tumorais LL/2, e tratados com fosfolipídios .....	64

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1. Câncer de pulmão: epidemiologia, patogênese, tratamento e sobrevida .....	18
2.2. Imunologia de Tumores .....	20
2.3. Macrófagos associados a tumores .....	21
2.4. Terapia de Lipídios de Membrana com ação antitumoral .....	23
2.4.1. Fosfolipídios .....	23
2.4.2. Lipídios oxidados .....	24
2.4.3. Eicosanoides .....	25
2.5. Lipídios do líquido surfactante (LS) .....	27
<b>3. OBJETIVO</b> .....	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1. Fluxogramas metodológicos .....	31
4.2. Fosfolipídios .....	35
4.3. Animais .....	36
4.4. Cultivo celular tumoral .....	36
4.5. Obtenção de células da medula óssea.....	36
4.6. Culturas primárias de macrófagos derivados de medula óssea .....	37
4.7. Polarização de macrófagos (via clássica / alternativa).....	37
4.8. Tratamento com fosfolipídios <i>in vitro</i> .....	38
4.9. Ensaio de citotoxicidade celular.....	38
4.10. Ensaio de viabilidade e proliferação celular .....	38
4.11. Ensaio clonogênico .....	39
4.12. Atividade tumoral de macrófagos .....	39
4.13. Dosagem de mediadores proteicos por ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	40
4.14. Quantificação de NO .....	41
4.15. Análise quantitativa de prostaglandinas .....	41
a. Extração e purificação de lipídios. ....	42
b. Análise das PGs por HPLC-MS/MS.....	42

4.16. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)..	43
4.17. Análise estatística .....	44
4.18. Soluções e Meios utilizados nos procedimentos experimentais .....	44
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
5.1. Efeito das fosfatidilcolinas na citotoxicidade de células tumorais LL/2 .....	46
5.2. Efeito das fosfatidilcolinas na viabilidade reprodutiva de células tumorais LL/2 .....	48
5.3. Avaliação da viabilidade de células LL/2 em co-cultura com macrófagos ativados pela via clássica ou alternativa .....	50
5.4. Produção de NO por MDMO em co-cultivo com LL/2, e efeito dos fosfolipídios na modulação de MATs .....	52
5.5. Avaliação da expressão gênica de marcadores de fenótipos de MDMO, após co-cultivo com LL/2 e tratado com fosfolipídios .....	54
5.6. Efeito dos fosfolipídios na produção de mediadores inflamatórios proteicos por MDMO não polarizados (M0), em co-cultivo com células tumorais LL/2 .....	56
5.7. Efeito dos fosfolipídios na produção de mediadores inflamatórios proteicos por MDMO ativados pela via clássica (M1), em co-cultivo com células tumorais LL/2 .....	58
5.8. Efeito dos fosfolipídios na produção de mediadores inflamatórios proteicos por MDMO ativados pela via alternativa (M2), em co-cultivo com células tumorais LL/2 .....	60
5.9. Produção de prostaglandinas por M0, M1 e M2, em co-cultivo com LL/2, e tratado com fosfolipídios .....	62
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>86</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer ainda é um grande fator homicida em todo o mundo, mesmo com todas as pesquisas e o desenvolvimento ocorrido nos últimos anos. É a segunda causa de morte no mundo e foi responsável por 8,8 milhões de mortes no ano de 2015 (WHO, 2017). Nos Estados Unidos da América (EUA), por exemplo, também é a segunda maior causa de morte, seguida das doenças cardíacas (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). Estimativas indicam que em 2020, aproximadamente 7,5 bilhões de pessoas existirão no mundo, sendo que 15 milhões destes, terão novos casos de câncer diagnosticados, e 12 milhões pessoas morrerão acometidos por esta doença (BRAY; MØLLER, 2006). Sabe-se que o câncer tem se tornado um problema de saúde pública mundial, e o que se tem calculado para 2025 é que ele corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos estimados. As estimativas para o ano de 2016 e para este ano, 2017, eram de 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2015).

Todo câncer tem início quando células de um local do corpo começam a crescer de forma descontrolada (ACS, 2017). Quando o câncer tem origem em tecidos epiteliais como pele ou mucosas, este é denominado de carcinoma. Quando, porém, se inicia em tecidos conjuntivos como músculo, cartilagem ou osso, se denominam de sarcoma (INCA, 2015). Pode ser causado por fatores internos (mutações hereditárias, condições imunes) e fatores ambientais (microrganismos, radiação, dieta, tabaco). A relação entre o câncer e a dieta, por exemplo, se mostra pela variação nas taxas de tipos específicos de câncer em diversos países (ANAND et al., 2008). Estudos apontam que a maior parte dos tipos de câncer não é de origem hereditária, mas estão relacionados ao estilo de vida, como consumo de álcool, tabagismo e hábitos alimentares (IRIGARAY et al., 2007).

As células cancerígenas mutagênicas adquirem um conjunto de características peculiares, como potencial ilimitado de proliferação, a autosuficiência em sinais de crescimento, e resistência a sinais antiproliferativos e apoptóticos (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009). Poluentes do ar como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) elevam os riscos de desenvolver câncer, principalmente o câncer de pulmão. Mas existem estudos que mostram que o óxido

nítrico, produzido por estresse oxidativo, também pode promover o câncer de pulmão, assim como levar a metástase (ANAND et al., 2008).

O carcinoma de pulmão de não pequenas células (CPNPC) é um dos tipos mais comuns de câncer de pulmão, além de ser um dos mais agressivos (HOLMBERG et al., 2010; RILEY et al., 2013). Das malignidades primárias de pulmão, somente este representa 85% (SANGHA; PRICE; BUTTS, 2010). Os subtipos mais frequentes deste tipo de câncer são o carcinoma de células escamosas (CCE) e o adenocarcinoma (AC), sendo que nos últimos anos foi constatado aumento de AC (HERBST; HEYMACH; LIPPMAN, 2008; RILEY et al., 2013; SILVESTRI; SPIRO, 2006). Pacientes acometidos por este tipo de câncer são pessoas com média de idade de 70 anos, sendo que mais de 75% desses pacientes apresentam metástase, ou tumor localmente invasivo, limitando assim o sucesso das terapias convencionais (EDGE; COMPTON, 2010).

A quimioterapia em cânceres hematológicos é de muita importância, mas em tumores sólidos não tem tanta eficácia, pela resistência desses tumores, assim como, pela toxicidade desse procedimento. Surgiu então nos últimos anos, terapias que são menos tóxicas e que permitem ao paciente ter uma melhor qualidade de vida, que são as terapias alvos e a imunoterapia. A primeira engloba moléculas inibidoras pequenas ou anticorpos monoclonais que interagem diretamente com o tumor ou no microambiente tumoral. A segunda inclui a utilização de anticorpos monoclonais, vacinas, citocinas e outros, que possibilitam a estimulação do sistema imunológico (CLARK et al., 2013). Assim, uma das alternativas emergentes para estes tipos de câncer seria a Terapia de Lipídios de Membrana (TLM) (ESCRIBÁ, 2006).

As doenças humanas estão relacionadas com defeitos ou anormalidades que geralmente acontecem em macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos, pois as funções das células estão frequentemente ligadas ao funcionamento dessas macromoléculas (ESCRIBÁ, 2006). Por outro lado, tem sido descrito que alterações nas quantidades e tipos dos lipídios de membrana podem ocasionar muitas patologias humanas (LEE, 2004; VOGLER et al., 2004; YEAGLE, 2005). A perda da assimetria dos lipídios na membrana está relacionada com apoptose, coagulação sanguínea e muitas outras desordens na saúde (ZWAAL; COMFURIUS; BEVERS,

2004). Em doenças como o câncer são observadas diversas modificações nas vias de sinalização, e estas modificações são específicas do tipo de câncer (ESCRIBÁ, 2006). Sabe-se que algumas células cancerígenas são resistentes à quimioterapia (ESCRIBA et al., 1990). Além disso, foi demonstrado que as quantidades de lipídios de membrana estão modificadas/alteradas em pacientes com câncer (HENDRICH; MICHALAK, 2003a; MIKIROVA et al., 2004). Nesse sentido, é relevante que terapias sejam realizadas para a regulação da membrana lipídica e sua funcionalidade celular. A TLM tem como objetivo desenvolver fármacos que sejam eficazes em modular a organização lipídica, levando também a mudanças na atividade e posição de proteínas de membrana. Esse ajuste pode levar a alterações na expressão gênica e na sinalização celular, podendo ocasionar alterações na condição patológica (ESCRIBÁ, 2006).

Estudos demonstraram que a TLM pode ser usada em conjunto com outras terapias para o tratamento de muitas doenças da atualidade, e não só para aquelas ditas como raras (ESCRIBÁ et al., 2015). A quimioterapia convencional, por exemplo, está fundamentada na relação do fármaco com as proteínas. Os fármacos que atuam no modelo terapêutico de lipídios de membrana modelam a composição bioquímica das mesmas (MARTÍNEZ et al., 2005). Mas, ambos atuam na regulação da atividade das proteínas (ESCRIBÁ, 2006). Levando em conta o pouco conhecimento da estrutura da membrana lipídica, como também a sua aplicabilidade em comparação às proteínas, os lipídios são alvos complexos de estudo. A quantidade de possíveis estruturas secundárias produzidas pelos lipídios é muito maior do que aquelas formadas pelos ácidos nucleicos e pelas proteínas (ESCRIBÁ et al., 2008). Um fator bastante relevante dessa abordagem terapêutica, se encontra na diversidade de lipídios que compõe as diferentes membranas celulares, favorecendo assim para que o fármaco atue de modo específico. Em contraste, os fármacos que possuem as proteínas como alvo, podem agir tanto em células doentes, como nas saudáveis (ESCRIBÁ, 2006).

Portanto, bem mais que uma barreira que separa o meio externo e interno de uma célula, as membranas celulares são responsáveis por diversos processos bioquímicos, como a renovação dos fosfolipídios e posicionamento de proteínas/receptores, a elaboração de mensageiros secundários lipídicos na

sinalização celular, e a expressão gênica derivada destes processos de sinalização, que são críticas para a fisiologia celular (VINK et al., 2007).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Câncer de pulmão: epidemiologia, patogênese, tratamento e sobrevida**

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres. Uma em cada quatro pessoas que morrem de câncer, são de câncer de pulmão (ACS, 2017). Possui uma razão mortalidade/incidência (M/I) de cerca de 90%, sendo então considerado um dos mais agressivos (INCA, 2015). Nos Estados Unidos, o câncer de pulmão é o tipo de câncer que mais causa mortes, sendo que de 2008 a 2012 foram contabilizados mais óbitos relacionados a este tipo de câncer, do que aos cânceres de mama, próstata e colorretal (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). A American Cancer Society estima que para este ano de 2017 nos EUA exista cerca de 222.500 novos casos de câncer de pulmão, e cerca de 155.870 mortes por este tipo de câncer (ACS, 2017).

Para o ano passado (2016), no Brasil, as estimativas eram de 17.330 novos casos de câncer de traquéia, brônquios e pulmões entre homens e 10.890 entre mulheres. Com exceção do câncer de pele não melanoma, o câncer de traqueia, brônquios e pulmões em homens é o segundo mais frequente nas Regiões Sul e Centro-Oeste, e o terceiro nas regiões Sudeste, Nordeste e Norte. Nas mulheres, é o terceiro mais frequente na Região Sul, o quarto, nas Regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, e o quinto mais frequente na Região Norte (INCA, 2015). De acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade, em 2013, morreram por câncer de pulmão, mais de 24 mil pessoas no Brasil (INCA, 2017).

Segundo a OMS o fumo é o principal problema de saúde pública da história da humanidade. Em fumantes ativos, o risco de morte se eleva em 20 a 30 vezes, e em fumantes passivos de 30% a 50%. Em relação aos homens, o hábito de fumar tem elevado os casos de câncer de pulmão (MALTA et al., 2007). Calcula-se que 80 a 90% das ocorrências de câncer de pulmão se deve ao hábito de fumar (SCHWARTZ et al., 2007). Este hábito, anualmente é responsável por 6 milhões de mortes no mundo e 147 mil mortes no Brasil (INCA, 2015). Mundialmente, 40% das crianças, 35% das mulheres e 33% dos homens não fumantes estão expostos à fumaça dos derivados do tabaco (ÖBERG et al., 2011). A fumaça que é inalada, juntamente com outros produtos provenientes do tabaco, contém muitos fatores cancerígenos, assim como produtos pró-inflamatórios (WHO, 2004).

O câncer de pulmão é classificado em dois tipos: o carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC) e carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC). O CPNPC inclui o carcinoma de células escamosas (25-30%), adenocarcinoma (40%) e carcinoma de grandes células (10-15%). Porém, a sobrevivência dos pacientes está ligada mais ao estágio da doença do que aos tipos histológicos (MULLER et al., 2011). No entanto, somente 20% dos casos de câncer de pulmão são diagnosticados no início. Geralmente, o diagnóstico é feito quando a doença já está bem avançada, o que dificulta o tratamento (NOVAES et al., 2008).

O CPNPC pode surgir a partir do epitélio, que a primeira vista parece saudável, como também, de lesões malignas, como displasia escamosa, hiperplasia adenomatosa atípica e carcinoma *in situ* (KERR, 2001; WANG et al., 2006). Os adenocarcinomas de pulmão são mais encontrados na periferia, sendo caracterizados por sua diferenciação glandular ou formação de muco (SHIM et al., 2011). Ele é o tipo de câncer de pulmão mais comum em mulheres do que em homens, assim como em pessoas mais jovens comparados a outros cânceres de pulmão. Pode também surgir em fumantes ativos, como em pessoas que já pararam de fumar, bem como em não-fumantes, e cresce mais lento que outros cânceres de pulmão. O carcinoma de células escamosas começa nas células que revestem o interior das vias aéreas dos pulmões, geralmente nos brônquios, e está muito relacionado ao tabagismo. O carcinoma de grandes células pode surgir em qualquer parte do pulmão, e se propagar rapidamente tornando mais difícil o tratamento (ACS, 2017).

Células tumorais em metástase, antes de se difundir para locais distantes, invadem primeiramente os tecidos subjacentes. Uma característica também de células tumorais é a indução de angiogênese, por meio de fatores de crescimento (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Com relação ao metabolismo de células tumorais, também é observado diferenças na produção de ácido láctico, pois estas produzem maiores quantidades comparadas às células normais devido ao estado de hipóxia. Isso se deve ao aumento da glicólise e diminuição da respiração aeróbica (MATOBA et al., 2006).

Pessoas com CPNPC possuem uma taxa de sobrevivência de 5 anos, após realizado o diagnóstico. Mas isso pode variar por motivos específicos, como por

exemplo, pelo estágio do câncer, idade do paciente, resposta do câncer ao tratamento, dentre outros (ACS, 2017). Pacientes com tumores em estágios avançados possuem tempo médio de sobrevivência de 3 a 6 meses (RAMAKRISHNA; HARMS; ERLICHMAN, 2000). Os tipos de tratamento disponíveis para pacientes com câncer de pulmão e metástases são: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, ablação por radiofrequência, terapias direcionadas e imunoterapia (ACS, 2017; VOGL et al., 2013). Nesse sentido, é importante pensarmos em uma nova abordagem terapêutica, como a TLM, que tem como alvo os lipídios de membrana e não as proteínas, tendo em vista que muitas patologias estão relacionadas a modificações nesses lipídios (ESCRIBÁ, 2006; ESCRIBÁ et al., 1990).

## **2.2. Imunologia de tumores**

O sistema imune é definido como um sistema encarregado de distinguir entre o que é próprio do que não é próprio do organismo, no qual constituintes dos sistemas imune inato e adaptativo operam juntamente, com o intuito de produzir uma resposta efetiva contra o invasor (RAMIREZ-MONTAGUT et al., 2003). Células tumorais são geradas de células do próprio organismo, nesse sentido, a função efetora do sistema imune contra estas células seria preferencialmente tolerogênica, e de fato, a maior parte dos tumores exibe baixa imunogenicidade (DUNN et al., 2005; KIM; EMI; TANABE, 2007). Porém, outros estudos propõem a presença de antígenos expressos por células tumorais, decorrentes das alterações de células normais, que podem ser reconhecidos pelo sistema imune (ALB et al., 2012).

Esses antígenos tumorais são reconhecidos como estranho por células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos (MA) ou células dendríticas (CD) (SOMASUNDARAM; BURNS, 2017). As CD são uma pequena população de células do sistema imunológico, mas são consideradas as principais APCs. São capazes de reconhecer, capturar, processar e apresentar antígenos (CONSTANTINO et al., 2017). As APCs interagem com células TCD4<sup>+</sup> ou TCD8<sup>+</sup>, proporcionando a sinalização para outras células T, que acabam por ser recrutadas para o microambiente do tumor (SOMASUNDARAM; BURNS, 2017). Nesse local, existem também a presença de células que possui papel imunossupressor e

também de promoção do crescimento tumoral, sendo conhecidas por Tregs (FUJIMURA; MAHNKE; ENK, 2010).

As células NK (Natural Killer), são uma população de células do sistema imune inato, efetoras na imunidade antitumoral e também em infecções, pela produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , ou pela citotoxicidade direta por perforina e granzima. A infiltração dessas células no ambiente tumoral está relacionada a um bom prognóstico em diversos tumores sólidos (BI; TIAN, 2017).

Os MA também podem ser recrutados para esse microambiente, e dependendo das condições ali presentes, poderão adquirir um papel imunológico diferente daquele original (POLLARD, 2004). Neste ambiente, há quantidades elevadas de fatores angiogênicos, que podem auxiliar a proliferação das células tumorais, como a citocina IL-6, que além de propiciar a proliferação, é um mediador antiapoptótico (NICOLINI; CARPI; ROSSI, 2006). Outras citocinas como IL-1 $\beta$  e lipídios como PGE<sub>2</sub>, e quimiocinas como CCL2 (MCP-1), estão envolvidos não só com o aumento da inflamação no ambiente do tumor, mas por recrutar novas células inflamatórias (FUJIMURA; MAHNKE; ENK 2010). Por outro lado, TNF- $\alpha$  é considerado uma citocina reguladora na regressão de tumores (BACHMANN et al., 2002). Estudos recentes mostram a IL-17, uma citocina produzida por células Th17, como também por macrófagos, relacionada na progressão de tumores. O aumento da sinalização IL-17B/IL-17RB, vista, por exemplo, em cânceres de mama, assim como, o aumento da expressão do receptor IL-17RB estando relacionado à malignidade em cânceres de pâncreas (BIE et al., 2017).

Porém, como os macrófagos são as células com maior predominância nesse ambiente (MANTOVANI et al., 2002; OBEID et al., 2013), e por secretarem uma diversidade de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas que regulam o crescimento tumoral, angiogênese, invasão e metástase (LEWIS; POLLARD, 2006), são os tipos celulares que tem recebido maior atenção.

### **2.3. Macrófagos associados a tumores**

Os macrófagos (MA) são células do sistema imune que são encontrados em quase todos os tecidos, e estão envolvidos em diversos processos biológicos. Sua

função como sentinelas do sistema imune é primordial, tanto para a resposta imune inata quanto para a resposta adaptativa (MORRISSETTE; GOLD; ADEREM, 1999). Macrófagos M1 são essenciais na resposta imune contra microrganismos intracelulares e tumores (MANTOVANI et al., 2005). Por outro lado, macrófagos M2 são importantes na morte de parasitas extracelulares, reparação e remodelamento tecidual, assim como na imunoregulação, e atuam na progressão de tumores (MANTOVANI et al., 2005; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Para uma ativação de macrófagos no perfil M1 (ativação clássica) é preciso a presença no microambiente de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como lipopolissacarídeo (LPS), como também citocinas do perfil Th1, como o IFN- $\gamma$  (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). No entanto, para a ativação do fenótipo de macrófagos M2 (ativação alternativa) é fundamental a presença de PAMPs de parasitas/helmintos (DAVICINO et al., 2011), assim como de citocinas do perfil Th2, como a IL-4 e IL-13 (MARTINEZ et al., 2008).

Inflamações exacerbadas ou crônicas favorecem a geração de células tumorais, visto que é um microambiente repleto de células e mediadores solúveis, podendo levar a ausência da homeostasia, devido ao excesso de produtos inflamatórios ou mesmo pelo estresse metabólico celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011; SETHI et al., 2012). Citocinas como IL-6 e TNF- $\alpha$ , colaboram para o crescimento tumoral, pois induzem a secreção de metaloproteinases pelos neutrófilos que destroem as fibras da matriz extracelular e possibilitam a invasão tissular do tumor e a metástase, além de interferir no processo apoptótico celular (BARLEON et al., 1996). Vários trabalhos classificam os MA em subclasses, dependendo de sua localização e ativação, uma destas subclasses de MA bem estudada é a de MA associados a tumores (MATs), que estão presentes neste microambiente inflamatório tumoral. Os MATs estão poucos relacionados à eliminação das células tumorais, mas atuando como promotor tumoral, principalmente na liberação de citocinas, produção de mediadores lipídicos e fatores de crescimento (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 1988). Observando o fenótipo celular, a expressão gênica e função dos MATs, podemos considerar que estes estão relacionados aos macrófagos M2 (ALLAVENA et al., 2008).

Os macrófagos M2 ativados correspondem a maioria dos MATs no microambiente tumoral, e é a principal população de células inflamatórias em tumores sólidos (KAKIZAKI et al., 2015). A principal atividade patogênica desses MA é a supressão das respostas do sistema imunológico contra o câncer (OSTUNI et al., 2015). Citocinas imunossupressoras como TGF- $\beta$  e o prostanoide PGE<sub>2</sub>, estão relacionados a esses MA (QUATROMONI; ERUSLANOV, 2012). Este perfil de MA suprime respostas Th1 pela produção de citocinas IL-10 e IL-1 $\beta$ , e promovem a reorganização de matriz extracelular, invasividade e angiogênese, pela produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (QUATROMONI; ERUSLANOV, 2012). Além disso, os MATs produzem uma variedade de quimiocinas, dentre elas, CCL2 (MCP-1), que é a quimiocina mais identificada em tumores (MANTOVANI et al., 2002). Diante disso, percebemos a importância do estudo desses macrófagos no contexto tumoral.

#### **2.4. Terapia de Lipídios de Membrana com ação antitumoral**

O estudo com lipídios tem crescido muito nos últimos anos, principalmente os que estão relacionados à modulação da membrana celular, como é o caso da TLM. Dentre esses estudos, estão os relacionamos a aterosclerose, doenças respiratórias, doenças infecciosas e tumores (ESCRIBÁ, 2006).

##### **2.4.1. Fosfolipídios**

Os alquil-fosfolipídios (ALPs) são compostos análogos a lisolecitina, que começaram a ser produzidos em 1970 para o uso como imunomodulatório (MUNDER et al., 1979). Tem como finalidade a ligação na membrana plasmática e não ao ácido desoxirribonucleico (DNA), distinguindo assim dos quimioterápicos normalmente utilizados (VINK et al., 2007). O uso desses compostos pode ocasionar a morte celular por apoptose (MOLLINEDO et al., 1997). E concentrações significativas podem interferir em vias de transdução e na renovação dos fosfolipídios de membrana. A investigação de novos alquil-fosfolipídios, pode ser importante para a aplicação na terapia anticâncer, podendo ser utilizados conjuntamente com a radioterapia tradicional (VINK et al., 2007).

A 2- lisofosfatidilcolina (lisolecitina) (LPC) é um fosfolípídeo que está presente em quantidades menores no plasma e em membrana celulares (MUNDER et al., 1979). É fortemente ativo nas superfícies celulares, e por isso é muito citotóxico se for incubado com células em meio livre de plasma ou soro (MUNDER et al., 1979). Pode estimular a fagocitose, além disso, tem sido envolvido em reações de hipersensibilidade, assim como na inibição da síntese de prostaglandinas (SHIER, 1977).

Estudos mostram que a fosfatidiletanolamina (PE) é supressora de tumores e induz apoptose em células tumorais (FERREIRA et al., 2013). Fosfatidilserina (PS), por exemplo, é evidenciada como inibidora da via de óxido nítrico que está relacionado à citotoxicidade de macrófagos (CALDERON et al., 2008). PS também induz respostas anti-inflamatórias / imunossupressoras em macrófagos, quando está expressa em células apoptóticas que precisam ser fagocitadas por macrófagos sem provocar inflamação (KUROSAKA et al., 2003).

Trabalhos como o de Yao e colaboradores, mostraram a indução de apoptose em células de hepatoma humano (HepG2) utilizando PE (YAO et al., 2009). Como também, o uso de fosfoetanolamina sintética em células de melanoma inibiu a viabilidade das células *in vitro*, e em *in vivo*, levando à diminuição do volume tumoral e da metástase das células tumorais (VERONEZ, 2012).

#### **2.4.2. Lipídios oxidados**

Os fosfolípídios oxidados do LDL (oxLDL), por exemplo, são formados de forma endógena no corpo humano sob o stress oxidativo (RAMPRECHT et al., 2015). Eles são capazes de causar inflamação, proliferação celular ou morte por apoptose na parede da célula dependendo de sua concentração e do tempo de exposição (BOCHKOV, 2007; LEITINGER, 2005; RAMPRECHT et al., 2015).

Em estudos com 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosfocolina (PGPC) e 1-palmitoil-2-(5-oxovaleroil)-sn-glicero-3-fosfocolina (POVPC) foi demonstrado que estes são capazes de induzir a morte celular em células cancerígenas. Ambos induziram apoptose dependendo da concentração, do tempo e da linhagem testada. O uso de 50 mM de PGPC levou apoptose em duas de quatro linhagens utilizadas

no estudo, em comparação ao POVPC que também na mesma concentração (50 mM) induziu apoptose em três das quatro linhagens, linhagem celular de melanoma primário humano (WM35), linhagem celular de melanoma metastático (WM9 e WM164). Em concentrações menores (25 mM), ambos lipídios foram eficientes na outra na linhagem celular de melanoma primário humano (SBcl2), sendo esta mais sensível (RAMPRECHT et al., 2015).

PGPC e POVPC podem induzir apoptose em culturas de macrófagos e células musculares lisas vasculares (NAVAB et al., 1996; ROSS, 1999; STEINBERG; WITZTUM, 2003). Outro trabalho, menciona que PGPC regula positivamente a expressão de genes inflamatórios e pró-aterogênicos, como CD9, Src quinase, c-Jun e JunB. No entanto, POVPC não influenciou a expressão desses genes. Em macrófagos, CD36 é o principal receptor para oxLDL (KOLLER et al., 2014). Em estudo, 1-palmitoil-2-arachidonil-sn- glicero-3-fosforilcolina (oxPAPC) estimulou a expressão de VEGF em culturas de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e macrófagos derivados de monócitos (BOCHKOV et al., 2006).

### **2.4.3. Eicosanoides**

Os fosfolipídios de membrana liberam o ácido araquidônico (AA) sobre a ação da enzima PLA<sub>2</sub>. Quando os AA estão livres, as enzimas cicloxigenase (COX-1/2), e lipoxigenase (5-LO), formam respectivamente as prostaglandinas (PG) e os leucotrienos (LTs), estes produtos lipídicos são conhecidos como eicosanoides (BALSINDE; WINSTEAD; DENNIS, 2002). Os AA são precursores também dos ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) e das lipoxinas (LXs) (SHUREIQI; LIPPMAN, 2001). A ação dos eicosanoides no microambiente pode influenciar na liberação de outros mediadores inflamatórios, como citocinas, podendo agir em funções celulares e desordens inflamatórias (HARIZI et al., 2003).

As PGs são formadas em grande parte dos tipos celulares, e podem agir em muitas funções fisiológicas como hormônios (parácrinos e autócrinos), dentre estas funções estão, por exemplo, a contratilidade uterina, a geração de dor e febre, assim como a permeabilidade vascular (FUNK, 2001). A produção das PGs procede de um precursor em comum, o intermediário instável PGH<sub>2</sub>, e posteriormente sofre ação de

enzimas sintases específicas como a PGE-sintase (PGEs), responsável pela produção de PGE<sub>2</sub>. Os macrófagos são as principais células do sistema imune formadores de PGE<sub>2</sub>, mas a expressão das diversas PG-sintase é específica para os diversos tipos celulares (STABLES; GILROY, 2011).

Células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), mastócitos, células dendríticas e macrófagos ativados são as principais células formadoras de LTs (HARIZI et al., 2003). As duas classes de LTs presentes nestas células são o LTB<sub>4</sub>, e os cisteinil-LTs (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) (PETERS-GOLDEN et al., 2002). Foi demonstrado que metabólitos derivados de 5, 8 e 12-LO possuem funções prócarcinogênicas. Por outro lado, os derivados de 15-LO (15-LO-1 e -2) parecem possuir funções anticarcinogênicas (SHUREIQI; LIPPMAN, 2001). Contudo, este efeito de eicosanoides em tumores é controverso, e dependente do tipo tumoral, local, agressividade e fase de proliferação.

Altos níveis de expressão das enzimas do metabolismo de eicosanoides, assim como, a grande geração de AA livres, são fatores que podem ser observados em muitas formas de câncer (DAS et al., 2003a). Em geral, os eicosanoides podem atuar na estimulação da angiogênese, proliferação celular, metástase e na inibição da apoptose (ROMANO, 2003; SHUREIQI; LIPPMAN, 2001). A relação entre as enzimas COX-2 e 5-LO na promoção de tumores e na neoangiogênese está descrita em muitos estudos, sendo sugerida a sua inibição simultânea como uma nova abordagem terapêutica para determinados tipos de cânceres (ROMANO, 2003). Estudos utilizando os inibidores NS-398 e nabumetona (inibidores da COX-2) ocasionaram a supressão da diferenciação e da proliferação de células de leucemia humana (NAKANISHI et al., 2001). Outros estudos mostraram que PGD<sub>2</sub> inibiu a angiogênese tumoral (MURATA et al., 2011), e a deficiência do receptor de PGD<sub>2</sub> (DP) aumentou a progressão do tumoral (MURATA et al., 2008). Produtos das enzimas LOX (5-8-12-LOX) têm sido relacionados a processos pró-carcinogênicos. Por outro lado, produtos da 15-LOX têm estado relacionados a processos anticarcinogênicos (SHUREIQI; LIPPMAN, 2001). Em geral, muitos fatores que propiciam o crescimento tumoral são derivados da ação dos eicosanoides (NATHOO; BARNETT; GOLUBIC, 2004).

## 2.5. Lipídios do líquido surfactante (LS)

O líquido surfactante (LS) é um agrupamento repleto de lipídios e proteínas que são sintetizados por células alveolares, e em seguida secretados para a interface dos alvéolos (WRIGHT, 2005). Os lipídios compõem 90% do líquido surfactante e as proteínas 10%. Dentre estes lipídios, os fosfolipídios são os que estão em maior concentração, 35-50 mg/ml (LEWIS; JOBE, 1993). A fosfatidilcolina (PC) é o fosfolipídio em maior quantidade, e o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) é um derivado das PC, e possui grande importância em diminuir a tensão nos alvéolos e evitar falhas no decorrer do ciclo respiratório (ENHORNING; HOLM, 1993; NIEMAN et al., 1981). Cerca de 10% dos fosfolipídios do LS são aniônicos, como o grupo dos fosfatidilglicerol (PG), sendo este um lipídio mediador da imunidade inata dentro dos pulmões (NUMATA; KANDASAMY; VOELKER, 2012), tendo como seu principal produto o palmitoil-oleil-PG (POPG) (SCHMIDT et al., 2002; WRIGHT et al., 2000). Outros fosfolipídios encontrados em menor quantidade no LS são a fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) e lisofosfatidilcolina (liso-PC) (BLANCO HIDALGO, 2004).

Trabalhos com ozonoterapia, técnica que utiliza o ozônio como método terapêutico, tem sido muito eficaz no tratamento de muitas patologias. O ozônio (O<sub>3</sub>) é um gás formado por três átomos de oxigênio em uma estrutura instável, que foi descoberto por volta do século XIX (ELVIS; EKTA, 2011). Ele está acumulado na atmosfera em uma concentração de 20 µg/m<sup>3</sup> sendo essencial para a vida. Sua principal função é proteger as pessoas dos efeitos danosos dos raios ultravioleta (UV). Apesar de possuir efeitos perigosos, muitos pesquisadores admitem que ele possua finalidades terapêuticas (BOCCI, 1996, 1999; DI PAOLO; BOCCI; GAGGIOTTI, 2004).

Em uso médico, o ozônio é elaborado a partir do oxigênio de grau medicinal, sendo aplicado em doses terapêuticas específicas, podendo ter melhoras reconhecidas no tratamento de cárie dentária, reduzir o colesterol no sangue, como também sendo utilizado em procedimentos complementares em síndromes hipóxico-isquêmicas (BOCCI, 1996; CLAVO et al., 2003; HERNÁNDEZ; MENÉNDEZ; WONG, 1995; HOLMES, 2003). Suas ações possuem poucos efeitos colaterais, sendo

comprovada sua eficácia (ELVIS; EKTA, 2011). Os efeitos da ozonoterapia em microrganismo é devido ao mecanismo de oxidação de lipoproteínas e fosfolípidios, desorganizando a parede e a membrana celular. Em fungos, por exemplo, impossibilita a proliferação celular em algumas fases; em vírus, o ozônio impede a ligação do vírus com a célula, como também dificultando o ciclo reprodutivo (ELVIS; EKTA, 2011). No entanto, também existem relatos da aplicação da ozonoterapia no tratamento do câncer (CLAVO et al., 2004). O ozônio aplicado em uma concentração de 30 e 55 µg/cc aumenta a geração de citocinas, como Interferon gama (IFN-γ), Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e Interleucina-2 (IL-2) (VIEBAHN-H, 2003). A exposição ao ozônio leva a um aumento da resistência das vias aéreas, diminui a pressão transpulmonar máxima, também aumenta a frequência respiratória e diminui o volume corrente (VIEBAHN-H, 2003).

Lipídios que possuem uma ligação dupla isolada podem reagir com o ozônio (BAILEY, 1958; CRIEGEE, 1975). A partir desta reação, pode ser gerado um intermediário molecular pouco estável, que se decompõe em aldeídos e outros produtos. Essa reação dos fosfolípidios com o ozônio tem sido muito estudada, principalmente o mecanismo de reação do ozônio com o 1-palmitoil-2-oleoil-glicerofosfocolina (16:0a/18:1-GPCho - POPC), um fosfolípido que é encontrado no líquido surfactante pulmonar de mamíferos (SANTROCK, GORSKI e O'GARA, 1992; SQUADRITO et al., 2000). O POPC reage com o ozônio formando o 16:0a/9-al-GPCho (1-palmitoil-2-(9'-oxo-nonanoil)-glicerofosfocolina), podendo ter ação em muitas células, como por exemplo, células epiteliais do pulmão, levando a uma maior liberação de prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) e IL-8 (KAFOURY et al., 1999), assim como, a ativação de fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) e outras fosfolipases de leucócitos (KAFOURY et al., 1998).

Fosfolípidios éter de cadeia curta estão sendo reconhecidos como produtos oxidados que executam a sua função biológica por meio do receptor do fator de ativação de plaquetas (PAFr) (MARATHE et al., 1999), como também, como agonista de fatores reguladores nucleares, incluindo membros da família dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) (DAVIES et al., 2001). Em estudos recentes, (ALMSTRAND; VOELKER; MURPHY, 2015), identificaram os fosfolípidios mais abundantes do líquido surfactante, que são POPC

(PC 16:0\_18:1) e POPG (PG 16:0\_18:1), e seus principais produtos oxidados pela ação do ozônio, que são *Paldo*PC (PC 16:0\_9:0al) e *Paldo*PG (PG 16:0\_9:0al), em conjunto classificados como fosfolípidios oxidados do líquido surfactante (oxPLS). No entanto, pouco se sabe sobre sua ação tumoral.

### 3. OBJETIVO

**Objetivo Geral:** Analisar o efeito de fosfatidilcolinas oxidadas (oxPC) do líquido surfactante em células tumorais pulmonar (LL/2) *in vitro*, e a influência destes fosfolípidios na modulação da resposta de macrófagos associados a tumor.

**Objetivos específicos:**

- Avaliar a citotoxicidade do tratamento com oxPC (*PaldoPC*), comparando com o tratamento de seu precursor não oxidado POPC e oxLDL (*POVPC*), nas células de carcinoma pulmonar de Lewis (LL/2) *in vitro*;
- Avaliar o efeito do tratamento com *PaldoPC*, POPC e *POVPC*, na proliferação celular de LL/2 *in vitro*;
- Avaliar o efeito do tratamento com *PaldoPC*, POPC e *POVPC*, na viabilidade reprodutiva de LL/2 *in vitro*;
- Determinar a atividade tumoral de macrófagos polarizados na co-cultura com LL/2.
- Demonstrar a polarização de macrófagos em co-cultura com LL/2, e o efeito dos tratamentos com *PaldoPC*, POPC e *POVPC* na modulação do fenótipo celular de MAT.
- Avaliar a produção de mediadores inflamatórios (óxido nítrico, citocinas, quimiocinas e prostaglandinas) em MAT tratados ou não com *PaldoPC*, POPC e *POVPC in vitro*.

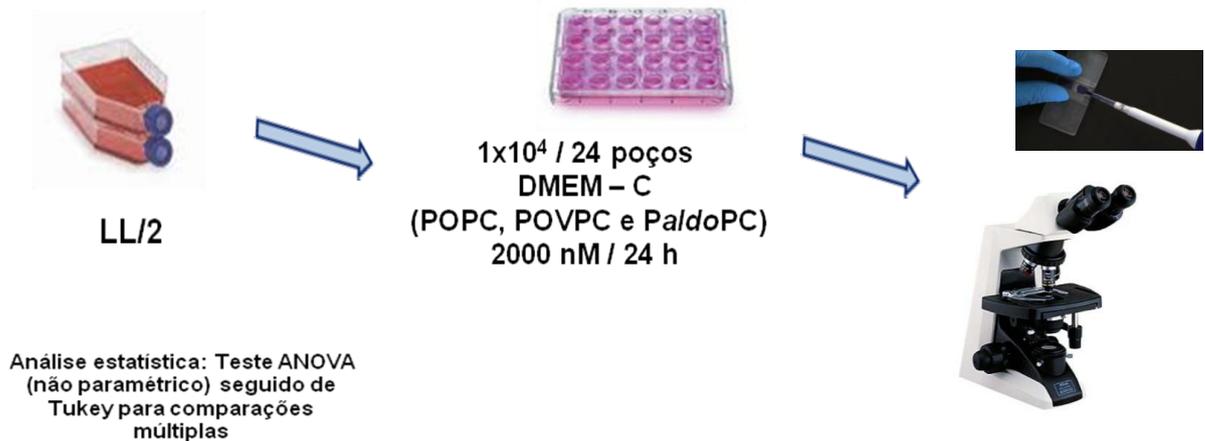
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Fluxogramas metodológicos

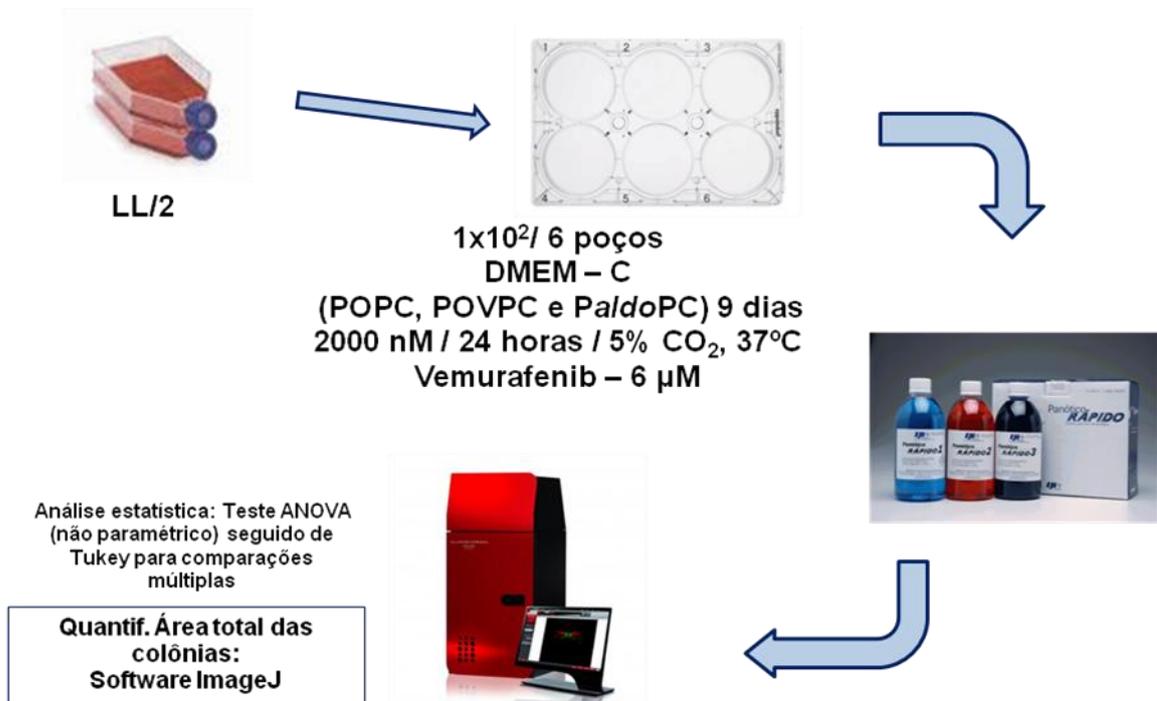
- Avaliar a citotoxicidade do tratamento com oxPC (*PaldoPC*), comparando com o tratamento de seu precursor não oxidado POPC e oxLDL (POVPC), nas células de carcinoma pulmonar de Lewis (LL/2) *in vitro*;



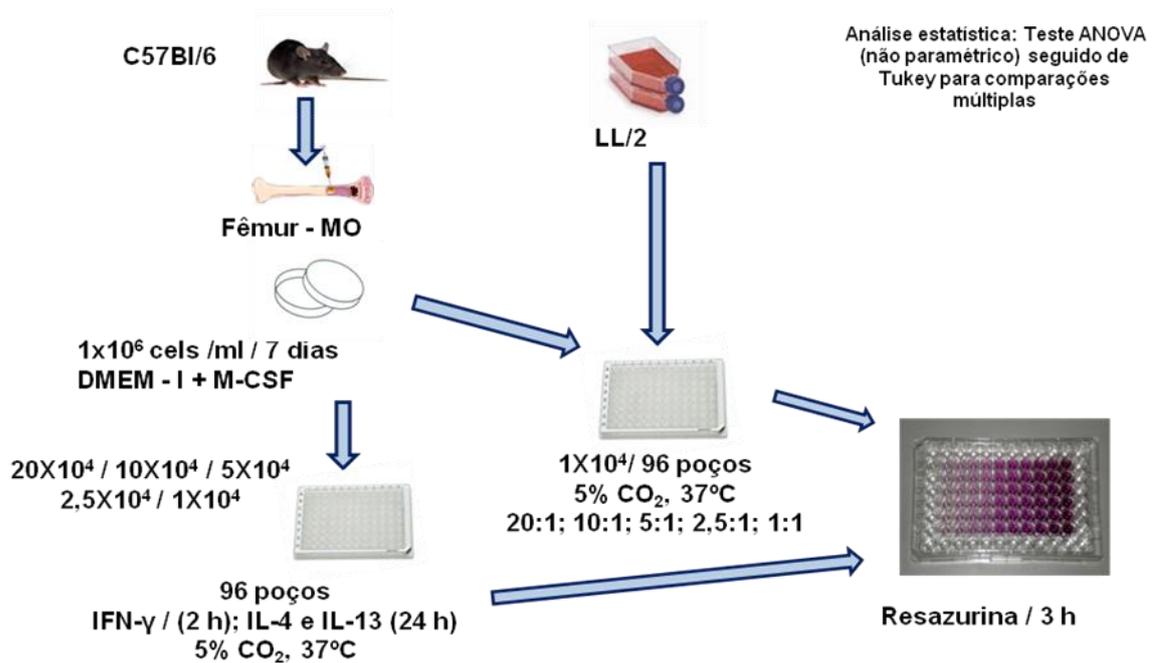
- Avaliar o efeito do tratamento com *PaldoPC*, POPC e POVPC, na viabilidade reprodutiva de LL/2 *in vitro*;



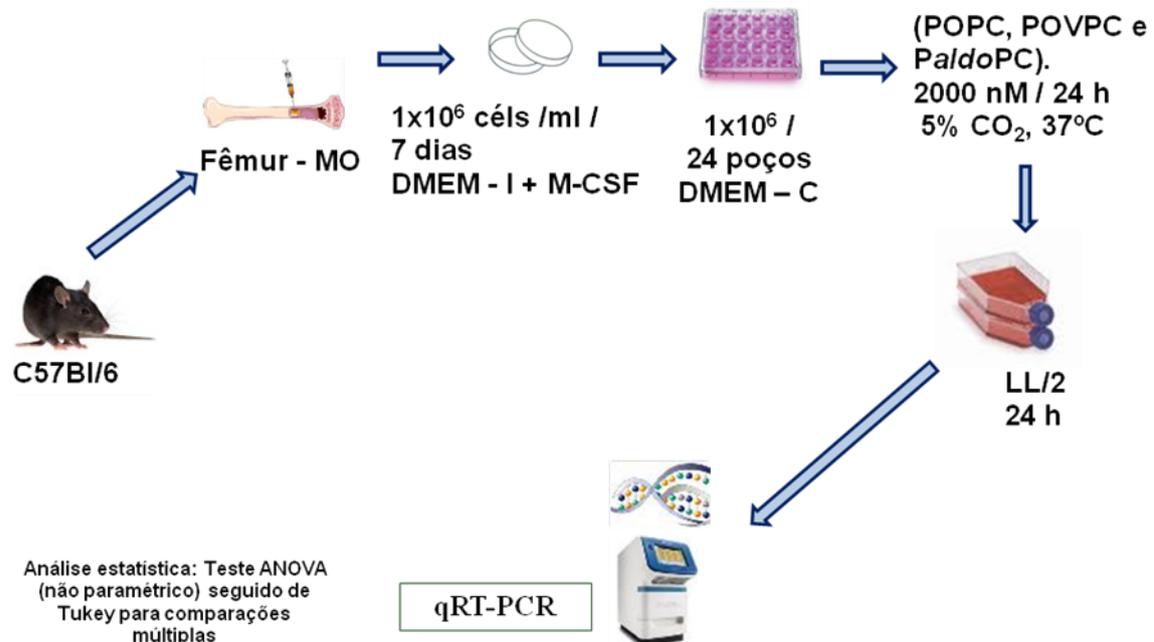
- Avaliar o efeito do tratamento com *Paldo*PC, POPC e POVPC, na proliferação celular de LL/2 *in vitro*;



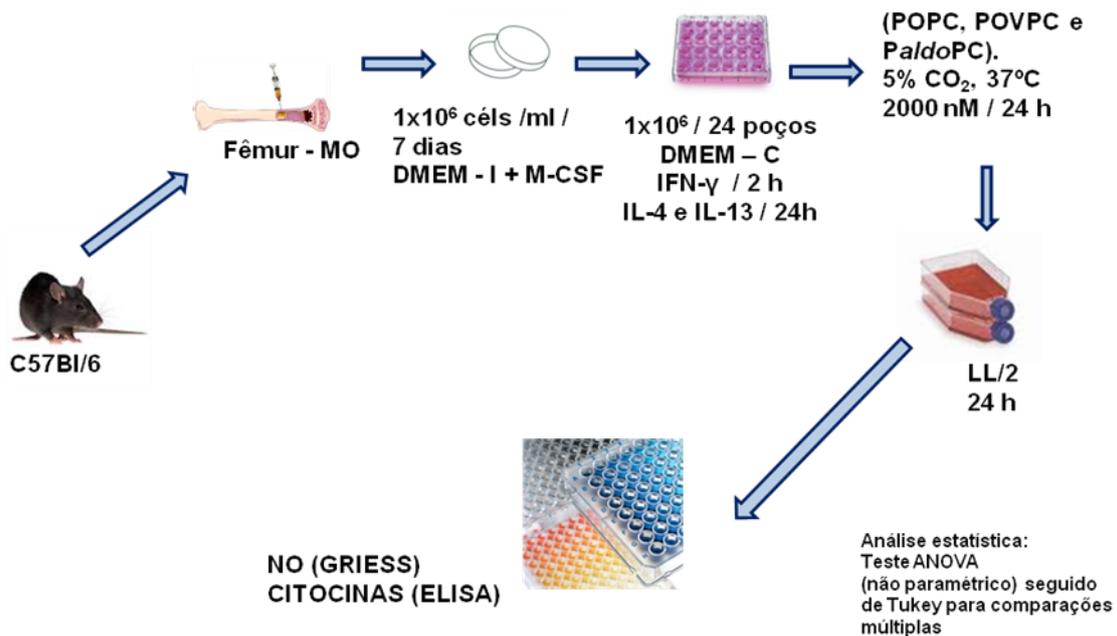
- Determinar a atividade tumoral de macrófagos polarizados na co-cultura com LL/2;



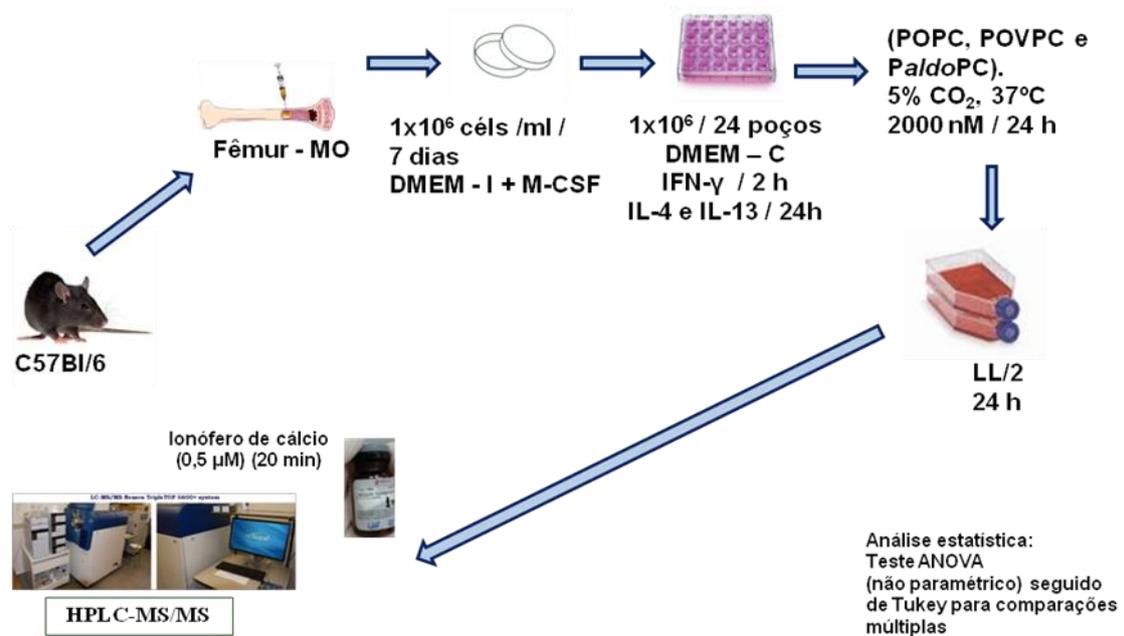
- Demonstrar a polarização de macrófagos em co-cultura com LL/2, e o efeito dos tratamentos com *PaldoPC*, POPC e POVPC na modulação do fenótipo celular de MAT;



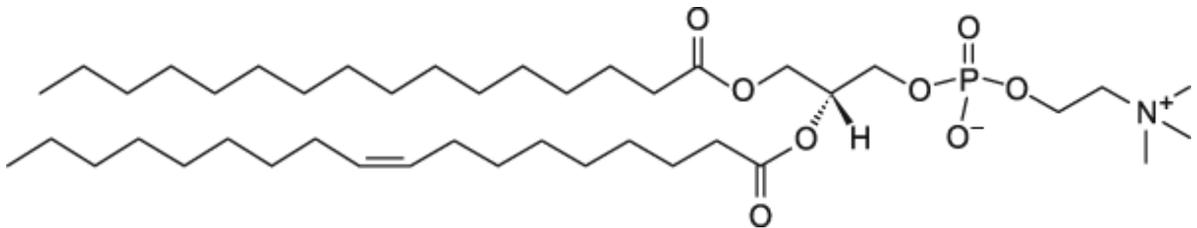
- Avaliar a produção de mediadores inflamatórios (óxido nítrico, citocinas, quimiocinas) em MAT tratados ou não com *PaldoPC*, POPC e POVPC *in vitro*;



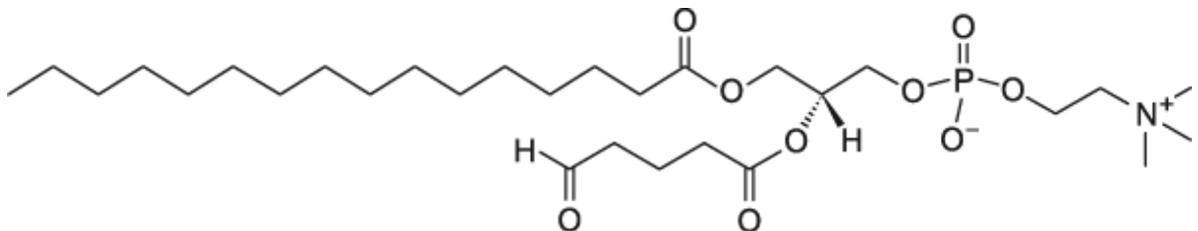
- Avaliar a produção de mediadores inflamatórios (prostaglandinas) em MAT tratados ou não com *PaldoPC*, *POPC* e *POVPC in vitro*.



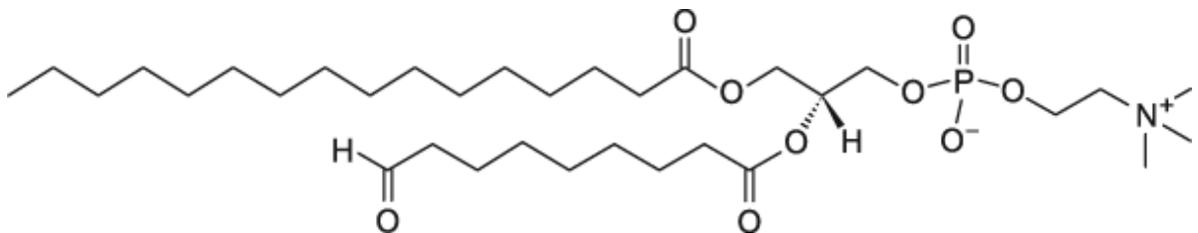
**4.2. Fosfolipídios.** Os fosfolipídios utilizados para os tratamentos *in vitro*, foram obtidos da empresa Avanti Polar Lipids (Alabama, EUA). Os fosfolipídios apresentavam-se na forma liofilizados, e foram ressuspensos em etanol puro e armazenados à - 20°C. No momento do uso, estes fosfolipídios foram diluídos no meio de cultura celular, de modo que a concentração de etanol não fosse superior a 1% (v/v) da solução final. As fosfatidilcolinas do líquido surfactante (PC) utilizadas foram: POPC e sua forma oxidada *Paldo*PC. Além deste, utilizamos como controle de efeito o fosfolipídio oxidado do LDL (oxLDL): POVPC. As estruturas dos fosfolipídios utilizados neste trabalho estão descritas na Figura 1.



POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina)



POVPC (1-palmitoil-2-(5'-oxo-valeroil)-sn-glicero-3-fosfocolina)



*Paldo*PC (1-palmitoil-2-(9'-oxo-nonanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina)

**Figura 1. Estrutura química dos fosfolipídios comerciais utilizados.** Fosfolipídios utilizados nos tratamentos *in vitro* foram as fosfatidilcolinas POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina), que possui um ácido graxo saturado na posição *sn*-1 e um ácido graxo insaturado na posição *sn*-2; POVPC (1-palmitoil-2-(5'-oxo-valeroil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina) que possui uma cadeia saturada na posição *sn*-1 e uma oxidação no carbono 5 na posição *sn*-2; e *Paldo*PC (1-palmitoil-2-(9'-oxo-nonanoil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina) que possui um ácido graxo saturado na posição *sn*-1, e uma oxidação no carbono 9 na posição *sn*-2.

**4.3. Animais.** Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 de ambos os sexos, com peso de 20 g (6 semanas), provenientes do Biotério Unidade II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). Todos os procedimentos foram executados conforme o Comitê de Ética do Campus de Ribeirão Preto (protocolo n. 13.1.490.53.3).

**4.4. Cultivo celular tumoral.** Células de carcinoma pulmonar de Lewis murinas (LL/2) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ code: 0145) - Brasil. As células LL/2 foram cultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> (Kasvi, EUA) com 30 mL de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM (Gibco-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco) e 5 mg/mL de Gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA) (DMEM-C), e mantidas em incubadora úmida à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células tumorais LL/2 mantidas em cultura foram removidas dos frascos de cultivo celular quando atingiram confluência superior a 80% de células, pela adição de 5 mL de solução de tripsina-EDTA 1x (0,25 %) (Gibco, Life Technologies, EUA), lavadas 2x com DMEM-C, centrifugadas a 400 g/ 10 min/ 10°C, ressuspensas em meio DMEM-I.

**4.5. Obtenção de células da medula óssea.** Células da medula óssea foram obtidas de camundongos saudáveis e eutanasiados individualmente em câmara contendo CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> segundo Sorgi e colaboradores (SORGI et al., 2012). Dessa forma, após a eutanásia, os camundongos foram limpos com etanol 70% e os fêmures e tíbias foram dissecados. Os ossos foram colocados em placas de Petri contendo tampão fosfato salino (PBS 1x) gelado. Em um fluxo laminar de cultura, as duas

epífises dos ossos foram removidas usando tesouras e pinças esterilizadas. Utilizando uma seringa, 1 mL de DMEM-I foram injetados nos ossos, e a medula óssea foi colhida em tubos de polipropileno estéril. Os tubos foram suavemente homogeneizados, e o número de células da medula óssea foi determinado usando câmara de Neubauer e solução de Turk. A viabilidade celular foi determinada pela coloração na solução de Azul de Tripán (Gibco, Life Technologies, EUA) e somente foram utilizadas nos ensaios *in vitro* quando a mesma foi superior a 90%.

**4.6. Culturas primárias de macrófagos derivados de medula óssea.** Células isoladas da medula óssea ( $10^6$  /mL) foram cultivadas em placas de Petri média com 6 mL de meio de cultura DMEM (Gibco-Aldrich, EUA) suplementado com Gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA), com adição de 20% de soro de cavalo e 30% de meio de cultura condicionado de células L929, uma fonte de fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), por 7 dias à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após este período, as células foram removidas com a adição de PBS 1x gelado (5 mL), com incubação por 20 min. na geladeira à 4°C, seguido de remoção mecânica com pipeta sorológica. Em seguida, foram centrifugadas por 10 min., a 400 g. Após a obtenção dos macrófagos, a suspensão celular foi analisada por citometria de fluxo para determinar a homogeneidade da população de macrófagos (CD11b+ / F4/80+). Estas células foram denominadas de macrófagos derivados de medula óssea (MDMO).

**4.7. Polarização de macrófagos (via clássica / alternativa).** MDMO ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram semeados em placas de microcultivo de 24 poços em meio DMEM-C, incubados à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas para adesão dos macrófagos. A seguir, os MDMO foram incubados com 100 ng/mL de IFN- $\gamma$  para ativação clássica (M1) por 2 horas, ou com IL-4 e IL-13 (10 ng/mL) para ativação alternativa (M2) diluído em DMEM-C, durante 24 horas à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Cultura celular somente em DMEM-C foi utilizado como controle (M0). Os MDMO polarizados ou não, foram utilizados em seguida para experimentos em co-cultura com células tumorais.

**4.8. Tratamento com fosfolipídios *in vitro*.** As células tumorais LL/2 ( $1 \times 10^4$  células/poço), ou MDMO ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram cultivados em placas de 96 poços (Kasvi, EUA) com meio DMEM-C por 18 h em atmosfera úmida à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram tratados com POPC, POVPC ou *Paldo*PC diluídos em meio DMEM-C, em diferentes concentrações por até 24 h à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Células tratadas apenas com DMEM-C, foram utilizadas como controle.

**4.8. Ensaio de citotoxicidade celular.** Para avaliar a citotoxicidade celular de LL/2 e MDMO após tratamentos com os fosfolipídios, utilizamos o ensaio de MTT (MOSMANN, 1983), quantificando a metabolização do sal de tetrazólio solúvel em água, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma, EUA). Para isso, as células foram cultivadas e tratadas como descrito no item anterior. Em seguida, os sobrenadantes de cultura foram obtidos, e as células foram incubadas com 150 µL de DMEM-I com 5 mg/mL de MTT, por 3 h à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Como controle positivo de morte celular foi utilizado o tratamento com DMSO 30% em DMEM-I. O sal tetrazólio é reduzido a formazan apenas pelas células viáveis (MOSMANN, 1983). Em seguida, foi adicionado 50 µL de SDS 20% (m/v) (Sigma, EUA) em HCL 0,01M. A absorbância foi determinada em 570 nm por espectrofotômetro de placas (SpectraMax - Molecular Devices, EUA).

**4.9. Ensaio de viabilidade e proliferação celular.** A viabilidade celular de LL/2 foi determinada pelo teste de exclusão do corante vital azul de tripan. As células ( $1 \times 10^4$  células/poço) foram distribuídas em placa de 24 poços (Kasvi, EUA) em meio DMEM-C e mantidas por 18 horas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram tratadas ou não com os fosfolipídios (2000 nM) e incubadas por 24 horas. Após o período de incubação, as células foram obtidas com uso de 300 µL da solução de tripsina-EDTA 1x (0,25 %) (Gibco) com 300 µL de DMEM-C, transferido para eppendorfs de 1,5 mL, e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Após, as células foram ressuspensas em DMEM-I e diluídas 1:20 em solução de azul de tripan (Gibco, Life Technologies, EUA), e contadas em câmara de Neubauer. Consideramos como controle negativo poços contendo somente as células e o meio de cultura DMEM-I, e controle positivo de morte celular o tratamento com DMSO

50%. Os gráficos foram representados como número total de células por mL, coradas (mortas) ou não (vivas) com o azul de tripan.

**4.10. Ensaio clonogênico.** Em geral compostos com ação antitumoral possuem potentes efeitos citotóxicos ou citostáticos. Para analisar a eficácia do tratamento com fosfolipídios na proliferação celular foi realizado um ensaio clonogênico. Para isso, células LL/2 em uma baixa densidade (100 células por poço, em placa de 6 poços) foram plaqueadas e incubadas com DMEM-C por 18 horas para adesão. Após, estas foram incubadas com os fosfolipídios (2000 nM) diluídos em DMEM-C por 9 dias à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 2 dias o sobrenadante de cultura era retirado e acrescentado nova solução de tratamento. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS 1x, e as colônias formadas foram coradas com corante Panótico rápido, seguindo o protocolo do fabricante (Laborclin, Brasil) e as placas foram secas para posterior análise. As imagens das colônias nos poços foram obtidas em equipamento de imagem (Uvitec Cambridge, Japão) e sua área total de colônias formadas versus tamanho, foi analisada com o auxílio do software ImageJ.

**4.11. Atividade tumoral de macrófagos.** MDMO (20x10<sup>4</sup>, 10x10<sup>4</sup>, 5x10<sup>4</sup>, 2,5x10<sup>4</sup> ou 1x10<sup>4</sup> macrófagos/poço) foram distribuídos em placas de 96 poços (200 µL em DMEM-C) para adesão por 2 h à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Então, os macrófagos foram polarizados ou não para M1 e M2, como descritos no item 4.6. Em seguida, o sobrenadante dos macrófagos foram retirados e células LL/2 (1x10<sup>4</sup> células/poço) em 200 µL de DMEM-I foram adicionadas aos poços de cultura. Em placas controles, após a retirada do sobrenadante de cultura dos macrófagos, foram adicionados novamente apenas 200 µL de DMEM-I, ou foram plaqueados em poços sem macrófagos, apenas LL/2 (1x10<sup>4</sup> células/poço) em 200 µL de DMEM-I. Após a adição ou não de células LL/2 nos poços, as placas foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos (para acelerar o contato de macrófago e tumor) e foram incubadas por 4 e 24 horas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Deste modo, o ensaio foi realizado com as seguintes proporções 20:1, 10:1, 5:1, 2,5:1 e 1:1 (macrófago:LL/2). Ao término das co-culturas, todas as placas foram centrifugadas a 400 g, por 5 minutos, e os sobrenadantes foram obtidos e armazenados à -20°C para posterior análise. A atividade citotóxica

de macrófagos contra as células tumorais LL/2, foi calculada utilizando o valor de média de fluorescência (MIF) da metabolização de rezazurina. Este método consiste em que este reagente, rezazurina, interage com enzimas mitocondriais de células viáveis, formando um composto fluorescente denominado resorufina.

Após a obtenção dos valores de MIF correspondentes aos tratamentos, foi calculada a viabilidade celular de LL/2 utilizando a seguinte fórmula:

% de viabilidade de LL/2 =  $(A - B) \times 100/C$ , onde A é o valor de MIF proveniente do co-cultivo de células efetoras (macrófago)/células alvo (LL/2) (atividade citotóxica experimental); B é o valor de MIF provenientes da cultura somente de macrófagos (basal de células efetoras); e C é o valor de MIF provenientes da cultura somente de células tumorais (basal de células tumorais).

Em outros experimentos, com o objetivo de determinar a influência do tratamento com fosfolipídios na atividade tumoral de macrófagos contra LL/2; os macrófagos ( $1 \times 10^6$  macrófagos/poço) foram aderidos em placas de 24 poços por 2 horas, e tratados com os fosfolipídios como demonstrado no item 4.7. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e adicionado células LL/2 ( $2 \times 10^5$  células/poço) em 1000  $\mu$ L de DMEM-I, na proporção de 5:1(macrófago:tumor) por 24 h à 37C, 5% de CO<sub>2</sub>. Nos poços controles foram adicionados apenas DMEM-I. Após esse período de co-cultura, as placas foram centrifugadas a 400 g por 5 mim., e o sobrenadante obtido para posterior análise. Nas células restantes nos poços, foi acrescentado 300  $\mu$ L da solução de lise (Tampão Lyser Buffer (Invitrogen) mais 1% de 2-mercaptoetanol para obtenção de RNA total.

#### **4.12. Dosagem de mediadores proteicos por ensaio imunoenzimático (ELISA).**

Os sobrenadantes de cultura dos MA obtidos anteriormente, foram utilizados para as dosagens das citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10; e quimiocinas: KC (CXCL1) e MCP-1 (CCL2) (R&D, EUA). Primeiramente, foram adicionados em placas de 96 poços de alta afinidade (Kasvi, EUA) os anticorpos monoclonais (primários) de captura (100  $\mu$ L/poço), por 18 h à temperatura ambiente. Após, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x + Tween 0,05% (200  $\mu$ L/poço); e adicionado 200  $\mu$ L de Tampão Bloqueio (PBS + BSA 1%) por 1 h. Após, as placas foram lavadas novamente, e 50  $\mu$ L das amostras, ou curva padrão (diluição seriada em base 2) foram adicionados

aos poços em duplicata e incubados por 2 h em temperatura ambiente. Após uma nova lavagem, os anticorpos de detecção (secundário) conjugado com biotina (R&D, EUA) foram adicionados (100 µL/poço), e a placa foi incubada novamente por 2 h. Após nova lavagem, foi adicionado aos poços a enzima peroxidase (100 µL/poço) (R&D, EUA) e as placas foram incubadas por mais 20 min. Após esta etapa, as placas foram lavadas novamente e o substrato (OPD- Dicloridrato de o-fenilenodiamina) (Thermo Scientific Pierce, EUA) diluído em água Milli-Q (100 µL/poço) foi adicionado aos poços para a revelação colorimétrica. A reação da enzima com o substrato foi parada com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> -1M). A leitura de absorvância foi feita em 450 nm em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax- Molecular Devices, EUA).

**4.13. Quantificação de NO.** A detecção de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes de cultura de MDMO com células LL/2 *in vitro* foi avaliada indiretamente pela quantificação de nitrito (NO<sup>2-</sup>) através do método de Griess (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981), e com leitura de absorvância em 554 nm (SpectraMax - Molecular Devices, EUA). Brevemente, 50 µL do sobrenadante de cultura foram misturados com volume igual do reagente Griess: NEED 0,1% (v/v) (Sigma, EUA) e Sulfanilamida 1% (v/v) (Sigma, EUA) em placa de 96 poços durante 5 min. em temperatura ambiente. Uma curva padrão de nitrito (base 2) foi utilizada para cálculos das concentrações.

**4.14. Análise quantitativa de prostaglandinas.** MDMO (1x10<sup>6</sup> macrófagos/poço) foram distribuídos em placas de 24 poços (500 µL em DMEM-C) para adesão por 2 h à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Então, os macrófagos foram polarizados ou não para M1 e M2, como descritos no item 4.6. Após esse período, as células foram tratadas ou não com os fosfolipídios (2000 nM) e incubadas por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante foram retirados e células LL/2 (2x10<sup>5</sup> células/poço) em 1000 µL de DMEM-I foram adicionadas aos poços de cultura. Por fim, os sobrenadantes de cultura foram obtidos, e as células foram tratadas com HBSS + Ca<sup>+</sup> com Ionófero de Cálcio (0,5 µM) por 20 min, nas mesmas condições de cultura. Após, os

sobrenadantes foram armazenados à -20°C para posterior quantificação de prostaglandinas.

**a) Extração e purificação de lipídios.** Foi realizada nos sobrenadantes de cultura empregando extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction*, SPE) em cartucho de sílica C18, 500 mg (HyperSep™ -ThermoScientific, EUA). Para isso, foram eluídos pelo cartucho sequência de 4 mL de metanol (Merck, EUA) e 4 mL de água Milli-Q. Após esta preparação do cartucho, foi adicionado as amostras, seguido de lavagens do cartucho com água Milli-Q. Ao término desta etapa, foi adicionado metanol para recuperar a fração lipídica que estava adsorvida na fase sólida (C18) e coletados em tubos. Logo após, foi realizada a secagem do solvente em centrifuga à vácuo (Thermo Scientific Savant, EUA) em média de 4-5 horas, e a massa sólida contendo os lipídios polares foram recuperadas. Após a secagem, os lipídios foram dissolvidos em 50 µL de solução água/metanol (70:30 v/v) e armazenados à -80 °C para posterior análise por HPLC-MS/MS.

**b) Análise das PGs por HPLC-MS/MS.** O método de HPLC-MS/MS para identificação e quantificação das PGs foi otimizado empregando uma coluna cromatográfica de fase estacionária C18 Ascentis EXPRESS (Supelco, UK) de dimensões 100 mm x 30 mm, 2,7 µm. O volume de 10 µL de amostra purificada (como descrito no item a) foi introduzido ao sistema com uso de um auto-injetor e a eluição da mesma foi realizada utilizando sistema de gradiente binário constituído de fase móvel “A” composta por água/acetonitrila/ácido acético (70:30:0,02, v/v/v) e fase “B” composta por acetonitrila/isopropanol (70:30, v/v), de acordo com o seguinte gradiente: 0% de B em 0 min, 15% de B em 2 min, 20% de B em 5 min, 35% de B em 8 min; 40% de B em 11 min; 100% de B em 15 min, 100% de B em 20 min, 0% B de em 21 min, mantendo esta proporção até 30 min com um fluxo de 0,6 mL/min. A fonte de ionização opera no modo negativo e os dados adquiridos são no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas). As demais condições experimentais de operação do Espectrômetro de Massas (Triple-TOF 5.600 – Sciex, EUA) foram determinadas para melhor limite de quantificação (> 3 pg/µL). Os critérios adotados para a identificação de PGs incluem o tempo de retenção (Tr) e a transição de MRM.

Após a identificação de um determinado prostanoide em uma dada amostra, a quantificação do mesmo foi realizada com base na área do pico correspondente no cromatograma de HPLC-MS/MS obtido no modo MRM em comparação com a curva de calibração linear obtida para cada padrão nas diferentes amostras biológicas. O processamento dos dados foi pelo programa *Analyst*<sup>TM</sup> (Sciex, EUA), e a quantificação de cada PG foi realizada com o auxílio dos softwares *Peakview*<sup>TM</sup> (Sciex, EUA) e *Multiquant*<sup>TM</sup> (Sciex, EUA).

**4.15. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real (qRT-PCR).** Após os tratamentos de MDMO *in vitro*, o RNA total foi extraído utilizando colunas de extração de RNA (Spin Cartridge) seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Califórnia - EUA), e então quantificado pelo Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific), no Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - FCFRP- USP, da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Pfrimer Falcão. Para a síntese de cDNA utilizamos 1500 ng de RNA total, aplicando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Califórnia - EUA). A reação foi preparada adicionando 2,0 µL de RT buffer (10X); 0,8 µL de mix de dNTP (100 mM); 2,0 µL RT Random Primers (10X); 1,0 µL de Transcriptase reversa; 4,2 µL de H<sub>2</sub>O livre de Nuclease. Em seguida, a reação foi colocada no termociclador e incubada seguindo as condições: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos, e 85°C por 5 minutos. Utilizamos o método Taqman® (Applied Biosystems, Califórnia - EUA) e a reação de amplificação de cada gene foi constituída por cDNA *primers* específicos, sonda fluorescente específica e reagente MasterMix (Applied Biosystems - EUA). A expressão do gene  $\beta$ -actina (*Actb*) foi analisada como gene constitutivo (*housekeeping*), cujos *primers* e sondas foram desenvolvidos utilizando o sistema PDAR (*Predevelopment TaqMan Assay Reagents*, Applied Biosystems). Foi utilizado na reação 10 µL de *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix*; 1,0 µL de sonda gene-específica; 0,7 µL de cDNA e 8,3 µL de H<sub>2</sub>O livre de Nuclease para um volume final de 20 µL, em equipamento StepOnePlus<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, Foster City – EUA). A normalização dos genes estudados foi realizada utilizando a expressão relativa ( $\Delta\Delta Ct$ ). Com esta técnica avaliamos a expressão do RNAm de *Arg1* e *Nos2*.

**4.16. Análise estatística.** Foi utilizado o teste ANOVA (não paramétrico) seguido de Tukey para comparações múltiplas. A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ . As análises e os gráficos foram realizados com o auxílio do software GraphPadPrism® (versão 5.00 para Windows).

#### **4.17. Soluções e Meios utilizados nos procedimentos experimentais**

##### **- Solução PBS (Solução 10x concentrada)**

NaCl .....	80 g
KCL .....	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	11,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2,0 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q (q.s.p) .....	1000 mL
Solução de uso: Diluir 1:10	

##### **- Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco)**

##### **- Meio RPMI Incolor (Gibco)**

##### **- Solução de Resazurina (Sigma)**

10 mg/mL em Água Milli-Q. Depois diluir 1:20 em PBS 1x.

##### **- Tripsina (0,25 % Trypsin – EDTA 1x - Gibco)**

##### **- Meio para o cultivo de MDMO (Macrófagos Derivados da Medula Óssea)**

DMEM sem SBF com AB + 20% de Soro de cavalo descomplementarizado + 30% do sobrenadante da cultura da linhagem celular L929.

(DMEM + e 5 mg / mL de Gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA)

##### **- Meio de Cultura DMEM-I**

Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM (Gibco-Aldrich, EUA)

**- Meio de Cultura DMEM-C**

Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM (Gibco-Aldrich, EUA)

10% de soro bovino fetal (SBF) (Laborclin, BR)

5 mg/mL de Gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA)

**- MTT (Corante) (Sigma Aldrich)**

MTT ..... 100 mg

PBS (1x) estéril ..... 20 mL

**- Solução de Lise**

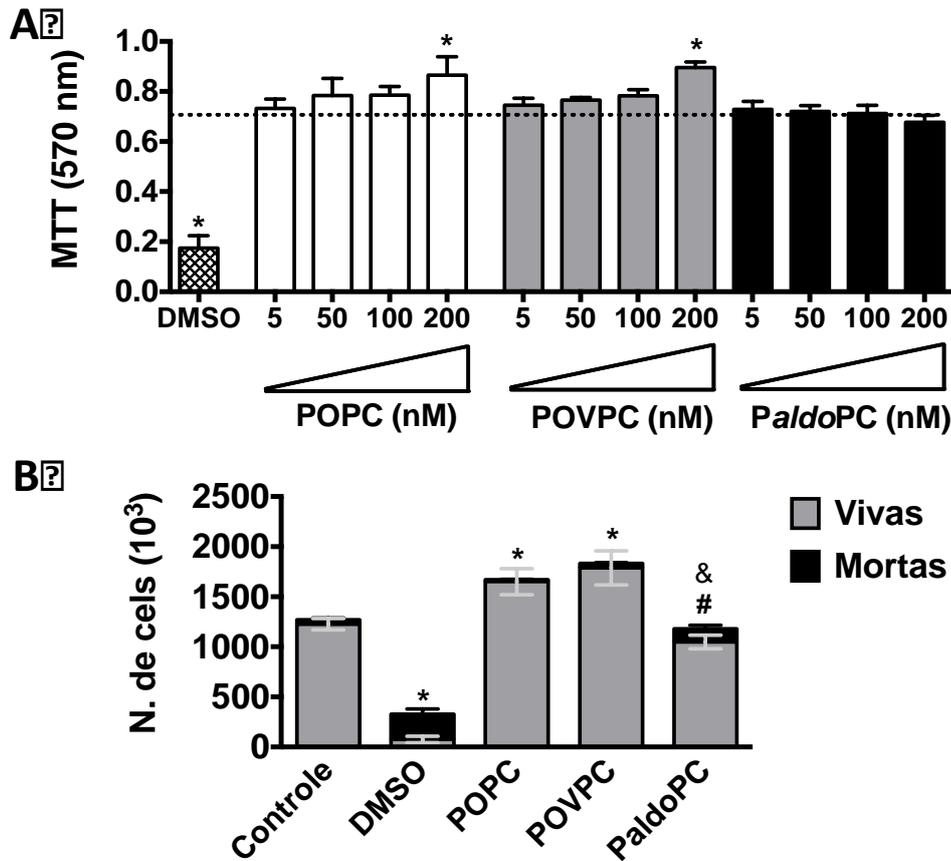
Tampão Lyser Buffer (Invitrogen) mais 1% de 2-mercaptoetanol

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efeito das fosfatidilcolinas na citotoxicidade de células tumorais LL/2.

Estes ensaios foram realizados para verificar se o fosfolípido oxidado do líquido surfactante (*PaldoPC*), teria efeito sobre as células LL/2, e determinar o efeito concentração-dependente. Por motivo de comparação, utilizamos como controle de tratamento: o fosfolípido não oxidado (POPC) e o fosfolípido oxidado do LDL (POVPC). O teste de MTT é um método desenvolvido para avaliar a viabilidade celular verificando a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Dessa forma, para determinar a citotoxicidade dos PC sobre as células tumorais, utilizamos o teste MTT (Figura 2A). De outra forma, verificamos a viabilidade de células LL/2 após tratamento com PC por ensaio de coloração com azul de tripan e contagem total em câmara de Neubauer (Figura 2B).

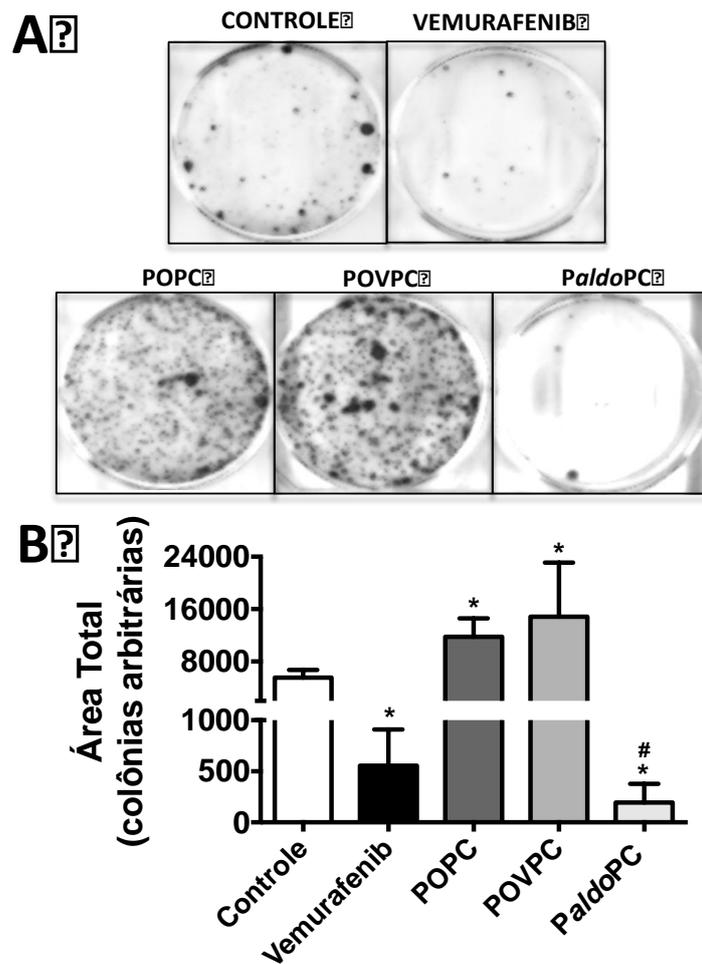
A partir de dados da literatura (UHLSON et al., 2002), utilizamos as seguintes concentrações de fosfolípidios para tratamento *in vitro*: 5, 50, 100 e 200 nM por 24 horas. As células LL/2 após tratamento com *PaldoPC*, independente da concentração, não demonstraram diferenças na metabolização de MTT em relação ao controle não tratado (meio). Porém, POPC e POVPC, na concentração máxima testada (200 nM), tiveram efeito no aumento da absorbância de formazana, indicando uma possível proliferação das células tumorais. O controle positivo de citotoxicidade (DMSO) demonstrou ação na diminuição da metabolização de MTT, consequentemente indicando morte celular (Figura 2A). Corroborando com estes resultados, o ensaio de incorporação de azul de tripan, mostrou tendência de aumento no número de células mortas no tratamento com *PaldoPC*, em relação ao controle não tratado (meio). Entretanto, POPC e POVPC demonstraram aumento significativo no número total de células viáveis quando comparado com o controle (meio), sugerindo que estes tratamentos induziram proliferação celular. Em relação à morte celular, não observamos diferenças em relação ao controle (meio) nos tratamentos com POPC e POVPC, mas grandes diferenças em relação ao controle positivo de morte (DMSO). Desta forma, *PaldoPC* apresentou diferenças estatísticas em relação aos tratamentos com outros PC, de forma a não ter efeito em induzir a proliferação celular.



**Figura 2. Citotoxicidade dos fosfolipídios em células tumorais. (A)** Células tumorais LL/2 foram tratadas com as fosfatidilcolinas POPC, POVPC e *PaldoPC* em diferentes concentrações por 24 horas. Após o tratamento, foi realizado o ensaio de metabolização de MTT e determinado a absorvância em 570 nm. Como controle negativo foi utilizado apenas meio (linha tracejada). O controle positivo de morte foi utilizado DMSO (30%). Experimento representativo de três repetições (n=5). **(B)** Células LL/2 foram tratadas com POPC, POVPC e *PaldoPC* (2000 nM) por 24 horas. Após o tratamento, as células foram incubadas com solução de Azul de Tripán (1:20). A contagem total de células viáveis e não viáveis (coradas de azul) foi realizada em câmara de Neubauer. Apenas meio foi utilizado como controle negativo e DMSO (50%) como controle positivo de morte. Experimento representativo de duas repetições (n=6). Diferenças estatísticas foram consideradas para  $p < 0,05$ . \*Grupos tratados versus controle (meio). #Tratamento *PaldoPC* versus tratamento com POPC. &Tratamento *PaldoPC* versus tratamento com POVPC.

## 5.2. Efeito das fosfatidilcolinas na viabilidade reprodutiva de células tumorais LL/2.

O ensaio clonogênico (ou formadoras de colônia) foi estabelecido há mais de 50 anos, com o intuito de avaliar as diferenças na viabilidade reprodutiva (capacidade das células de produzir descendentes, ou seja, capacidade de uma única célula para formar uma colônia de 50 ou mais células), entre células tumorais que sofreram tratamentos: como exposição à radiação ionizante, incubação com compostos químicos, ou manipulação genética. Após 9 dias de tratamentos, as culturas tumorais foram coradas e analisadas macroscopicamente (Figura 3A), como também, quantificada a área total de colônias de LL/2 (Figura 3B). Observamos que após tratamento, células incubadas com POPC e POVPC apresentaram grande coloração para número de colônias, comparadas ao controle negativo. Entretanto, com *PaldoPC*, o número de colônias coradas era muito menor que o controle (meio), e aparentemente menor que o tratamento com Vemurafenib (Figura 3A). Para realizar a quantificação comparativa da formação de colônias de LL/2 após os tratamentos, utilizamos o programa Image J e determinamos a área total (pixel) de colônias coradas. Assim, confirmamos que em POPC e POVPC ocorreu aumento significativo da formação de colônias de células tumorais, indicando proliferação. Porém, com *PaldoPC* não observamos proliferação de colônia, mas sim, efeito citostático quando comparado com o controle (meio). Da mesma forma, o tratamento com Vemurafenib demonstrou efeito citostático em relação ao controle, mas não teve diferenças significativas entre *PaldoPC* e Vemurafenib. Mas, demonstramos diferenças significativas entre o tratamento com *PaldoPC* e os demais fosfolipídios (Figura 3B).

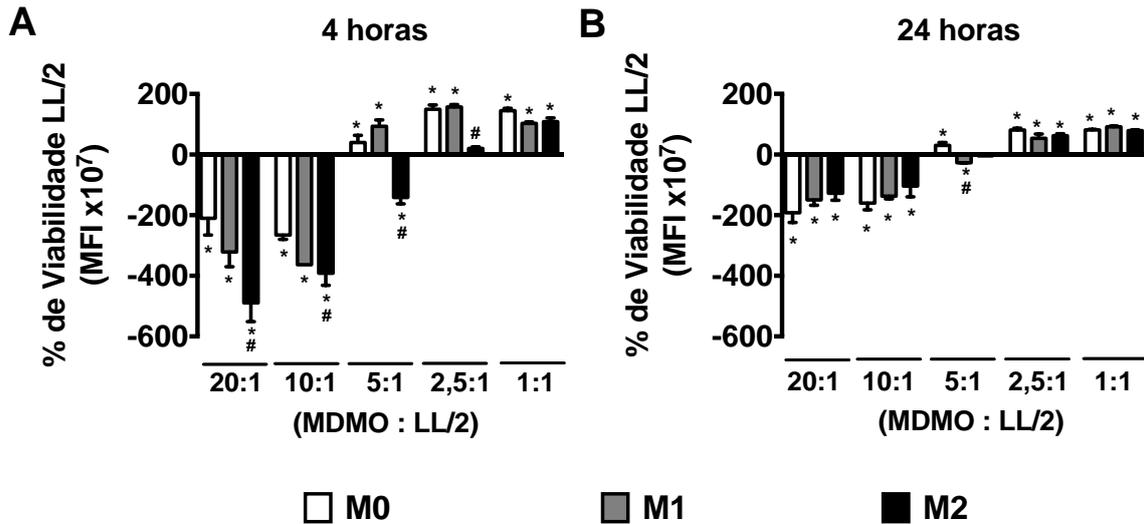


**Figura 3. Efeito dos fosfolipídios na atividade citostática tumoral.** Células tumorais LL/2 (100 células/poço) foram tratadas ou não com os fosfolipídios POPC, POVPC e *PaldoPC* (2000 nM) durante 9 dias. Como controle negativo, foram cultivadas com apenas meio de cultura, e para controle positivo de atividade citostática foram incubadas com Vemurafenib (6  $\mu$ M). **(A)** LL/2 após tratamentos, foram coradas e o crescimento de colônias (círculos pretos) foi demonstrado qualitativamente por fotografias. **(B)** Representação quantitativa da área total de colônias (em pixels) de LL/2 após os tratamentos. A quantificação da área foi feita com uso do software Image J. Experimento representativo de três repetições (n=3). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão médio. Diferenças estatísticas foram consideradas para  $p < 0,05$ . \*Grupos tratados versus controle (meio). #Tratamento *PaldoPC* versus tratamento com POPC.

### **5.3. Avaliação da viabilidade de células LL/2 em co-cultura com macrófagos ativados pela via clássica ou alternativa.**

Utilizamos a dosagem da metabolização de resazurina para determinar a viabilidade celular de tumor LL/2 em contato com macrófagos *in vitro*. Os ensaios de viabilidade celular são baseados na detecção colorimétrica de metabólitos processados por enzimas específicas que participam da atividade vital das células, e é correlacionado com a atividade celular.

Neste estudo, analisamos a metabolização de resazurina pelas células LL/2, correlacionando com o tempo de co-cultivo destas células com macrófagos polarizados. Observamos que, em tempo de co-cultivo de 4 horas (Figura 4A), a viabilidade celular para LL/2 em contato com M0, M1 ou M2 foi significativa para citotoxicidade (viabilidade negativa) apenas para proporções de co-cultivo acima de 10:1 (macrófagos:LL/2), indicando ação antitumoral destes macrófagos. No entanto a citotoxicidade de LL/2 em cultura com M2 foi significativamente maior que os demais fenótipos de MDMO. Na proporção de 5:1 (macrófagos:LL/2), em 4 horas de co-cultura, os M2 ainda demonstraram efeito citotóxico ao LL/2, mas os fenótipos M0 e M1 não apresentaram este efeito. Nas proporções de 2,5:1 e 1:1 (macrófagos:LL/2) os MDMO não demonstraram efeito citotóxico para LL/2, pelo contrário, aparentemente induziu viabilidade positiva de LL/2 (proliferação), em relação a cultura de LL/2 sem contato com macrófagos. Nestes experimentos, sugerimos que valores positivos de viabilidade celular evidenciam a produção de fatores antiapoptótico e antinecrótico pelos macrófagos associados aos tumores (MATs), em resposta à modulação do microambiente tumoral, impedindo a morte celular e estimulando sua proliferação. Quando os co-cultivos de MDMO e LL/2 foram realizados por 24 horas (Figura 4B), a influência do tumor para formar um microambiente favorável ao seu desenvolvimento torna-se mais evidenciada, tornando o efeito citotóxico de macrófagos nas proporções 20:1 e 10:1 (macrófagos:LL/2) menor que no co-cultivo por 4 horas.

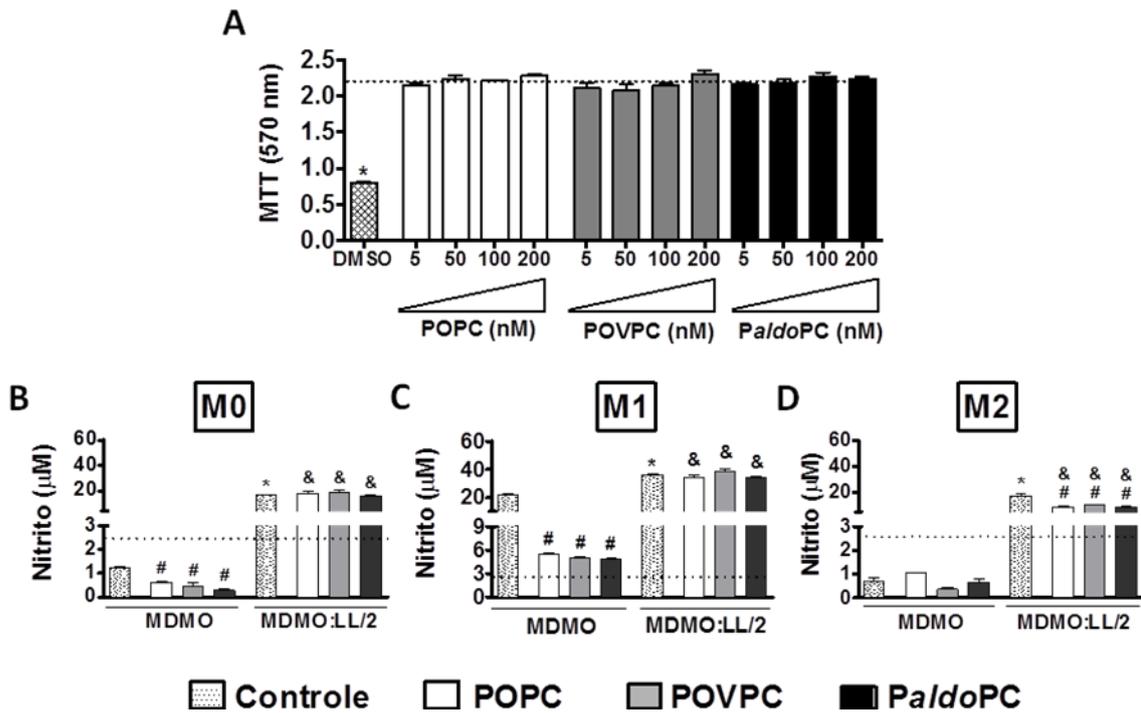


**Figura 4. Viabilidade celular de LL/2 em co-cultura com MDMO ativados ou não pela via clássica ou alternativa.** MDMO foram ativados ou não pela via clássica (INF- $\gamma$ ) adquirindo fenótipo M1, ou pela via alternativa (IL-4 + IL-13) para fenótipo M2. Após a ativação, foram adicionadas células LL/2 nas proporções de 20:1, 10:1, 5:1, 2,5:1 e 1:1 (macrófagos/tumor) durante **(A)** 4 horas ou **(B)** 24 horas. Após, a viabilidade celular foi analisada pelo teste de Resazurina, obtendo a fluorescência em espectrofotômetro (560 nm de emissão/ 590 nm de excitação) e calculada em comparação com células LL/2 sem contato com macrófagos, como descrito nos Materiais e Métodos. Experimento representativo de duas repetições (n=6). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão médio. Diferenças estatísticas foram consideradas para  $p < 0,05$ . \*LL/2 em co-cultivo com MDMO versus controle (somente cultura de LL/2). #Atividade de MDMO polarizados versus M0.

#### 5.4. Produção de NO por MDMO em co-cultivo com LL/2, e efeito dos fosfolipídios na modulação de MATs.

De acordo com os resultados apresentados no item anterior, optamos por utilizar na co-cultura de células a proporção de 5:1 (MDMO:LL/2), com tempo de 24 horas. Nesta proporção o efeito dos MDMO sobre o câncer não está definido para citotóxico ou proliferativo, assim, o tratamento com os fosfolipídios poderão induzir uma tendência para função pró- ou antitumoral dos MATs. Primeiramente, demonstramos o efeito de POPC, POVPC e *Paldo*PC na citotoxicidade para MDMO. Dessa forma, utilizamos as seguintes concentrações de fosfolipídios *in vitro*: 5, 50, 100 e 200 nM por 24 horas (Figura 5A). MDMO após tratamento com POPC, POVPC ou *Paldo*PC, independente da concentração, não apresentaram diferenças na metabolização de MTT em relação ao controle não tratado (meio). Interessante, POPC e POVPC não induziram proliferação dos MDMO (célula primária), como demonstrado para as células tumorais LL/2, tratadas com os mesmos fosfolipídios.

A produção basal de NO pelos MDMO polarizados foi diferenciada de acordo com o fenótipo (Figura 5B, 5C e 5D). Na ativação por via clássica (perfil M1 - Figura 5C), a produção basal de NO foi em números absolutos maior que a produção basal de M0 (Figura 5B) ou da via de ativação alternativa (perfil M2 – Figura 5D). Entretanto, os fosfolipídios modificaram a produção basal de NO nos M0 ou polarizados para M1. Independente do fosfolipídio (POPC, POVPC ou *Paldo*PC), a produção basal de NO foi significativamente menor em relação ao controle não tratado. Este efeito foi mais proeminente nos M1, que são naturalmente altos produtores de NO. Quando em associação com LL/2, todas as co-culturas com MDMO (M0, M1 ou M2) apresentaram aumento da produção de NO. Porém, os fosfolipídios (POPC, POVPC ou *Paldo*PC) só tiveram efeito na modulação da produção de NO na associação de LL/2 com M2, onde após o tratamento a produção de NO foi significativamente menor. Esses resultados sugerem que os LL/2 possuem capacidade de modular a atividade de macrófagos e orientar a produção de mediadores inflamatórios no microambiente tumoral.

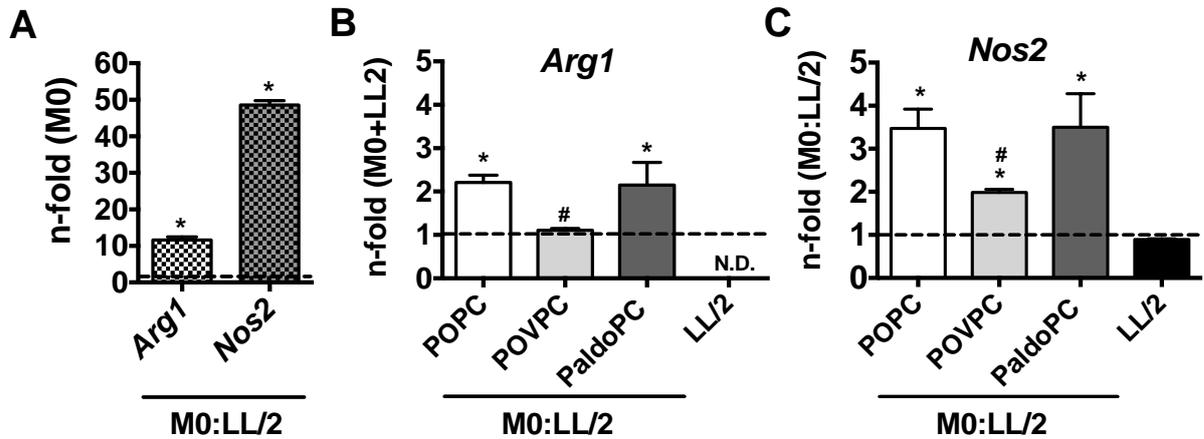


**Figura 5. Efeito dos fosfolipídios na produção de NO por MDMO ativadas ou não pela via clássica ou alternativa, e em associação com células LL/2.** MDMO foram tratadas ou não com os fosfolipídios POPC, POVPC e *PaldoPC* em diversas concentrações durante 24 horas. Após o tratamento, a citotoxicidade de MDMO foi avaliada **(A)** por ensaio de MTT. Como controle negativo foi utilizado apenas meio (linha tracejada). O controle positivo de morte foi utilizando DMSO (30%). Experimento representativo de duas repetições (n=6). MDMO foram plaqueadas e consideradas como **(B)** M0, ou **(C)** ativadas pela via clássica com IFN- $\gamma$  (M1) 100 ng/mL por 2 horas, ou **(D)** ativação alternativa com IL-4 + IL-13 (M2) 10 ng/mL por 24 horas. Após ativação, os MDMO foram tratadas ou não com POPC, POVPC ou *PaldoPC* (2000 nM) por 24 horas. Posteriormente, foi adicionado ou não, nas culturas de macrófagos, células LL/2 na proporção de 5:1 (MDMO:LL/2) durante 24 horas. A produção espontânea de NO por LL/2 está representada pela linha tracejada. As quantidades de NO nos sobrenadantes foram determinadas indiretamente pela formação de nitrito pelo Método de Griess. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão médio. Experimento representativo de três repetições (n=9). Diferenças estatísticas foram consideradas para  $p < 0,05$ . \* Grupos de MDMO em co-cultivo com LL/2 versus controle. # Grupos tratados versus controles não tratados. & Grupos de MDMO em co-cultivo com LL/2 tratados versus MDMO tratados.

### 5.5. Avaliação da expressão gênica de marcadores de fenótipos de MDMO, após co-cultivo com LL/2 e tratado com fosfolipídios.

Macrófagos polarizados para M1 e M2 não são só distintos em relação a função no organismo, mas também por diferentes expressões de receptores e enzimas relacionadas ao metabolismo celular. Desta forma, utilizamos da técnica de qRT-PCR para determinar os marcadores de fenótipos celulares nos MDMO em co-cultivo com LL/2. A expressão dos genes *Nos2* (iNOS) e *Arg1* (arginase-1) são os principais marcadores utilizados para diferenciar macrófagos do tipo M1 e M2 respectivamente. Em nossos experimentos (Figura 6A) demonstramos que macrófagos com perfil inicial em M0, quando em associação com LL/2, adquiriram padrão misto de ativação celular, pois os genes, *Arg1* e *Nos2*, estavam positivamente regulados. Porém, o aumento da expressão de *Nos2* foi maior (aproximadamente 50 vezes) que a expressão de *Arg1* (aproximadamente 10 vezes).

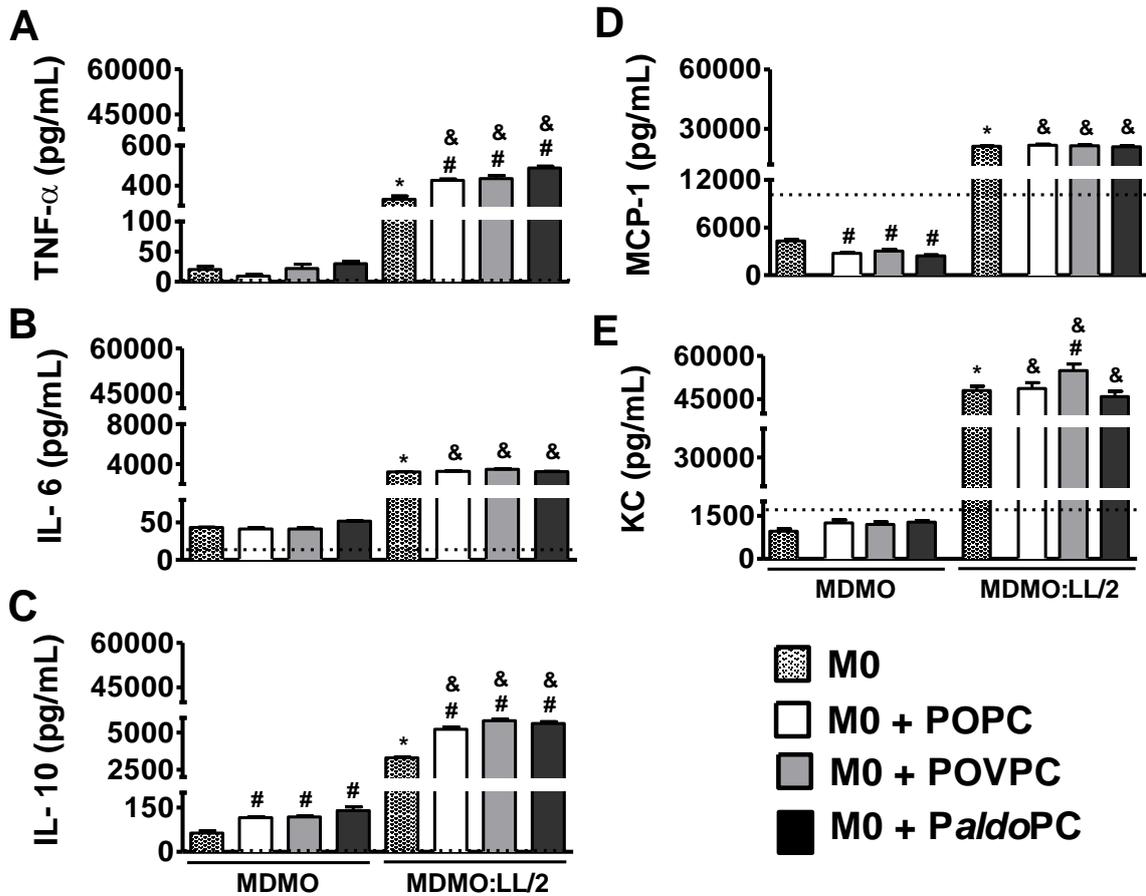
Em seguida, avaliamos a expressão gênica destes marcadores de fenótipos em MDMO não polarizados (M0), tratados com POPC, POVPC ou *Paldo*PC, e em associação com LL/2 (Figura 6B, 6C). Observamos, que na co-cultura, POPC e *Paldo*PC aumentaram a expressão de *Arg1* (aproximadamente 2,5 vezes) e *Nos2* (aproximadamente 3,5 vezes), comparados com a co-cultura sem tratamento. Entretanto, POVPC influenciou positivamente apenas a expressão de *Nos2*. Nota-se que as células LL/2 não expressam RNAm para Arginase-1 (Figura 5B), porém apresentam expressão acentuada para iNOS (Figura 5C). Dessa forma, não podemos descartar que a expressão de *Nos2* pode ser um efeito somatório da expressão basal das células em co-cultivo.



**Figura 6. Regulação da expressão de RNAm de MDMO em co-cultivo com LL/2 e tratados com fosfolipídios.** MDMOs foram cultivados em contato com células LL/2 na proporção 5:1 (MDMO:LL/2) durante 24 horas. Após, seu RNA total foi extraído, sintetizado o cDNA e analisado a expressão relativa ( $\Delta\Delta Ct$ ) por qRT-PCR. **(A)** Transcritos que codificam para Arginase-1 e iNOS, foram quantificados na co-cultura de macrófagos e tumor, e comparados com a produção de M0 sem associação com LL/2 (linha tracejada). Em outros experimentos, macrófagos foram tratados ou não com POPC, POVPC ou PaldoPC (2000 nM) por 24 horas. Posteriormente, foi condicionado em co-cultura com LL/2, e a **(B)** expressão relativa de *Arg1* ou de **(C)** *Nos2* foi determinada, comparando com a co-cultura de MDMO e LL/2 não tratadas (linha tracejada). Os resultados foram normalizados para a expressão endógena do controle interno *Actb*. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão médio de dois experimentos independentes em duplicata ( $n = 2$ ). Diferenças estatísticas foram consideradas para  $p < 0,05$ . \*Comparando grupos experimentais versus controle de referência. #Comparando entre os grupos tratados. (N.D. = não detectado).

## 5.6. Efeito dos fosfolipídios na produção de mediadores inflamatórios proteicos por MDMO não polarizados (M0), em co-cultivo com células tumorais LL/2.

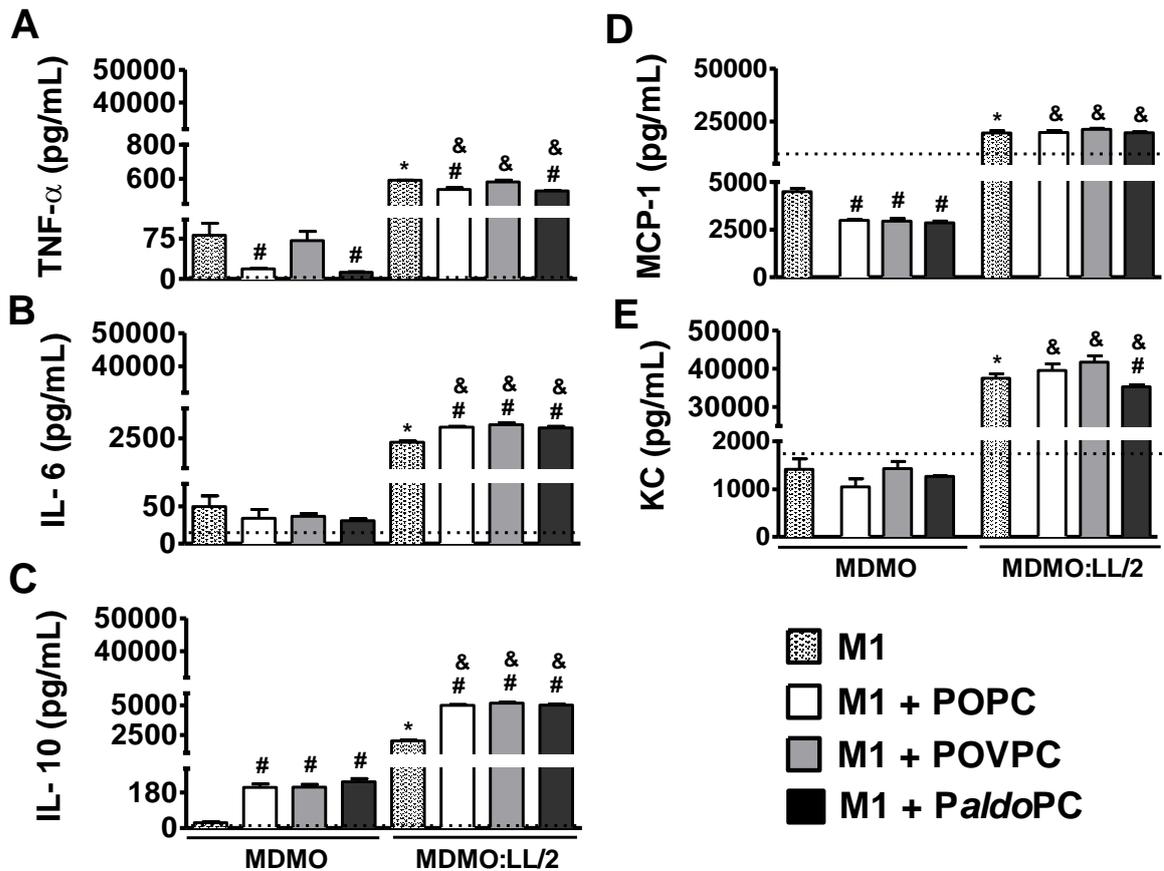
A polarização da resposta de macrófagos é importante para o condicionamento do microambiente tumoral. Após evidenciarmos a influência de LL/2 na modulação do fenótipo de macrófagos, investigamos qual é o perfil de citocinas e quimiocinas produzidos pelos MDMO (M0) em co-cultura com o tumor. Assim também, analisamos a influência de POPC, POVPC e *Paldo*PC na modulação da produção de mediadores inflamatórios proteicos por MDMOs, em associação ou não com as células LL/2. Observamos que para MDMO não associados ao LL/2, os fosfolipídios não tiveram efeito na produção de TNF- $\alpha$  (Figura 7A), IL-6 (Figura 7B) e KC (Figura 7E). Porém, aumentaram a produção de IL-10 (Figura 7C) e diminuíram significativamente a produção de MCP-1 (Figura 7D), quando comparados com os M0 não tratados. A produção basal de citocinas por células tumorais foram representadas nas linhas tracejadas dos gráficos, no qual salientamos a alta produção de MCP-1 e KC por LL/2. Demonstramos nos experimentos com MDMO (M0) em co-cultura com LL/2, que a produção de todos os mediadores proteicos estavam significativamente aumentadas em relação aos M0 não associados com LL/2. POPC, POVPC e *Paldo*PC tiveram efeito no aumento da produção de TNF- $\alpha$  (Figura 7A) e IL-10 (Figura 7C), mas não modularam a produção de IL-6 e MCP-1. Entretanto, apenas POVPC teve efeito no aumento da produção de KC (Figura 7E), quando comparados com M0 associados ao LL/2 e não tratados. Dessa forma, podemos observar que a influência de LL/2 na atividade de macrófagos é suficiente para criar um cenário favorável (em relação à produção de citocinas e quimiocinas) para o crescimento do tumor. No entanto, o efeito dos fosfolipídios, independente da espécie, foi adjuvante ao efeito do tumor, criando um microambiente extremamente favorável ao desenvolvimento tumoral.



**Figura 7. Produção de citocinas e quimiocinas por M0, tratados com fosfolipídios, e em co-cultivo com LL/2.** MDMO foram cultivados e tratados ou não com POPC, POVPC e *Paldo*PC (2000 nM) durante 24 h. Em seguida, foram co-cultivados com células tumorais LL/2 na proporção de 5:1 (MDMO:LL/2) durante 24 horas. As quantidades de mediadores inflamatórios proteicos nos sobrenadantes de cultura foram determinados pelo método de ELISA, para **(A)** TNF- $\alpha$ , **(B)** IL-6, **(C)** IL-10, **(D)** MCP-1 e **(E)** KC. O limite de detecção foi de 7,5 pg/mL. A produção espontânea de citocinas e quimiocinas por LL/2 foi representada pela linha tracejada. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão médio. Experimento representativo de três repetições (n=12). Diferenças estatísticas foram consideradas para  $p < 0,05$ . \*Grupos de MDMO em co-cultivo com LL/2 versus controle. #Grupos tratados versus controles não tratados. &Grupos de MDMO (M0) em co-cultivo com LL/2 tratados versus MDMO (M0) tratados.

### **5.7. Efeito dos fosfolipídios na produção de mediadores inflamatórios proteicos por MDMO ativados pela via clássica (M1), em co-cultivo com células tumorais LL/2.**

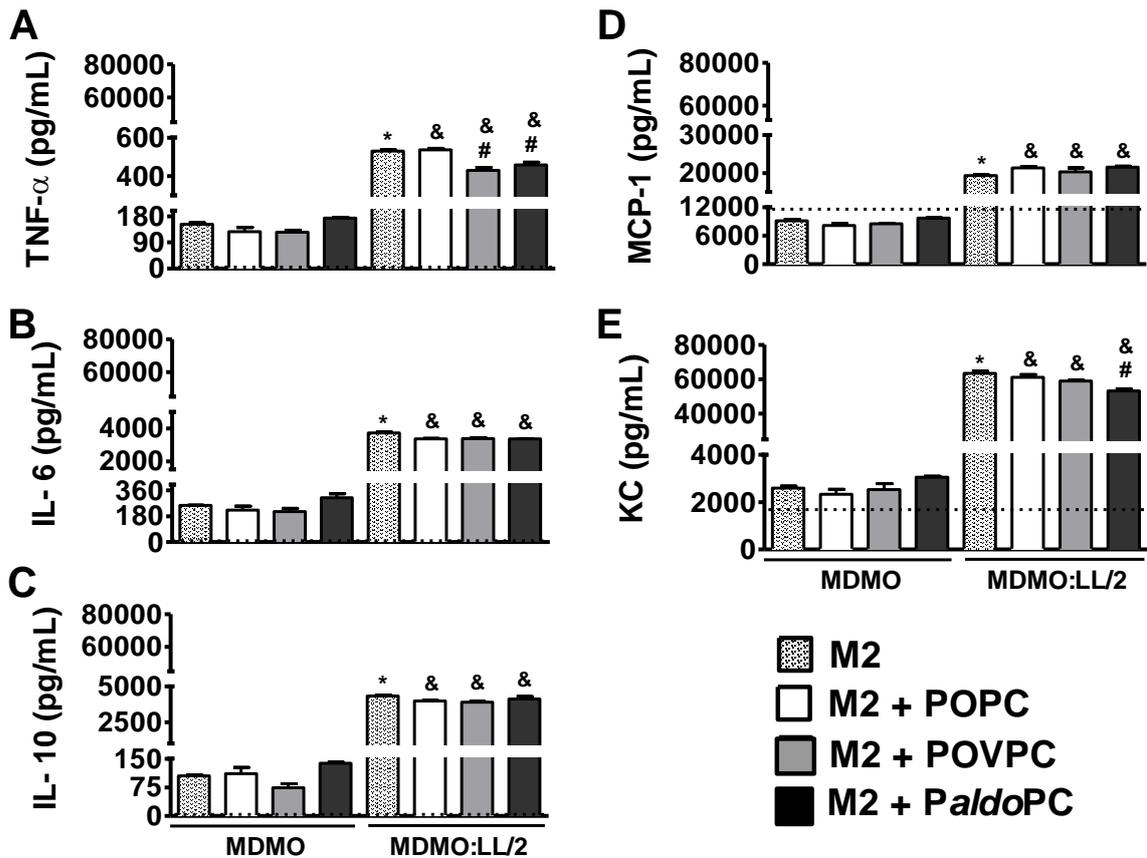
Os macrófagos possuem características de plasticidade, podendo mudar seu fenótipo ou atividade de acordo com a influência do microambiente. Os M1 são considerados como macrófagos antitumorais. Dessa forma, investigamos se o tumor (LL/2) apresentava influência na modulação do perfil de citocinas e quimiocinas produzidos por MDMO ativados com IFN- $\gamma$  (M1). Assim também, analisamos a influência de POPC, POVPC e *Paldo*PC na modulação da produção de mediadores inflamatórios proteicos por M1, em associação ou não com as células LL/2. Nossos resultados demonstraram que para M1 não associados ao LL/2, os fosfolipídios (POPC, POVPC e *Paldo*PC) tiveram efeito aumentando a produção de IL-10 (Figura 8C) e diminuindo a produção de MCP-1 (Figura 8D), quando comparados com M1 não tratados. Este fenômeno foi semelhante ao observado para M0. Porém, POPC e *Paldo*PC diminuíram a produção de TNF- $\alpha$  nos M1 sem associação com o tumor (Figura 8A). Os fosfolipídios não modularam a produção de IL-6 (Figura 8B) e KC (Figura 8E) nos M1 sem associação com LL/2. A produção basal de citocinas por células tumorais foram representadas nas linhas tracejadas dos gráficos. Em experimentos com associação de M1 e LL/2, demonstramos que a produção de todos os mediadores proteicos estavam significativamente aumentadas em relação aos M1 não associados com LL/2. Ainda, POPC, POVPC e *Paldo*PC tiveram efeito no aumento da produção de IL-6 (Figura 8B) e IL-10 (Figura 8C), mas não modularam a produção de MCP-1. Entretanto, POPC teve efeito na diminuição de TNF- $\alpha$ , e *Paldo*PC teve efeito na diminuição da produção de TNF- $\alpha$  e de KC (Figura 8E), quando comparados com M1 associados ao LL/2 e não tratados. Assim, postulamos que o efeito dos fosfolipídios é dependente do fenótipo do macrófago e de sua ativação basal.



**Figura 8. Produção de citocinas e quimiocinas por M1, tratados com fosfolipídios, e em co-cultivo com LL/2.** MDMO foram polarizados para M1 com incubação com IFN- $\gamma$  (100 ng/mL) por 2 horas, e tratados ou não com POPC, POVPC e *PaldoPC* (2000 nM) durante 24 h. Em seguida, foram co-cultivados com células tumorais LL/2 na proporção de 5:1 (MDMO:LL/2) durante 24 horas. As quantidades de mediadores inflamatórios proteicos nos sobrenadantes de cultura foram determinados pelo método de ELISA, para **(A)** TNF- $\alpha$ , **(B)** IL-6, **(C)** IL-10, **(D)** MCP-1 e **(E)** KC. O limite de detecção foi de 7,5 pg/mL. A produção espontânea de citocinas e quimiocinas por LL/2 foi representada pela linha tracejada. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão médio. Experimento representativo de três repetições (n=12). Diferenças estatísticas foram consideradas para  $p < 0,05$ . \*Grupos de MDMO em co-cultivo com LL/2 versus controle. #Grupos tratados versus controles não tratados. &Grupos de MDMO (M1) em co-cultivo com LL/2 tratados versus MDMO (M1) tratados.

### **5.8. Efeito dos fosfolipídios na produção de mediadores inflamatórios proteicos por MDMO ativados pela via alternativa (M2), em co-cultivo com células tumorais LL/2.**

Os M2 são considerados como macrófagos pró-tumorais, em geral, é o principal fenótipo de macrófagos encontrado nos tumores sólidos. Baseado nesta informação, o M2 seria o fenótipo final em uma situação de influência do microambiente tumoral. Dessa forma, investigamos se o tumor (LL/2) apresentava influência na modulação do perfil de citocinas e quimiocinas produzidos por MDMO ativados com IL-4 + IL-13 (M2). Assim também, analisamos a influência de POPC, POVPC e *Paldo*PC na modulação da produção de mediadores inflamatórios proteicos por M2, em associação ou não com as células LL/2. Nossos resultados demonstraram que para M2 não associados ao LL/2, os fosfolipídios (POPC, POVPC e *Paldo*PC) não tiveram efeito na modulação da produção de citocinas e quimiocinas (Figura 9A – 9E). Este fenômeno foi diferente ao observado para M0 e M1, no qual dependendo do perfil de produção de citocinas, os fosfolipídios apresentaram efeitos na regulação da produção de TNF- $\alpha$  e IL-10. Em experimentos com associação de M2 e LL/2, demonstramos que a produção de todos os mediadores proteicos estavam significativamente aumentadas em relação aos M2 não associados com LL/2, assim como observado para os M0 e M1. POPC, POVPC e *Paldo*PC nos M2 associados com LL/2, tiveram pouca influência na modulação da produção de citocinas. Salientamos, o efeito de POVPC na diminuição da produção de TNF- $\alpha$  (Figura 9A), e de *Paldo*PC que diminuiu significativamente a produção de TNF- $\alpha$  e KC (Figura 9E), semelhante ao observado com *Paldo*PC em M1 associado com LL/2, quando comparados com macrófagos associados ao LL/2 e não tratados.



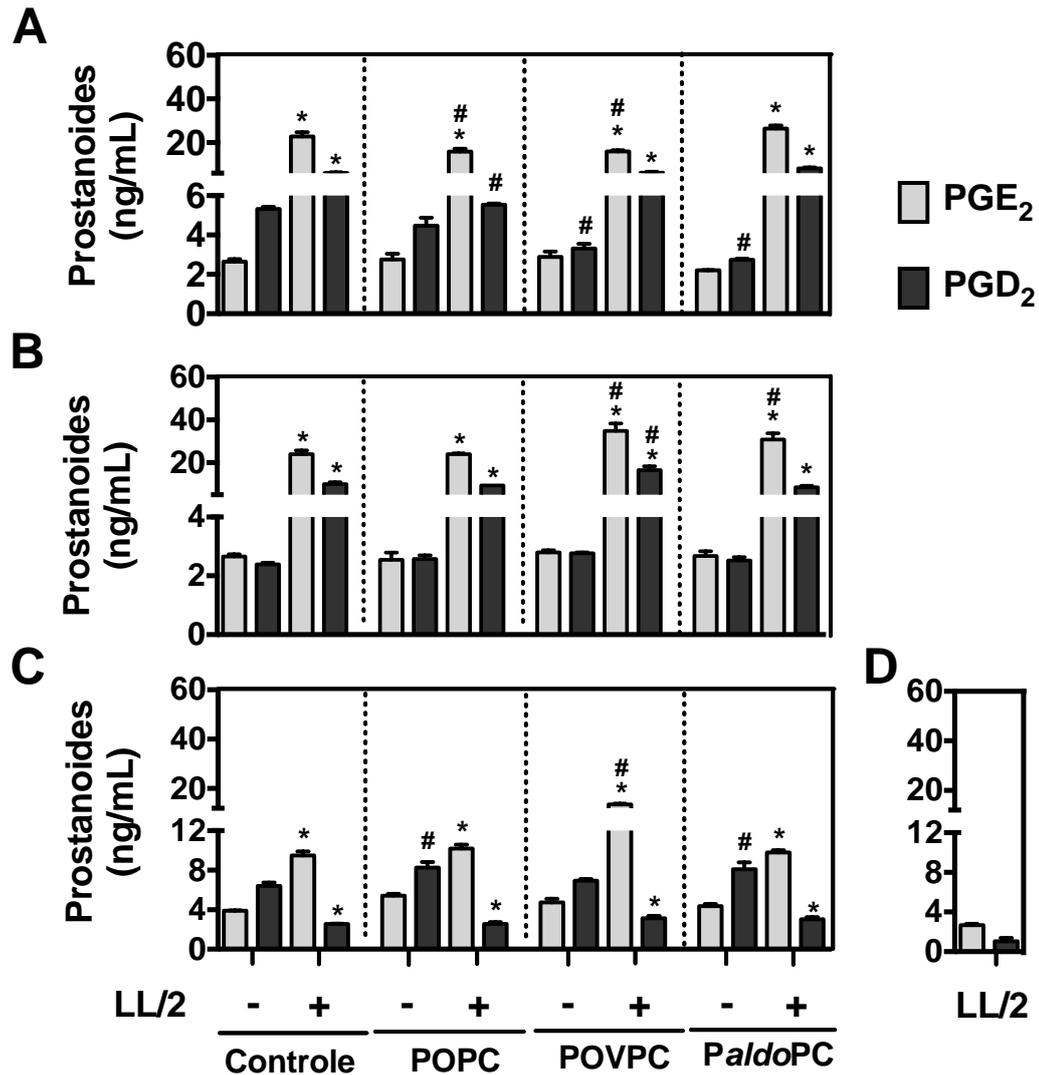
**Figura 9. Produção de citocinas e quimiocinas por M2, tratados com fosfolipídios, e em co-cultivo com LL/2.** MDMO foram polarizados para M2 com incubação com IL-4 + IL-13 (10 ng/mL) por 24 horas, e tratados ou não com POPC, POVPC e *PaldoPC* (2000 nM) durante 24 h. Em seguida, foram co-cultivados com células tumorais LL/2 na proporção de 5:1 (MDMO:LL/2) durante 24 horas. As quantidades de mediadores inflamatórios proteicos nos sobrenadantes de cultura foram determinados pelo método de ELISA, para **(A)** TNF- $\alpha$ , **(B)** IL-6, **(C)** IL-10, **(D)** MCP-1 e **(E)** KC. O limite de detecção foi de 7,5 pg/mL. A produção espontânea de citocinas e quimiocinas por LL/2 foi representada pela linha tracejada. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão médio. Experimento representativo de três repetições (n=12). Diferenças estatísticas foram consideradas para  $p < 0,05$ . \* Grupos de MDMO em co-cultivo com LL/2 versus controle. # Grupos tratados versus controles não tratados. & Grupos de MDMO (M2) em co-cultivo com LL/2 tratados versus MDMO (M2) tratados.

### 5.9. Produção de prostaglandinas por M0, M1 e M2, em co-cultivo com LL/2, e tratado com fosfolipídios.

Os mediadores lipídicos são moléculas inflamatórias muito importantes na regulação das funções efetoras de macrófagos, atuando na iniciação da resposta imune. Desta forma, as prostaglandinas podem estar envolvidas no processo de carcinogênese, principalmente relacionado com a iniciação e promoção do câncer, proliferação celular e metástase tumoral. Em nossos experimentos, através da espectrometria de massas, observamos a produção das prostaglandinas PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> nos MDMO (M0 – Figura 10A), nos M1 (Figura 10B) e nos M2 (Figura 10C), após tratamento ou não com POPC, POVPC e *Paldo*PC, em associação ou não com as células LL/2. Para obter a informação da capacidade fisiológica de produção de mediadores lipídicos, fizemos um pós tratamento dos macrófagos com ionóforo de cálcio (0,5 µM) por 20 minutos, que ativa a liberação de cálcio intracelular e sinaliza positivamente para a ativação das enzimas do metabolismo de lipídios. Observamos que nos diferentes perfis de MDMO, ocorreu o aumento da produção de PGE<sub>2</sub> quando os macrófagos estavam em associação com as células tumorais LL/2 (Figura 10A, 10B e 10C). Porém, a produção de PGD<sub>2</sub> foi significativamente maior apenas para os M0 e M1 em co-cultura com LL/2, comparados com os macrófagos não associados ao câncer. Entretanto, para os M2 após a co-cultura com LL/2, a produção de PGD<sub>2</sub> diminuiu significativamente (Figura 10C). Comparando em números absolutos a produção de PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> nos MDMO em co-cultura com LL/2, podemos observar que os M0 e M1 (Figura 10A e 10B) possuem maior capacidade metabólica para produção destes mediadores lipídicos, em relação aos M2 nas mesmas condições experimentais (Figura 10C).

No perfil M0 (Figura 10A), POVPC e *Paldo*PC diminuíram significativamente a produção de PGD<sub>2</sub> basal nos macrófagos não associados com LL/2, mas não tiveram efeito na modulação da produção de PGE<sub>2</sub>. Contudo, no perfil M2 (Figura 10C), POPC e *Paldo*PC aumentaram significativamente a produção de PGD<sub>2</sub> basal nos macrófagos não associados com LL/2, mas também, não tiveram efeito na modulação da produção de PGE<sub>2</sub>. Em relação ao perfil M1 (Figura 10B), não observamos nenhum efeito dos fosfolipídios na modulação basal da produção de prostaglandinas. Diferente do observado para a produção basal de prostaglandinas

por MDMO; quando em associação com LL/2, POPC diminuiu a produção de PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> nos M0 (Figura 10A), mas, não teve efeito nos demais macrófagos (M1 e M2). No entanto, POVPC demonstrou efeito diminuindo a produção de PGE<sub>2</sub> nos M0, mas aumentando a produção de PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> nos M1 (Figura 10B), e também aumentando a produção de PGE<sub>2</sub> nos M2 (Figura 10C), quando comparados com os macrófagos não associados com LL/2. Em relação ao *Paldo*PC, observamos efeito somente no aumento significativo de PGE<sub>2</sub> nos M1 (Figura 10B). A produção basal de PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> de células LL/2 após estimulação com ionóforo de cálcio, está demonstrada na Figura 10D, onde observamos que esta linhagem tumoral também tem a capacidade de produzir essas prostaglandinas. Entretanto, a produção de prostaglandinas em macrófagos associados ao LL/2 é diferente da somatória da produção basal das células em co-cultura. Dessa forma, o tumor exerce efeito na modulação da produção de mediadores lipídicos dos macrófagos, e esse fenômeno é diferente para os tipos de polarização de macrófagos, como também o efeito dos fosfolipídios modula de modo diferente o metabolismo de lipídios nos macrófagos.



**Figura 10. Produção de prostaglandinas por MDMO, em co-cultivo com células tumorais LL/2, e tratados com fosfolipídios.** MDMO foram cultivados em meio de cultura, considerados **(A)** M0, ou **(B)** ativados pela via clássica com IFN- $\gamma$  (M1) 100 ng/mL por 2 horas, ou **(C)** ativação alternativa com IL-4 + IL-13 (M2) 10 ng/mL por 24 horas. Após ativação, os MDMO foram tratados ou não com POPC, POVPC ou PaldoPC (2000 nM) por 24 horas. Posteriormente, foi adicionado ou não, nas culturas de macrófagos, células LL/2 na proporção de 5:1 (MDMO:LL/2) durante 24 horas. Posterior ao co-cultivo, as células foram estimuladas com Ionóforo de cálcio (0,5  $\mu$ M) durante 20 minutos à 37°C. **(D)** Produção espontânea de PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> por LL/2. A quantificação de eicosanoides foi realizada por espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) em modo quantitativo com fonte de ionização no modo negativo, e os dados adquiridos no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão médio (n=5). Diferenças estatísticas foram consideradas para p < 0,05. \*Grupos em co-cultura de MDMO:LL/2 versus controles não associados ao tumor. #Grupos tratados versus MDMO não tratados.

## 6. DISCUSSÃO

O carcinoma de pulmão está entre os tipos de câncer mais desafiadores, devido sua agressividade e mortalidade. Estudos que possibilitam melhorias no tratamento e novos métodos terapêuticos são de extrema importância e poderão refletir no aumento da sobrevivência dos pacientes e na qualidade de vida. Atualmente, muitos estudos têm sido realizados com lipídios, buscando a modulação/reestruturação da própria membrana lipídica celular, como também, a ativação de proteínas de membrana e sua sinalização celular (ESCRIBÁ, 2006). Já é sabido que a composição de lipídios de membrana em pacientes com câncer está modificada (HENDRICH; MICHALAK, 2003b; MIKIROVA et al., 2004). Por isso, a função dos fosfolipídios tem sido muito estudada nesta patologia.

Em nossos resultados, demonstramos que POPC e POVPC, nas maiores concentrações utilizadas (2000 nM), indicam proliferação das células tumorais LL/2. Em contrapartida, *PaldoPC* não apresenta efeito na proliferação celular, mas sim, atividade citostática sobre as células tumorais, quando comparado ao controle sem tratamento. Foi demonstrado que no tratamento com o fosfolipídio sintético S-NC-2 (S-1-O-fosfocolina 2-N-acetil-octadecano), células de leucemia (Jurkat, BJAB, SKW6.4 e K562) foram induzidas à morte por apoptose. No entanto, nesse mesmo trabalho, as células K562 mostraram serem resistentes ao tratamento com S-NC-2, pois não possuem o receptor Fas (OBERLE; MASSING; KRUG, 2005). Edelfosina, um alquilfosfolipídio, induziu apoptose em células cancerígenas pancreáticas, pois se acumulou no retículo endoplasmático, levando-o ao stress e a apoptose (GAJATE et al., 2012). Estudos utilizando a fosfoetanolamina sintética também mostraram efeitos tóxicos em células tumorais como, câncer de mama humano e melanoma murino (FERREIRA et al., 2013; VERONEZ, 2012). No entanto, em nossos resultados *PaldoPC* não induziu apoptose nas células tumorais LL/2, mas sim efeito citostático sobre estas células, quando observamos por meio da coloração do número de colônias, em relação ao controle sem tratamento. Quando comparamos esses dados, juntamente com o fato que POPC (fosfocolina não oxidada) e *PaldoPC* (fosfocolina oxidada) são um dos fosfolipídios mais abundantes do LS, podemos considerar a importância desses fosfolipídios em um contexto tumoral. Nesse sentido, podemos inferir que a abundância de POPC no LS pode estar associada ao

fato que muitos cânceres possuem metástase no pulmão, como por exemplo, câncer de mama, estômago e bexiga (BRETAS et al., 2006; ESCUISSATO et al., 2002; SILVA et al., 2007).

Os macrófagos são as principais células do sistema imune, que atuam como sentinelas do organismo. O fenótipo M1 é essencial na resposta imune contra os tumores (MANTOVANI et al., 2005). Porém, células tumorais podem modular o fenótipo destes macrófagos, fazendo com que estes deixem de ser antitumorais (M1) e passem a ser pró-tumorais (TAM - M2) (MATOBA et al., 2006). No microambiente tumoral, os macrófagos são as células com maior predominância (MANTOVANI, 2002; OBEID et AL., 2013). Eles secretam uma diversidade de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas que regulam o crescimento tumoral, angiogênese, invasão e metástase (LEWIS; POLLARD, 2006).

Em nossos experimentos de viabilidade celular de LL/2 em co-cultura com MA, observamos que nas maiores proporções utilizadas, o perfil M2 de MA parecem ter sido mais tóxicos no tempo de 4 horas, do que os perfis M0 e M1. No entanto, no tempo de 24 horas de co-cultivo, observamos que na proporção 5:1 (MA:LL/2), os MA de perfil M1 foram eficazes sendo mais tóxicos que os outros perfis de MA, visto que, o perfil M1 de MA são os que exercem ação antitumoral. Muitos estudos mostram a importância desses MA no combate as células tumorais. O trabalho de Ohri e colaboradores demonstrou que MA de perfil M1, localizados nas ilhotas tumorais estão associados a sobrevida de pacientes com CPNPC (OHRI et al., 2009). Outro estudo mostrou que o contato de MA de perfil M2 com as células de adenocarcinoma de pulmão, possibilitou o processo metastático destas células (ZHANG et al., 2012). Macrófagos M2 foram encontrados como a forma prevalente de TAMs nesses tipos de tumores, equivalendo a 70% em comparação ao perfil M1. Por outro lado, a densidade de macrófagos M1 nos pacientes avaliados foi significativamente mais elevada no grupo de pacientes de sobrevivência longa do que no grupo sobrevivência curta (MA et al., 2010). Mostrando então, a importância desses MA de perfil M1 como agentes antitumorais.

Nossos dados também revelaram que os fosfolípidios utilizados não foram tóxicos para os macrófagos (Figura 5A), mostrando uma diferença quando comparado ao trabalho de Uhson e colaboradores, onde *PaldoPC* levou macrófagos

peritoneais a morte por necrose (UHLSON et al., 2002). Isso pode ser explicado porque nesse trabalho utilizaram concentrações mais elevadas (6  $\mu\text{M}$ ) de fosfolipídios do que as que foram utilizadas nesta pesquisa.

Além desses dados, verificamos que o co-cultivo das células tumorais LL/2 com os MA, aumentou a produção de NO por esses MA, em relação ao seu controle. Assim como, os diferentes fosfolipídios (POPC, POVPC e *Paldo*PC) inibiram a produção de NO, do perfil M0 e M1 dos MA livres de associação com as células tumorais. Da mesma maneira, também inibiram a produção de NO do perfil M2, daqueles MA em co-cultura com as células LL/2. Estudos apontam um papel duplo do NO em tumores, que em concentrações elevadas, possuem função antitumoral, no entanto, concentrações baixas apresentam ação pró-tumoral (JENKINS et al., 1995). O NO está envolvido em muitos processos fisiológicos e também patológicos, como o fluxo sanguíneo, a neurotransmissão, o câncer (LI et al., 2017), assim como, doenças cardiovasculares e outras doenças inflamatórias (PUHAKKA et al., 2003). A expressão aumentada de iNOS está envolvida a um mau prognóstico em alguns cânceres, como o melanoma, a leucemia, o câncer gástrico e carcinoma hepatocelular (LI et al., 2017). Por outro lado, essa relação não foi vista para o câncer de pulmão. Puhakka e colaboradores mostram em seu trabalho que a alta expressão de NO sintases está relacionada a um bom prognóstico em CPNPC (PUHAKKA et al., 2003). Nesse sentido, podemos concluir que a ação dos tratamentos no perfil de M2 de MA em associação com as células LL/2, podem está favorecendo esse perfil pró-tumoral, inibindo a produção de NO em relação ao seu controle.

Os macrófagos podem ser polarizados para M1 e M2, e esta polarização pode ocorrer pela prevalência no microambiente inflamatório de citocinas do perfil Th1 ou Th2, como IFN- $\gamma$ , ou IL-4 e IL-13, respectivamente. A expressão de iNOS e arginase-1 são os marcadores determinantes utilizados para diferenciar MA do tipo M1 e M2 (ISHII et al., 2009; RAES et al., 2002). Em nossos dados observamos que, a co-cultura de MA com as células LL/2 proporcionou para que esses MA expressassem RNAm para arginase-1 e iNOS. Porém, o aumento da expressão de iNOS foi superior que o da arginase-1. POPC e *Paldo*PC aumentaram a expressão do RNAm para arginase e iNOS, quando comparado a co-cultura sem os

tratamentos (Figura 6B e 6C). Notamos também, que as células LL/2 não expressam RNAm para arginase, contudo apresentam para iNOS. Trabalhos têm mostrado a presença da NO sintase em cânceres de mama e ginecológicos (JENKINS et al., 1995). Eros e colaboradores, verificaram que o uso de fosfatidilcolina diminuiu a dor gerada pela inflamação, a angiogênese, o dano nas juntas, assim como, a expressão de iNOS, e a ativação de leucócitos em modelos de artrite reumatóide (ERÓS et al., 2009). No entanto, em nossos resultados observamos uma polarização mista para o perfil M0, onde a co-cultura desses MA com as células LL/2, proporcionou para que os genes *Nos2* e *Arg1* fossem regulados positivamente. Esta regulação mista pode favorecer efeitos imunossupressivos nos MA, pela produção de citocinas como IL-10, pela indução de células T regulatórias (Tregs), ou por afetar a função de células natural killer (NK) (KUMAR et al., 2016).

A inflamação é um importante fator para o microambiente tumoral, sendo chave nos processos de proliferação, sobrevivência e migração do câncer, além de está bastante relacionada com as células inflamatórias que são recrutadas e acabam por residir nesse microambiente tumoral (COUSSENS; WERB, 2002; OBEID et al., 2013).

No microambiente tumoral existe uma grande quantidade de fatores que auxiliam na proliferação das células tumorais, como por exemplo, a citocina IL-6, que além de ser um mediador antiapoptótico, favorece a proliferação destas células (NICOLINI; CARPI; ROSSI, 2006). As citocinas IL-8 (KC) e IL-10 também estão associadas a um mau prognóstico para pacientes com câncer de mama (NICOLINI; CARPI; ROSSI, 2006). TNF- $\alpha$  pode ser considerada uma citocina reguladora na regressão de cânceres benignos, como por exemplo, sendo eficaz na inibição do crescimento de queratinócitos não-malignos positivos para HPV (BACHMANN et al., 2002). Por outro lado, uma alta produção de TNF- $\alpha$  também pode está relacionada a progressão e angiogênese tumoral, juntamente com IL-6 e IL-8, como no carcinoma epidermóide oral (SAHIBZADA et al., 2017). Kovacs e colaboradores verificaram em seu trabalho, que o pré-tratamento com a suplementação oral de fosfatidilcolina protege contra o aumento de TNF- $\alpha$ , assim como, aumenta o número de células caliciformes produtoras de muco, facilitando a recuperação de uma camada de mucina protetora na fase posterior da colite induzida por TNBS (Ácido

trinitrobenzenossulfônico) (KOVÁCS et al., 2012). Kimura e colaboradores mostraram em seu estudo que, *PaldoPC* diminuiu produção de TNF- $\alpha$  e NO, prejudicando assim a atividade de MA (KIMURA et al., 2012). A quimiocina MCP-1 também pode ser relacionada negativamente a cânceres malignos, pois em biópsias de pacientes com câncer cervical, verificou-se um amplo número de células infiltrantes, como macrófagos, em comparação a biópsias pré-malignas (BACHMANN, 2002).

Em nossos estudos, verificamos que o co-cultivo das células tumorais LL/2 com os MA foram capazes de aumentar a produção de todas as citocinas e quimiocinas analisadas, em relação ao seu controle. Porém, os fosfoipídios aumentaram ainda mais as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10, no perfil M0, além de POVPC também aumentar a produção de KC. As citocinas IL-6 e IL-10 também aumentaram após os tratamentos, no perfil M1, assim como, POPC inibiu a produção de TNF- $\alpha$ , e *PaldoPC* inibiu a produção de TNF- $\alpha$  e KC. Entretanto, para o perfil M2, *PaldoPC* inibiu a produção de KC. Assim, podemos concluir que POPC e *PaldoPC* estão relacionados aos diferentes perfis de MA (M0, M1 e M2), na modulação da produção das citocinas e quimiocinas analisadas, principalmente TNF- $\alpha$  e IL-10. Desta forma, o tratamento com POPC e *PaldoPC* ocasionaram a modulação das funções dos MA, como por exemplo, no perfil M1, inibindo a produção de TNF- $\alpha$  e KC, e aumentando a produção das citocinas IL-6 e IL-10, proporcionando assim um ambiente favorável para o câncer. Porém, a ação dos tratamentos só potencializou o efeito do câncer sobre os MA nos diferentes perfis.

Além desses mediadores inflamatórios que estão relacionados com as funções dos MA, existem também os eicosanoides, que são mediadores lipídicos inflamatórios. Estes mediadores lipídicos também são importantes nas funções dos MA, mas, em um microambiente tumoral podem está relacionados com a proliferação, angiogênese, invasividade, assim como, com a apoptose e a imunossupressão (DAS et al., 2003b). Os eicosanoides podem ser gerados pelo metabolismo do AA, pela via da enzima das cicloxigenases (COX), ou pela via das lipoxigenases (LOX) (WANG et al., 2015). As lipoxigenases (LOX), por exemplo, exerce funções na regulação da apoptose celular, tendo em vista que em carcinomas colorretais, a enzima 15-LOX ocasionou a diminuição da apoptose,

estando regulada de forma negativa (DAS et al., 2003b), nesse sentido, o aumento da expressão dessa enzima poderia induzir apoptose nessas células tumorais. O uso de anti-inflamatório não esteroides (inibidores de COX) aumentam a expressão de 15-LOX, sendo importante na inibição do crescimento e indução da apoptose em células de câncer colorretal (SHUREIQI et al., 2000). No entanto, a co-expressão das enzimas COX-2 e 5-LO podem estar relacionadas à tumorigênese estando, por exemplo, associadas a um prognóstico ruim em glioblastoma (WANG et al., 2015). A COX-2 é uma enzima que está constitutivamente presente na maioria dos tumores, e pode promover a progressão tumoral pela produção de prostaglandinas (NAKANISHI et al., 2011). Mais de 80% dos cânceres de cólon tem níveis aumentados de COX-2 quando comparados com tecidos saudáveis (WILLIAMS; SMALLEY; DUBOIS, 1997). Além disso, a produção elevada de PGE<sub>2</sub> também está relacionada de forma negativa a pacientes com adenocarcinoma maligno do cólon (DINARELLO, 2006). PGE<sub>2</sub> é um mediador imunossupressor, e este efeito de imunossupressão, somado a inibição da citocina TNF- $\alpha$ , possibilita que as células tumorais proliferem de forma descontrolada no decorrer deste processo de malignidade, e ao passo que as células tumorais avançam para o estágio metastático, estas começam a serem mais resistentes à apoptose celular (DAS et al., 2003b).

Os mediadores gerados a partir do metabolismo da enzima COX-2, também estão relacionados com a patogênese da fibrose pulmonar (KIDA et al., 2016). Em seu estudo, Kida e colaboradores verificaram que a PGD<sub>2</sub> influenciou em um papel protetor na fibrose pulmonar, possuindo uma ação antifibrótica, através da supressão da inflamação (KIDA et al., 2016). A PGD<sub>2</sub> é um mediador inflamatório também conhecido por está relacionado à asma alérgica, assim como, por está envolvido com a quimiotaxia de células imunes, como eosinófilos e basófilos (KIDA et al., 2016). Murata e colaboradores verificaram que PGD<sub>2</sub> inibiu a angiogênese tumoral pela diminuição da produção de TNF- $\alpha$ , assim como, supressão da hiperpermeabilidade vascular (MURATA et al., 2011).

Em nossos dados, observamos que a co-cultura dos MA com as células tumorais proporcionou o aumento da produção dos prostanoides, em comparação ao seu controle, independentes dos perfis de MA. Porém, a associação dos MA com

as células LL/2 inibiram a produção da  $PGD_2$  no perfil M2, e nenhum dos tratamentos tiveram efeito na alteração dessa inibição, demonstrando assim, um efeito potente das células LL/2 sobre os MA de perfil M2, que são MA pró-tumorais. Observamos também, que os diferentes fosfolipídios, inclusive *PaldoPC*, não foram eficazes em aumentar a produção de  $PGD_2$  nas co-culturas, e nos diferentes perfis de MA, quando comparado aos seus controles. Com exceção que, *POVPC* no perfil M1 ocasionou este aumento, mas também, não foi superior ao aumento de  $PGE_2$ . Bochkov e colaboradores mostraram em seu trabalho que, fosfolipídios oxidados como *OxPAPC*, possui efeitos angiogênicos, proporcionando o aumento de VEGF, IL-8 e COX-2, contribuindo para crescimento de capilares sanguíneos em lesões avançadas (BOCHKOV et al., 2006). Também evidenciam que por possuírem propriedades angiogênicas são importantes para uma diversidade de patologias, como na angiogênese tumoral (BOCHKOV et al., 2006). Nesse sentido, podemos concluir que as células tumorais foram capazes de modular também a produção dos prostanoídes pelos MA, assim como visto, para as citocinas e quimiocinas, proporcionando um microambiente favorável para seu crescimento e proliferação.

## 7. CONCLUSÃO

Como conclusões do presente trabalho, temos:

- POPC e POVPC induziram proliferação celular de LL/2, porém *Paldo*PC não teve efeito em induzir a proliferação;
- POPC e POVPC aumentaram a formação de colônias de LL/2, porém *Paldo*PC teve efeito citostático;
- LL/2 possuem capacidade de modular a atividade de MA e orientar a produção de mediadores inflamatórios (óxido nítrico) no microambiente tumoral;
- MA com perfil M0, quando em associação com LL/2, adquiriram padrão misto (Arg1 e Nos2) de ativação celular, e POPC e *Paldo*PC aumentaram a expressão de Arg1 e Nos2;
- Em relação às citocinas e quimiocinas, o efeito dos fosfolipídios, independente da espécie, foi adjuvante ao efeito do tumor, criando um microambiente extremamente favorável ao desenvolvimento tumoral. Assim como, o efeito dos fosfolipídios foi dependente do fenótipo do macrófago e de sua ativação basal;
- O tumor exerce efeito na modulação da produção de mediadores lipídicos dos MA, nos diferentes tipos de polarização, como também, o efeito dos fosfolipídios modula de modo diferente o metabolismo de lipídios nos MA.

Por fim, nossos dados foram importantes para entender o funcionamento desses fosfolipídios do LS, em um contexto de microambiente tumoral.

## 8. REFERÊNCIAS

ACS. American Cancer Society. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-key-statistics>. Acessado: 02 de fevereiro de 2017.

ACS. American Cancer Society. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-what-is-non-small-cell-lung-cancer>. Acessado: 02 de fevereiro de 2017.

ACS. American Cancer Society. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>. Acessado: 02 de fevereiro de 2017.

ALB, M. et al. Cellular and cytokine-dependent immunosuppressive mechanisms of grm1-transgenic murine melanoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, n. 12, p. 2239–2249, 2012.

ALLAVENA, P. et al. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages, **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2008.

ALMSTRAND, A.-C.; VOELKER, D.; MURPHY, R. C. Identification of oxidized phospholipids in bronchoalveolar lavage exposed to low ozone levels using multivariate analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 474, p. 50–58, abr. 2015.

ANAND, P. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2097-116, 2008.

BACHMANN, A. et al. Disturbance of Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Beta Interferon Signaling in Cervical Carcinoma Cells. **Journal of Virology**, v. 76, n. 1, p. 280–291, 1 jan. 2002.

BAILEY, P. The reactions of ozone with organic compounds. **Chemical Reviews**, v. 58, n. 5, p. 925–1010, 1958.

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V; DENNIS, E. A. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS letters**, v. 531, n. 1, p. 2–6, 30 out. 2002.

BARLEON, B. et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. **Blood**, v. 87, n. 8, p. 3336–3343, 1996.

- BI, J.; TIAN, Z. NK Cell Exhaustion. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 28 jun. 2017.
- BIE, Q. et al. IL-17B: A new area of study in the IL-17 family. **Molecular Immunology**, v. 90, p. 50–56, out. 2017.
- BLANCO HIDALGO, O. Propiedades antiinflamatorias del surfactante pulmonar y su aplicación en la clínica, **Biotecnología Aplicada**, v. 21, n. 2, p. 70-76, 2004.
- BOCCI, V. Does Ozone Therapy Normalize the Cellular Redox Balance? Implications for the Therapy of Human Immunodeficiency Virus Infection and Several Other Diseases. **Medical Hypotheses**, v. 46, p. 150–154, 1996.
- BOCCI, V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? **British Journal of Biomedical Science**, v. 56, n. 4, p. 270-9, 1999.
- BOCHKOV, V. N. et al. Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via autocrine mechanisms, implicating a novel role for lipid oxidation in the evolution of atherosclerotic lesions. **Circulation research**, v. 99, n. 8, p. 900–8, 13 out. 2006.
- BOCHKOV, V. N. Inflammatory profile of oxidized phospholipids, **Thrombosis and Haemostasis**, v. 97, n. 3, p. 348-54, 2007.
- BRAY, F.; MØLLER, B. Predicting the future burden of cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 1, p. 63–74, 2006.
- BRETAS, F. F. H. et al. Câncer avançado de bexiga: melhores evidências para a decisão clínica. **COBEU: Comitê brasileiro de estudos em uro-oncologia**, 2006.
- CALDERON, C. L. et al. Involvement of protein kinase C and not of NF kappa B in the modulation of macrophage nitric oxide synthase by tumor-derived phosphatidyl serine. **International journal of oncology**, v. 32, n. 3, p. 713–721, 2008.
- CLARK, O. et al. Valor clínico das terapias biológicas em oncologia: mensuração de desfechos para a avaliação de benefícios. **J Bras Econ Saúde**, v. 5, n. 1, p. 29-37, 2013.
- CLAVO, B. et al. Effect of Ozone Therapy on Muscle Oxygenation. **The journal of alternative and complementary medicine**, v. 9, n. 2, p. 251–256, 2003.
- CLAVO, B. et al. Ozone Therapy for Tumor Oxygenation: a Pilot Study. **eCAM**, v. 1, n. 1, p. 93–98, 2004.
- CONSTANTINO, J. et al. Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. **Immunologic Research**, 28 jun. 2017.

- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 19 dez. 2002.
- CRIEGEE, R. Mechanism of Ozonolysis. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 14, n. 11, p. 745–752, 1975.
- DAS, S. et al. Arachidonic acid and colorectal carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, n. 1/2, p. 141–149, nov. 2003b.
- DAVICINO, R. C. et al. Coupling pathogen recognition to innate immunity through glycan-dependent mechanisms. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1457-1463, 2011.
- DAVIES, S. S. et al. Oxidized Alkyl Phospholipids are Specific, High Affinity Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Ligands and Agonists. **Journal of Biological Chemistry**, 2001.
- DI PAOLO, N.; BOCCI, V.; GAGGIOTTI, E. Ozone therapy. **International Journal of Artificial Organs**, v. 27, n. 3, p. 168–175, 2004.
- DINARELLO, C. A. The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 307–313, 6 dez. 2006.
- DUNN, G. P. et al. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. **Nature Immunology**, v. 6, n. 7, p. 722–729, 12 jul. 2005.
- EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. **Annals of Surgical Oncology**, v. 17, n. 6, p. 1471–1474, 24 jun. 2010.
- ELVIS, A.; EKTA, J. Ozone therapy: A clinical review. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 66-70, 2011.
- ENHORNING, G.; HOLM, B. A. Disruption of pulmonary surfactant's ability to maintain openness of a narrow tube. **J Appl Physiol**, v. 74, n. 6, p. 2922–2927, 1 jun. 1993.
- ERŐS, G. et al. Oral phosphatidylcholine pretreatment alleviates the signs of experimental rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 2, p. R43, 2009.
- ESCRIBÁ, P. V. Membrane-lipid therapy: A new approach in molecular medicine, **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 34-43, 2006.

- ESCRIBÁ, P. V. et al. Membranes: A meeting point for lipids, proteins and therapies: Translational Medicine. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 3, p. 829-875, 2008.
- ESCRIBÁ, P. V. et al. Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. **Progress in Lipid Research**, v. 59, p. 38–53, jul. 2015.
- ESCRIBA, P. V et al. Role of membrane lipids in the interaction of daunomycin with plasma membranes from tumor cells: implications in drug-resistance phenomena. **Biochemistry**, v. 29, n. 31, p. 7275–7282, 1990.
- ESCUISSATO, D. L. et al. Metastase de cancer gastrico simulando NEOPLASIA PRIMÁRIA DE PULMÃO – RELATO DE CASO E REVISÃO DA LITERATURA. **Radiologia Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 121–124, 2002.
- FERREIRA, A. K. et al. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 6, p. 481–487, jul. 2013.
- FUJIMURA, T.; MAHNKE, K.; ENK, A. H. Myeloid derived suppressor cells and their role in tolerance induction in cancer. **Journal of Dermatological Science**, v. 59, n. 1, p. 1–6, jul. 2010.
- FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871–1875, 30 nov. 2001.
- GAJATE, C. et al. Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. **Oncogene**, v. 31, n. 21, p. 2627–39, 24 maio 2012.
- GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science (New York, N.Y.)**, v. 212, n. 4490, p. 56–8, 3 abr. 1981.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation**Cell, 2011.
- HARIZI, H. et al. Prostaglandins Inhibit 5-Lipoxygenase-Activating Protein Expression and Leukotriene B4 Production from Dendritic Cells Via an IL-10-Dependent Mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 139–146, 1 jan. 2003.

- HENDRICH, A. B.; MICHALAK, K. Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells. **Current drug targets**, v. 4, n. 1, p. 23–30, jan. 2003.
- HERBST, R. S.; HEYMACH, J. V; LIPPMAN, S. M. Molecular Origins of Cancer Lung Cancer. **N Engl J Med**, v. 359, p. 1367–80, 2008.
- HERNÁNDEZ, F.; MENÉNDEZ, S.; WONG, R. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 1, p. 115-9, 1995.
- HOLMBERG, L. et al. National comparisons of lung cancer survival in England, Norway and Sweden 2001-2004: differences occur early in follow-up. **Thorax**, v. 65, n. 5, p. 436–441, 1 maio 2010.
- HOLMES, J. Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial. **Gerodontology**, v. 20, n. 2, p. 106–114, 2003.
- INCA. Instituto Nacional do câncer. Ministério da Saúde. Estimativas 2016: Incidências de câncer no Brasil. 2015
- INCA. Instituto Nacional do câncer. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acessado: 10 de fevereiro de 2017.
- INCA. Instituto Nacional do câncer. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao>. Acessado: 10 de fevereiro de 2017.
- IRIGARAY, P. et al. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 61, n. 10, p. 640-658, 2007.
- ISHII, M. et al. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. **Blood**, v. 114, n. 15, p. 3244–3254, 8 out. 2009.
- JENKINS, D. C. et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 10, p. 4392–6, 9 maio 1995.
- KAFOURY, R. M. et al. Lipid ozonation products activate phospholipases A2, C, and D. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 150, n. 2, p. 338–49, jun. 1998.

- KAFOURY, R. M. et al. Induction of inflammatory mediators in human airway epithelial cells by lipid ozonation products. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, n. 6, p. 1934-1942, 1999.
- KAKIZAKI, A. et al. Immunomodulatory effect of peritumorally administered interferon-beta on melanoma through tumor-associated macrophages. **Oncoimmunology**, v. 4, n. 11, p. e1047584, nov. 2015.
- KERR, K. M. Leaders Pulmonary preinvasive neoplasia. **J Clin Pathol**, v. 54, p. 257–271, 2001.
- KIDA, T. et al. Prostaglandin D2 Attenuates Bleomycin-Induced Lung Inflammation and Pulmonary Fibrosis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0167729, 19 dez. 2016.
- KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, v. 121, n. 1, p. 1–14, maio 2007.
- KIMURA, T. et al. Oxidized Phospholipid, 1-Palmitoyl-2-(9'-Oxo-Nonanoyl)-Glycerophosphocholine (PON-GPC), Produced in the Lung Due to Cigarette Smoking, Impairs Immune Function in Macrophages. **Lung**, v. 190, n. 2, p. 169–182, 11 abr. 2012.
- KOLLER, D. et al. Effects of oxidized phospholipids on gene expression in RAW 264.7 macrophages: A microarray study. **PLoS ONE**, 2014.
- KOVÁCS, T. et al. Dietary Phosphatidylcholine Supplementation Attenuates Inflammatory Mucosal Damage in a Rat Model of Experimental Colitis. **Shock**, v. 38, n. 2, p. 177–185, ago. 2012.
- KUMAR, V. et al. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 3, p. 208–220, 2016.
- KUROSAKA, K. et al. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 9, p. 4672–4679, 1 nov. 2003.
- LEE, A. G. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1666, p. 62-87. 2004.
- LEITINGER, N. Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, p. 1063-71, 2005.
- LEWIS, C. E.; POLLARD, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. **Cancer research**, v. 66, n. 2, p. 605–12, 15 jan. 2006.

- LEWIS, J. F.; JOBE, A. H. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. **The American review of respiratory disease**, v. 147, n. 1, p. 218–33, jan. 1993.
- LI, L. et al. iNOS-derived nitric oxide promotes glycolysis by inducing pyruvate kinase M2 nuclear translocation in ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 33047–33063, 15 maio 2017.
- LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 823-837, 2009.
- MA, J. et al. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. **BMC cancer**, v. 10, n. 112, p. 1-9, 2010.
- MALTA, D. C. et al. Lung cancer, cancer of the trachea, and bronchial cancer: mortality trends in Brazil, 1980-2003\*. **J Bras Pneumol**, v. 33, n. 5, p. 536–543, 2007.
- 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, 2002.
- MANTOVANI, A. et al. Macrophage Polarization Comes of Age. **Immunity**, v. 23, n. 4, p. 344–346, 2005.
- MARATHE, G. K. et al. Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 40, p. 28395-404, 1999.
- MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 453–61, 1 jan. 2008.
- MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 451–483, abr. 2009.
- MARTÍNEZ, J. et al. Membrane structure modulation, protein kinase C alpha activation, and anticancer activity of Minerval. **Molecular pharmacology**, v. 67, n. 2, p. 531–40, 2005.
- MATOBA, S. et al. p53 regulates mitochondrial respiration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, n. 5780, p. 1650–3, 16 jun. 2006.

- MIKIROVA, N. et al. Erythrocyte membrane fatty acid composition in cancer patients. **Puerto Rico health sciences journal**, v. 23, n. 2, p. 107–113, jun. 2004.
- MOLLINEDO, F. et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). **Cancer research**, v. 57, n. 7, p. 1320–8, 1 abr. 1997.
- MORRISSETTE, N.; GOLD, E.; ADEREM, A. The macrophage – a cell for all seasons. **Trends in Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 199–201, maio 1999.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MULLER, C. B. et al. Bioinformatics approach for the validation of non-small cell lung cancer biomarkers. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 46–50, 2011.
- MURATA, T. et al. Role of prostaglandin D<sub>2</sub> receptor DP as a suppressor of tumor hyperpermeability and angiogenesis in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 50, p. 20009–20014, 16 dez. 2008.
- MURATA, T. et al. Prostaglandin D<sub>2</sub> is a mast cell-derived antiangiogenic factor in lung carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 49, p. 19802–19807, 6 dez. 2011.
- NAKANISHI, Y. et al. Inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) suppressed the proliferation and differentiation of human leukaemia cell lines. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 37, n. 12, p. 1570–8, ago. 2001.
- NAKANISHI, Y. et al. COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin/+ mouse polyps. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 9, p. 1333–1339, 1 set. 2011.
- NATHOO, N.; BARNETT, G. H.; GOLUBIC, M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. **Journal of clinical pathology**, v. 57, n. 1, p. 6-13, 2004.
- NAVAB, M. et al. The Yin and Yang of Oxidation in the Development of the Fatty Streak. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 16, p. 831-842, 1996.
- NICOLINI, A.; CARPI, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 17, n. 5, p. 325–337, out. 2006.

- NIEMAN, G. F. et al. Alveolar function following surfactant deactivation. **Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**, v. 51, n. 4, p. 895–904, out. 1981.
- NOVAES, F. T. et al. Câncer de pulmão: histologia, estágio, tratamento e sobrevida. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 8, p. 595–600, ago. 2008.
- NUMATA, M.; KANDASAMY, P.; VOELKER, D. R. Anionic pulmonary surfactant lipid regulation of innate immunity. **Expert review of respiratory medicine**, v. 6, n. 3, p. 243–6, 2012.
- OBEID, E. et al. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). **International journal of oncology**, v. 43, n. 1, p. 5–12, 14 jul. 2013.
- ÖBERG, M. et al. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: A retrospective analysis of data from 192 countries. **The Lancet**, v. 377, n. 9760, p. 139–146, 2011.
- OBERLE, C.; MASSING, U.; KRUG, H. F. On the mechanism of alkylphosphocholine (APC)-induced apoptosis in tumour cells. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 3, p. 237–245, 1 jan. 2005.
- OHRI, C. M. et al. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. **European Respiratory Journal**, v. 33, n. 1, p. 118–126, 1 jan. 2009.
- OSTUNI, R. et al. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 4, p. 229–239, abr. 2015.
- PETERS-GOLDEN, M. et al. Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2002.
- POLLARD, J. W. Opinion: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 1, p. 71–78, jan. 2004.
- PUHAKKA, A. et al. High expression of nitric oxide synthases is a favorable prognostic sign in non-small cell lung carcinoma. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 111, n. 12, p. 1137–46, dez. 2003.

- QUATROMONI, J. G.; ERUSLANOV, E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. **American journal of translational research**, v. 4, n. 4, p. 376–89, 2012.
- RAES, G. et al. FIZZ1 and Ym as Tools to Discriminate between Differentially Activated Macrophages. **Developmental Immunology**, v. 9, n. 3, p. 151–159, 2002.
- RAMAKRISHNA, G.; HARMS, G. F.; ERLICHMAN, C. Metastatic Non-Small Cell Lung Carcinoma With Involvement of Extremity Musculature: Case Report and Review of the Literature. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 75, n. 12, p. 1333–1337, dez. 2000.
- RAMIREZ-MONTAGUT, T. et al. Immunity to melanoma: unraveling the relation of tumor immunity and autoimmunity. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3180–3187, 2003.
- RAMPRECHT, C. et al. Toxicity of oxidized phosphatidylcholines in cultured human melanoma cells. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 189, p. 39-47, 2015.
- RILEY, J. S. et al. Prognostic and therapeutic relevance of FLIP and procaspase-8 overexpression in non-small cell lung cancer. **Cell death & disease**, v. 4, p. e951, 2013.
- ROMANO, M. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 14, p. 1986–1995, 1 nov. 2003.
- ROSS, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. **Am Hear J**, v. 138, p. 419-420, 1999.
- SAHIBZADA, H. A. et al. Salivary IL-8, IL-6 and TNF- $\alpha$  as Potential Diagnostic Biomarkers for Oral Cancer. **Diagnostics**, v. 7, n. 2, p. 21, 2017.
- SANGHA, R.; PRICE, J.; BUTTS, C. A. Adjuvant therapy in non-small cell lung cancer: current and future directions. **The oncologist**, v. 15, n. 8, p. 862–872, 2010.
- SANTROCK, J.; GORSKI, R. A.; O’Gara, J. F. Products and mechanism of the reaction of ozone with phospholipids in unilamellar phospholipid vesicles. **Chem. Res. Toxicol**, v. 5, n. 1, p. 134-141, 1992.
- SCHMIDT, R. et al. Altered fatty acid composition of lung surfactant phospholipids in interstitial lung disease. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 5, p. L1079–L1085, 2002.

- SCHWARTZ, A. G. et al. The molecular epidemiology of lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 507-18, 2007.
- SETHI, G. et al. Multifaceted link between cancer and inflammation. **Biosci. Rep**, v. 32, p. 1–15, 2012.
- SHIER, W. T. Inhibition of prostaglandin synthesis by lysotecithin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 78, n. 4, p. 1168–1174, 1977.
- SHIM, H. S. et al. Histopathologic characteristics of lung adenocarcinomas with epidermal growth factor receptor mutations in the international association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society lung adenocarcinoma classification. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 135, n. 10, p. 1329-1334, 2011.
- SHUREIQI, I. et al. 15-LOX-1: a novel molecular target of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in colorectal cancer cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 14, p. 1136–1142, 2000.
- SHUREIQI, I.; LIPPMAN, S. M. Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis. **Cancer research**, v. 61, n. 17, p. 6307–12, 1 set. 2001.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.
- SILVA, V. A. DA et al. Hamartoma pulmonar como diagnóstico diferencial de metástase de carcinoma de mama: relato de caso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 6, p. 738–742, dez. 2007.
- SILVESTRI, G. A.; SPIRO, S. G. Carcinoma of the bronchus 60 years later. **Thorax**, v. 61, p. 1023–1028, 2006.
- SOMASUNDARAM, A.; BURNS, T. F. The next generation of immunotherapy: keeping lung cancer in check. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 87, 24 dez. 2017.
- SORGI, C. A. et al. GM-CSF Priming Drives Bone Marrow-Derived Macrophages to a Pro-Inflammatory Pattern and Downmodulates PGE2 in Response to TLR2 Ligands. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40523, 13 jul. 2012.
- SQUADRITO, G. L.; SALGO, M. G.; FRONCZEK, F. R.; Pryor, W. A. Synthesis of inflammatory signal transduction species formed during ozonation and/or peroxidation of tissue lipids. **Methods Enzymol**, v. 319, p. 570-582, 2000.

- STABLES, M. J.; GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 1, p. 35–51, jan. 2011.
- STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. Lipoproteins, Lipoprotein Oxidation and Atherogenesis. Chien KR. editor Philadelphia: Saunders Revised edition. 2003.
- UHLSON, C. et al. Oxidized Phospholipids Derived from Ozone-Treated Lung Surfactant Extract Reduce Macrophage and Epithelial Cell Viability. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 7, p. 896–906, jul. 2002.
- VERONEZ, L. C. **Atividade Da Fosfoetanolamina Sintética Em Melanoma Murino Experimental**. 2012. 81 f. *Dissertação* (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto.
- VIEBAHN-H, R. The Use of Ozone in Medicine. p. 1–28, 2003.
- VINK, S. R. et al. Rationale and clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 2, p. 191-202, 2007.
- VOGL, T. et al. Regional chemotherapy of the lung: Transpulmonary chemoembolization in malignant lung tumors. **Seminars in Interventional Radiology**, v. 30, n. 2, p. 176-184, 2013.
- VOGLER, O. et al. The G $\beta\gamma$  dimer drives the interaction of heterotrimeric G proteins with nonlamellar membrane structures. **J. Biol. Chem**, v. 279, n. 35, p. 36540–36545, 2004.
- WANG, G. F. et al. Histological types and significance of bronchial epithelial dysplasia. **Modern Pathology**, v. 193800553, p. 429–437, 2006.
- WANG, X. et al. Co-expression of COX-2 and 5-LO in primary glioblastoma is associated with poor prognosis. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 125, n. 2, p. 277–285, 2015.
- WHO. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon. 2004.
- WHO. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acessado: 02 de fevereiro de 2017.

- WILLIAMS, C. S.; SMALLEY, W.; DUBOIS, R. N. Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 6, p. 1325–1329, 15 set. 1997.
- WRIGHT, J. R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 1, p. 58–68, 2005.
- WRIGHT, S. M. et al. Altered airway surfactant phospholipid composition and reduced lung function in asthma. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 89, n. 4, p. 1283–1292, 2000.
- YAO, Y. et al. Exogenous phosphatidylethanolamine induces apoptosis of human hepatoma HepG2 cells via the bcl-2/Bax pathway. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 15, n. 14, p. 1751–8, 2009.
- ZHANG, B. et al. M2-polarized macrophages promote metastatic behavior of Lewis lung carcinoma cells by inducing vascular endothelial growth factor-C expression. **Clinics**, v. 67, n. 8, p. 901–906, 14 ago. 2012.
- ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. et al. Tumor necrosis factor in human monocyte-mediated antitumor cytotoxicity. **Natural immunity and cell growth regulation**, v. 7, n. 5–6, p. 280–6, nov. 1988.
- ZWAAL, R. F. .; COMFURIUS, P.; BEVERS, E. M. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1636, n. 2–3, p. 119–128, mar. 2004.

## ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Campus de Ribeirão Preto**  
*Comissão de Ética no Uso de Animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 13.1.490.53.3), intitulado "Formação de corpúsculos lipídicos e produção de eicosanoides em macrófagos derivados de medula óssea ativados pela via clássica / alternativa: atividade associada à tumores", de autoria de **Rodrigo Ferreira Scanduzzi e Carlos Artério Sorgi**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07/10/2013.

**Colaboradores: Lúcia Helena Faccioli**

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.490.53.3), entitled: "Formação de corpúsculos lipídicos e produção de eicosanoides em macrófagos derivados de medula óssea ativados pela via clássica / alternativa: atividade associada à tumores", by **Rodrigo Ferreira Scanduzzi and Carlos Artério Sorgi** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, October, 7 2013.

Ribeirão Preto, 08 de outubro de 2013.

Presidente da CEUA  
 Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretária da CEUA  
 Vanessa Bombonato Garcia