



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

NATHALIA MORAES DE VASCONCELOS

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O INFLAMASSOMA NLRP3 E  
AS PROPRIEDADES TUMORAIS NO CÂNCER DE MAMA

Brasília

2013

NATHALIA MORAES DE VASCONCELOS

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O INFLAMASSOMA  
NLRP3 E AS PROPRIEDADES TUMORAIS NO CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José R. Corrêa

Co-Orientador: Prof. Dra. Kelly G.  
Magalhães

Brasília

2013

NATHALIA MORAES DE VASCONCELOS

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE O INFLAMASSOMA  
NLRP3 E AS PROPRIEDADES TUMORAIS NO CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Presidente)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Barretto Motoyama (Membro Efetivo)

---

Prof. Dr. Márcio Poças (Membro Efetivo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcella Lemos B. Carneiro (Membro Suplente)

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha família, pelo apoio incondicional que sempre recebi. À minha mãe, que com seu exemplo e palavras de consolo, além das puxadas de orelha nas horas necessárias, definiu o que sou hoje, pessoalmente e academicamente. Às minhas irmãs, Lilian e Marcela, cada uma de um jeito e cada uma de uma área, mas que são meus amores incondicionais. Ao meu padrasto, um grande suporte familiar. Ao meu pai e madrasta, que mesmo estando longe, sempre estiveram por perto para celebrar e apoiar todas as etapas até esse momento. Ao Tiago, que já considero família e que sempre esteve presente para mim, sendo durante todo o tempo meu suporte, incentivando a ir mais longe e a crescer, pessoal e profissionalmente. Muito obrigada a todos, vocês tornaram essa etapa possível!

Aos amigos mais antigos que possuo, Carol, Bárbara, Valéria e Felipe, com quem caminho junto desde a sétima série, embora cada um da sua forma. Às amigas-irmãs, Bruna e Ana Paula, que em seis meses morando juntas, desenvolvemos uma amizade para toda a vida.

Aos amigos de turma, Pedro, Nathália, Diogo, Fernanda e Isadora, que têm tornado minha vida mais prazerosa desde 2007, e que são os presentes que a Biologia me ofereceu. Espero tê-los comigo por mais vários anos, em minha vida pessoal e profissional.

Às amigas da bancada, Rafaela e Bruna, essenciais em meu desenvolvimento e aprendizado. Sei que posso contar com vocês sempre, e saibam que é recíproco. Aos demais colegas do laboratório, pela convivência amigável durante esses anos. Em especial, à Núbia e Yasmin, colegas também de grupo, e à Ingrid, Rachel, Márcia, Mariana e Misléia. Todas tornaram esse ambiente muito especial com suas amizades.

Aos colegas do Laboratório de Virologia, que não só aturaram todas as perguntas e usos de equipamentos, mas sempre se dispuseram a ajudar.

À Prof. Anamélia Bocca, que me introduziu e guiou na vida acadêmica, e ao Prof. Aldo, pela amizade. Aos membros de seus laboratórios, especialmente à Ana Camila, essencial em meu aprendizado de iniciação científica, e ao Márcio e Isaque, pela companhia na bancada nessas épocas.

Ao orientador Prof. José Raimundo Corrêa pelo tempo disposto, orientação e oportunidade. À co-orientadora Prof. Kelly Magalhães e seu laboratório, pelos ensinamentos, orientação e o tempo e reagentes dispostos.

À Universidade de Brasília e seus professores, que desde 2007 me acolhem e oferecem novas oportunidades. Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, pela oportunidade.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

## Resumo

---

O câncer de mama é o tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres em todo o mundo e o responsável pelo maior índice de morte feminina por câncer. Em modelos experimentais, a inflamação crônica foi descrita como indutora, porém alguns dados não são reproduzidos na clínica. Os inflamassomas, complexos multiprotéicos de sinalização intracelular atuantes na imunidade inata e adaptativa, vem sendo associados a funções celulares contrastantes dependendo do tipo de célula cancerígena analisada, o que também é verdade para os receptores do tipo Toll. Porém, a relação do inflamassoma NLRP3 e o câncer de mama é pouco conhecida. Considerando ainda a presença dos receptores NLRs e TLRs nas células não hematopoiéticas e, logo, a possibilidade de modulação do microambiente inflamatório pela própria célula tumoral, propôs-se analisar a presença e função do receptor NLRP3 e seu inflamassoma em células tumorais da mama *in vitro*. Foi observado que os componentes NLRP3 e ASC estão presentes em MCF7, porém há baixa expressão de ASC em MDA-MB-231. Ainda, houve ativação de caspase-1, indicando ativação do complexo, e diminuição das quantidades de proteínas NLRP3 e ASC na presença de Nigericina. A utilização de LPS e Nigericina induziu elevada morte celular em ambas as linhagens, com características como fragmentação nuclear, rompimento da membrana plasmática e PARP1 não clivado, eventos típicos da piroptose, a morte celular induzida pela ativação dos inflamassomas. Apenas a MDA-MB-231 secretou TNF $\alpha$  após as estimulações, e nenhuma das células secretou IL1 $\beta$  e IL6. Além disso, a utilização dos estímulos alterou os padrões de ciclo celular e diminuiu a taxa de proliferação em ambas as linhagens, mas não alterou o fenótipo CD24/CD44 de forma geral. O uso de sobrenadantes de monócitos estimulados para o inflamassoma NLRP3 na cultura das células de câncer de mama demonstrou efeitos fenotípicos semelhantes ao uso dos agonistas, indicando um direcionamento tumoricida dos monócitos ativados, atuando por meio de seus fatores secretados. Estes resultados sugerem que o inflamassoma NLRP3 não só está presente em células tumorais da mama, mas que sua ativação possui um efeito tumoricida, quando ocorre na própria célula tumoral ou por fatores secretados de monócitos. Essa via pode representar um novo aspecto de modulação, o qual pode ser explorado para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer de mama.

Palavras-chave: câncer de mama, inflamação, inflamassoma, NLRP3, morte celular.

## Abstract

---

Breast cancer is the most prevalent type of cancer among women worldwide and the one responsible for their major cause of cancer death. In experimental models for this cancer, chronic inflammation is particularly described as an inducer; however there is some inconsistency in the clinic. The inflammasomes, intracellular multiprotein signaling complexes related to adaptive and innate immunity, are associated with contrasting roles regarding cancer immunity, depending on the cancer analyzed, which is also true for Toll-like Receptors. However, the relationship between the NLRP3 inflammasome and breast cancer is not completely understood. Considering the non-hematopoietic presence of TLRs and NLRs and, therefore, the possible generation of an inflammatory microenvironment by the tumor cells itself, we proposed to study the presence and function of the NLRP3 receptor and its inflammasome in breast tumor cells *in vitro*. We observed that the components NLRP3 and ASC are present in MCF7 cell line, but ASC is in low amounts in MDA-MB-231. Our data suggest caspase-1 activation, indicating activation of the complex, and diminished protein amounts of NLRP3 and ASC in the presence of Nigericin. When we used LPS and Nigericin, there was cell death induction in both cell lines, with nuclear fragmentation, plasma membrane rupture and non-cleaved PARP1, typical features of pyroptosis, the inflammasome mediated cell death. Only the MDA-MB-231 cell line secreted TNF $\alpha$  after stimulation, and neither of cells secreted IL1 $\beta$  nor IL6. Also, in the presence of the stimulus, there was alteration in the cell cycle pattern and decrease in the proliferation index of both cell lines, but not in the phenotype CD24/CD44 globally. The use of supernatants from NLRP3 stimulated monocytes in the culture of breast cancer cells induced similar phenotypic events to the presence of the agonists, which indicate an antitumoral activity of the activated monocytes, functioning through its secreted factors. Our results suggest that the NLRP3 inflammasome is not only present in breast cancer cells, but its activation has a tumoricidal effect when occurring in the cancer cell or through secreted factors from monocytes. This pathway may represent a new modulation aspect, which may be further studied for the development of therapies against breast cancer.

Keywords: breast cancer, inflammation, inflammasome, NLRP3, cell death.

## Índice de Figuras

---

Figura 1. Correlação entre o desenvolvimento do tecido mamário e a células tumorais geradas.....	5
Figura 2. Relação entre o sistema imune e o desenvolvimento tumoral. ....	8
Figura 3. Domínios presentes nas proteínas formadoras dos principais inflamassomas descritos.....	11
Figura 4. Presença de componentes do inflamassoma NLRP3 em MCF7 em p.0.....	29
Figura 5. Presença de componentes do inflamassoma NLRP3 em MDA-MB-231 em p.0.....	30
Figura 6. Ativação de caspase-1 e regulação de componentes do inflamassoma NLRP3 em células de adenocarcinoma mamário em p.0.....	31
Figura 7. Uso de agonistas do inflamassoma NLRP3 não altera os padrões de secreção de citocinas pró-inflamatórias em linhagens de câncer de mama. ....	32
Figura 8. Redução na viabilidade celular e liberação de conteúdo citoplasmático de células de adenocarcinoma mamário pela estimulação com agonistas do inflamassoma NLRP3 em p.0, 24h, 48h e 72h. ....	34
Figura 9. Indução de fragmentação nuclear após estimulação com agonistas do inflamassoma NLRP3 em linhagens de adenocarcinoma mamário em p.0, 24h, 48h e 72h.....	35
Figura 10. Células de câncer mamário apresentam rompimento de membrana precoce na presença dos agonistas do NLRP3 em p.0 e 24h.....	36
Figura 11. Tratamento com agonistas do inflamassoma NLRP3 não induz a clivagem de PARP1 em células de adenocarcinoma de mama em p.0.....	37
Figura 12. O uso de agonistas do inflamassoma NLRP3 induz alterações no ciclo celular de células de câncer de mama em p.0, 24h, 48h e 72h.....	39
Figura 13. Agonistas do inflamassoma NLRP3 diminuem a proliferação celular de células de adenocarcinoma de mama em 24h, 48h e 72h.....	40
Figura 14. Secreção de citocinas pró-inflamatórias após a ativação de monócitos para o inflamassoma NLRP3.....	42

Figura 15. Indução de morte celular pela presença de sobrenadante de monócitos após a ativação do inflamassoma NLRP3 em 24h, 48h e 72h.....	44
Figura 16. Redução da proliferação celular de células tumorais da mama na presença de sobrenadantes condicionados de monócitos. ....	45
Figura 17. Influências no ciclo celular de células de adenocarcinoma mamário após o cultivo com sobrenadantes condicionados de monócitos por 24h, 48h e 72h.....	46

## Índice de Tabelas

---

Tabela 1. Efeitos do uso de agonistas do inflamassoma NLRP3 no fenótipo CD24/CD44 de células tumorais da mama.....	41
Tabela 2. Determinação do fenótipo CD24/CD44 das células tumorais da mama após o cultivo com sobrenadantes condicionados de monócitos.....	47

## Lista de Abreviaturas e Siglas

---

°C	Graus Celsius
ATP	Adenosina trifosfato
AIM2	Ausente no melanoma 2
ALDH	Aldeído desidrogenase
Apaf1	Fator ativador de protease apoptótica 1
ASC	Proteína tipo particular associada a apoptose contendo CARD
BIR	Domínio repetitivo inibidor de baculovírus
BRCA1	Proteína do tipo 1 de susceptibilidade ao câncer de mama
BRCA2	Proteína do tipo 2 de susceptibilidade ao câncer de mama
BSA	Albumina sérica bovina
CARD	Domínio de recrutamento de caspase
CD44	Agrupamento de diferenciação 44
CD24	Agrupamento de diferenciação 24
CFSE	Éster carboxifluoresceína succinimidil
CLR	Receptores de lectina tipo C
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cox2	Ciclo-oxigenase 2
DAMP	Padrões moleculares associados a danos celulares
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindole, diidrocloreto
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA	Ensaio imunoenzimático
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
ER	Receptor de estrógeno
FGF2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
FITC	Fluoresceína
HER2	Receptor de fator de crescimento epidermal humano 2
HMGB1	Proteína do grupo de alta mobilidade B1
HRP	Peroxidase de raiz-forte
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IFN- $\gamma$ R	Receptor de Interferon-gamma
IgG	Imunoglobulina G
IL1 $\alpha$	Interleucina 1 $\alpha$
IL1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
IL18	Interleucina 18
IPAF	Fator de Ativação de Protease - ICE
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Repetições ricas em leucina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo
NBD	Domínio de ligação de nucleotídeo
NF $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptores do tipo NOD
NLRP	Proteínas receptoras do tipo NOD
NOD	Proteína com domínio de oligomerização e de ligação a nucleotídeo

OD	Densitometria óptica
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PARP1	Poli [ADP-ribose] polimerase 1
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fostato salino
PE	R-ficoeritrina
PI	Iodeto de propídeo
Pro-IL1 $\beta$	Pró-interleucina 1 $\beta$
Pro-IL18	Pró-interleucina 18
PR	Receptor de progesterona
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
RAG	Genes ativadores de recombinação
RE	Retículo endoplasmático
RIG	Gene induzível por ácido retinóico
RIPK2	Proteína quinase de interação com receptor em serina/treonina 2
RIPK3	Proteína quinase de interação com receptor em serina/treonina 3
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
STAT1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
SREBP	Proteína ligante ao elemento regulador de esterol
TLA	Tampão de ligação de anexina
TLR	Receptores do tipo toll
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral

TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF
UV	Ultravioleta
WB	Western blot

# SUMÁRIO

<b>Resumo .....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas .....</b>	<b>x</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Câncer.....	1
1.2. Câncer de mama .....	4
1.3. Sistema imune e o câncer .....	6
1.4. Os inflamassomas.....	9
1.5. Receptores inatos e o câncer .....	15
1.6. Justificativa.....	16
1.7. Objetivos .....	17
<b>Objetivo Geral</b> .....	17
<b>Objetivos Específicos</b> .....	17
<b>2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>18</b>
2.1. Reagentes e equipamentos.....	18
2.2. Cultivo celular .....	19
2.3. Obtenção de monócitos .....	20
2.4. Estimulações e tratamentos .....	20
2.5. Western Blot.....	21
2.6. Imunofluorescência .....	22
2.7. Ensaio de ELISA .....	23

2.8. Detecção de caspase-1 ativa .....	23
2.9. Viabilidade celular .....	24
2.9.1. MTT.....	24
2.9.2. Liberação de LDH .....	24
2.9.3. Morte celular .....	24
2.10. Análise do conteúdo de DNA com Iodeto de Propídeo .....	25
2.11. Proliferação celular.....	26
2.12. População de células-tronco tumorais.....	26
2.13. Análises estatísticas .....	27
<b>3. Resultados.....</b>	<b>28</b>
3.1. Presença e regulação dos componentes do inflamassoma NLRP3 em MCF7 e MDA-MB-231 .....	28
3.2. Agonistas do NLRP3 induzem morte celular em MCF7 e MDA-MB-231 .....	33
3.3. Alterações no ciclo celular em MCF7 e MDA-MB-231 por agonistas do NLRP3 .....	38
3.4. Alterações na proliferação celular em MCF7 e MDA-MB-231 após agonistas do NLRP3 .....	39
3.5. Efeitos na população de células-tronco tumorais de MCF7 e MDA-MB-231 após agonistas do NLRP3.....	41
3.6. A ação do microambiente pró-inflamatório gerado pela ativação do NLRP3 de monócitos nas células de adenocarcinoma mamário .....	42
<b>4. Discussão.....</b>	<b>48</b>
<b>5. Conclusões e Perspectivas.....</b>	<b>55</b>
<b>6. Referências .....</b>	<b>56</b>
<b>7. Apêndices.....</b>	<b>62</b>

# 1. Introdução

---

## 1.1. Câncer

O termo câncer define um grupo de doenças caracterizado por uma alta e anormal taxa de proliferação celular juntamente com a falha na sequência de eventos que levam a morte celular. O conjunto de células derivado destes erros podem apresentar novas e atípicas características, como síntese de metaloproteinases, perda de adesão com as células adjacentes e migração através da matriz extracelular. Tais características dotam estas células da habilidade de invadir regiões reservadas a outros tipos celulares, alcançar a corrente sanguínea ou linfática e se estabelecer em outros tecidos distantes do tumor primário (GRIFFITHS, 2006). Hoje, o câncer é um problema de saúde pública, para o qual, a cada ano, um maior número de casos é relatado. A última estatística publicada estima que ocorreram 12,7 milhões de casos de câncer com 7,6 milhões de mortes no ano de 2008 em todo o mundo, sendo que a maioria, tanto de casos quanto de mortes, ocorreu em países em desenvolvimento (JEMAL et al., 2011). Ao mesmo tempo, embora muitos tipos de câncer estejam associados a altos níveis de desenvolvimento econômico, a quantidade de mortes por neoplasias tende a ser maior em países com menor desenvolvimento. Tal situação reflete diversos aspectos negativos em países menos desenvolvidos, que incluem desde a exposição a fatores de risco até o diagnóstico tardio da doença (JEMAL et al., 2011).

No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para os anos de 2012 e 2013 apontam que devem ocorrer 518.510 novos casos de câncer, incluindo o câncer de pele não melanoma (INCA, 2011). Assim como ocorre no mundo, dentro do Brasil podem ser encontradas divergências na incidência do câncer relacionadas ao nível de desenvolvimento econômico das regiões.

De todos os casos de câncer no mundo ocidental, 80% deles são do tipo carcinoma, ou seja, que se originam a partir de células epiteliais (FAZILATY et al., 2013). Outro grupo de tumores que de elevada representatividade é do subtipo adenocarcinoma, aqueles surgidos de células especializadas em secreção, e cujo modelo é utilizado na presente dissertação.

O câncer é um grupo de doenças multifatoriais, e hoje se entende que tanto fatores genéticos quanto ambientais, refletidos pelo estilo de vida, estão relacionados ao seu desenvolvimento. São descritas seis principais características que determinam a capacidade cancerígena de uma célula (HANAHAN; WEINBERG, 2000):

- i. Manutenção da sinalização proliferativa;
- ii. Evasão de supressores de crescimento;

- iii. Resistência à morte celular;
- iv. Imortalidade replicativa;
- v. Indução de angiogênese;
- vi. Ativação da invasão e metástase.

Tais características permitem à célula tumoral ultrapassar suas barreiras de controle celular intrínseco, as quais evitam o crescimento desordenado dos tecidos. Ainda, a capacidade de reprogramação do metabolismo celular e de evasão do sistema imune são também características intrínsecas das células tumorais, mas que atuam na sua relação com o ambiente extracelular de forma a evadi-lo (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Embora estejam descritas as características celulares do câncer, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos processos de como as células adquirem tais características em nível tecidual não são completamente compreendidos. Porém, diversos componentes e vias de sinalizações celulares já foram descritos como participantes nos processos de indução da carcinogênese e metástase. Foi descrita a ocorrência de uma hipermetilação no DNA de forma precoce no processo de carcinogênese, o que poderia contribuir para a instabilidade genética típica de células tumorais (COCK-RADA; WEITZMAN, 2013). Ainda, genes como PTGS2, EREG, MMP1, LOX, CCL5 e ANGPTL4 são descritos para o câncer de mama como promotores da sobrevivência da célula tumoral e indutores de metástase (MARINO et al., 2013). A metástase pode também ser relacionada à metilação do DNA, a qual é capaz de regular a transcrição de genes de adesão celular, invasão e angiogênese (COCK-RADA; WEITZMAN, 2013); ou ainda à ação de fatores de transcrição como o NFκB, Myc e Pdx1 por meio de mutações de perda de função em seus genes ou aumento/diminuição de suas expressões (ELL; KANG, 2013).

A teoria da tumorigênese de múltiplas etapas, visando explicar o processo de tumorigênese, previu que células potencialmente tumorais acumulem mutações e/ou alterações epigenéticas ao longo de suas divisões celulares, até que o processo culmine com a aquisição da capacidade metastática e angiogênica. Nesse sentido, por análises histopatológicas, pode-se traçar um caminho de alterações observadas, de forma que a partir de um tecido normal, podem surgir hiperplasias, depois displasias, neoplasias, com o desenvolvimento final sendo o estágio de metástase (VOGELSTEIN; KINZLER, 1993).

De fato, tal teoria é corroborada por alguns trabalhos e parece ocorrer classicamente em alguns tipos tumorais, como o câncer colorretal (GRADY; MARKOWITZ, 2002). Porém, o processo de tumorigênese de múltiplas etapas não explica todos os casos. Isso é demonstrado pelo fato de que a disseminação do exame de mamografia na população não diminuiu consideravelmente as taxas de

mortalidade do câncer de mama (SCHEDIN; ELIAS, 2004), o que indica que um câncer em estágio inicial não é necessariamente menos agressivo do que um em estágio avançado. Dentro deste contexto, estudos de microarranjo demonstraram que células de câncer de mama em estágio inicial já possuíam uma assinatura gênica típica de metástase, o que coloca em questão se a metástase seria de fato o processo final da tumorigênese ou se células com capacidade metastática já podem estar presentes desde o início do processo (VEER et al., 2002).

O progresso no entendimento da metástase ocorreu com a descrição de um pequeno grupo de células tumorais, indicado por um marcador de superfície e muito presente em carcinomas, o qual possui capacidade metastática e de transmissão de tumores entre animais, e tal grupo celular estaria relacionado ao estabelecimento do tumor de forma semelhante ao estabelecimento de um órgão (REYA et al., 2001). Tais células possuem como características principais a autorrenovação e capacidade de diferenciação, aspectos compartilhados com células-tronco e por esta razão são chamadas de células-tronco tumorais. As células-tronco tumorais podem ser intrínsecas ao tumor, estando presentes desde a sua formação, ou ainda geradas por meio de uma diferenciação denominada Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT) (BRABLETZ, 2012). Tal tipo de mudança celular induz alterações compatíveis com o descolamento da célula de seu nicho inicial. Assim, essas células seriam essenciais para o processo de metástase, pois ao passarem pela EMT, seriam capazes de deixar seu ambiente primário, trafegar durante um longo tempo na corrente sanguínea e chegar ao sítio de destino, onde ao passarem por uma nova diferenciação que possibilite seu estabelecimento no nicho metastático. As células-tronco tumorais seriam aquela minoria de células na massa tumoral as quais são capazes não só de manter suas características de autorrenovação, tumorigênese e diferenciação, mas também de adquirirem motilidade, invasividade e resistência à apoptose, o que as permite realizar a metástase (FAZILATY et al., 2013).

Para a metástase ocorrer, um processo de múltiplos passos chamado “processo invasão-metástase” precisa ser iniciado. Dessa forma, as células cancerígenas precisam primeiro se dispersar para órgãos distantes e depois se estabelecer nesses nichos. A teoria “semente-solo” de Stephen Paget de 1889 propõe que para a metástase ocorrer, mais do que uma capacidade metastática celular intrínseca, é necessário que haja um sítio favorável para tal. Ou seja, não importando se as células com potencial metastático estão presentes desde o início da progressão tumoral ou se elas se desenvolvem ao longo do processo, um microambiente favorável à metástase é essencial para seu estabelecimento (FIDLER, 2003).

## 1.2. Câncer de mama

O câncer de mama é o de maior incidência entre as mulheres em termos mundiais, sendo também para as mulheres a maior causa de óbito por neoplasias (JEMAL et al., 2011). Estima-se que, no Brasil, esse tipo de câncer tenha sido o terceiro mais incidente na população no ano de 2012, com 52.680 novos casos esperados para o ano e um risco estimado de 52 novos casos a cada 100.000 mulheres (INCA, 2011). Sua incidência aumentou em 30% entre os anos 1980 e 1990 na parte ocidental do mundo, reflexo de uma mudança nos padrões reprodutivos e do aumento da capacidade de diagnósticos (ACS, 2011).

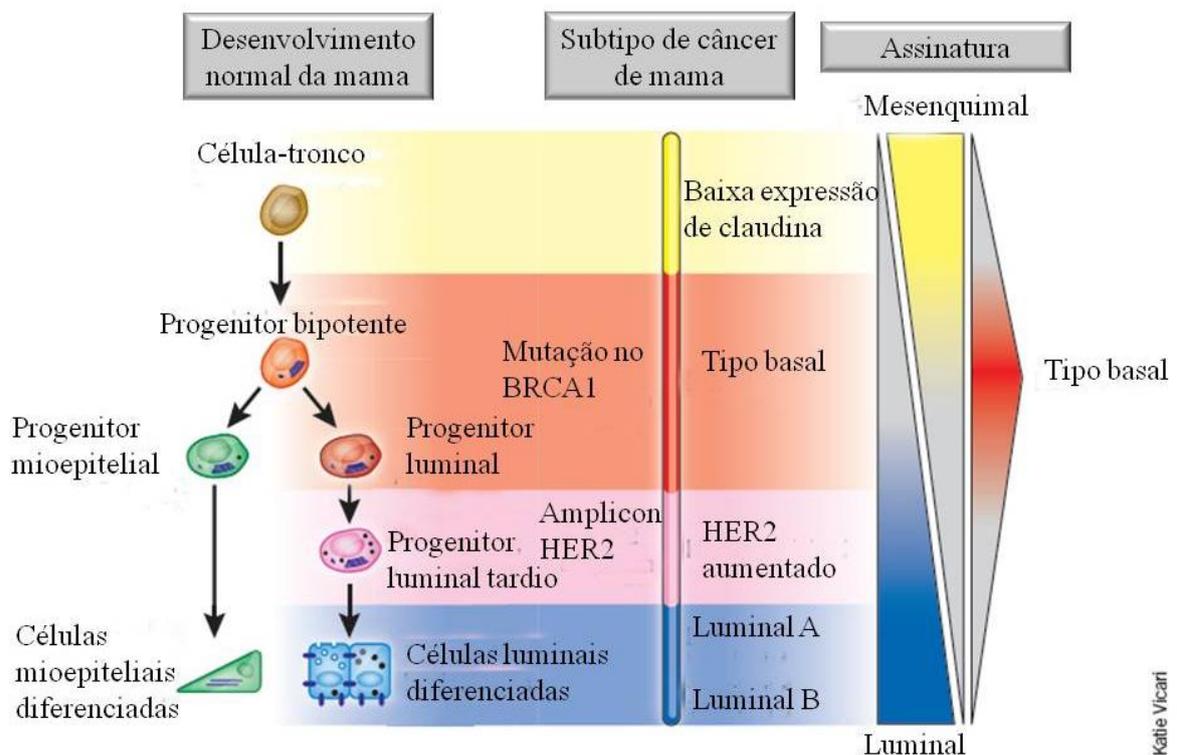
O principal fator de risco para o câncer de mama feminino é a idade avançada. Além disso, são descritos como fatores de risco mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, histórico familiar de câncer de mama, alta densidade do tecido mamário, entre outros. Características reprodutivas também estão fortemente relacionadas à ocorrência do câncer de mama. Dentre elas, possuir uma longa história menstrual, nunca ter tido filhos, uso de contraceptivos orais e ter o primeiro filho após os 30 anos de idade são fatores que aumentam as suas chances de ocorrência. Acredita-se ainda que aspectos como o uso de terapia hormonal pós-menopausa, sobrepeso, inatividade física e consumo de bebida alcoólica também estejam intimamente relacionados ao desenvolvimento do câncer de mama (ACS, 2011).

No carcinoma mamário, as células-tronco tumorais são particularmente bem descritas. Nesse tipo de câncer, os principais marcadores utilizados para a identificação de células-tronco tumorais é a presença da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) e o padrão de expressão das proteínas de superfície CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (GINESTIER et al., 2007; SUN, H. et al., 2013). Células isoladas por ambos os marcadores demonstraram possuir capacidade metastática, angiogênica e no restabelecimento de tumores heterogêneos, características típicas de células-tronco tumorais (GINESTIER et al., 2007; AL-HAJJ et al., 2003).

Classificações terapêuticas do câncer de mama podem diferenciá-lo em três principais grupos: (1) ER+, referindo-se àqueles que possuem a expressão do receptor de estrógeno (VEER et al., 2002); (2) HER2 aumentado, os quais possuem um aumento da presença do receptor do fator de crescimento epidermal humano (HER2), muitas vezes pelo aumento do número de cópias gênicas (SLAMON et al., 1987); (3) triplo negativos, os quais são negativos para o ER, PR (receptor de progesterona) e HER2 (PEROU, 2011).

Provavelmente, tais diferenças na expressão de receptores extracelulares representam tumores que surgiram a partir de células progenitoras em variados estágios de diferenciação tecidual

(PEROU, 2011). Nesse sentido, diversos trabalhos demonstram que os subtipos tumorais do câncer de mama seguem um padrão de diferenciação paralelo ao que ocorre nas células do tecido normal, e podem ser classificados em cinco grupos intrínsecos (Figura 1). Há também uma correlação entre o nível de desenvolvimento da célula progenitora no momento de sua transformação e a agressividade da doença. As linhagens celulares de câncer de mama podem ser representadas em um espectro de diferenciação epitelial e invasividade, os quais se relacionam em sentidos contrários (SOMMERS et al., 1994). Linhagens celulares que se encontram no grupo com baixa expressão de claudina possuem características do tipo mesenquimal e se encontram no que corresponde ao início da diferenciação tecidual (por exemplo, MDA-MB-231 e BT-549). Tais células são derivadas de células progenitoras menos diferenciadas e por isso não apresentam a expressão de E-caderina mas expressam vimetina. Estas populações celulares tendem a ter uma maior quantidade de células-tronco tumorais e de expressão de genes relacionados a respostas imunes, sendo também mais invasivas e metastáticas (CHAVEY et al., 2007; PRAT et al., 2010). Por outro lado, aquelas linhagens pertencentes ao grupo das células luminais possuem características epiteliais, como a expressão de E-caderina e ausência de vimetina, tendem a ser menos invasivas, havendo também um menor conteúdo de células-tronco tumorais e de genes relacionados com a resposta imune (CHAVEY et al., 2007; SOMMERS et al., 1994).



**Figura 1. Correlação entre o desenvolvimento do tecido mamário e a células tumorais geradas.** Esquema de como o surgimento de subtipos de câncer de mama pode ocorrer a partir de células progenitoras em diferentes níveis de desenvolvimento na mama normal. Adaptado de PRAT; PEROU, 2009.

Na clínica há também a correlação entre o estado de diferenciação tecidual e o prognóstico da doença, como por exemplo, aqueles pacientes cujos tumores apresentam baixa expressão de claudina, embora respondam a algumas quimioterapias, possuem pior prognóstico da doença. Por outro lado, pacientes com tumores luminais tendem a ter um prognóstico melhor (PRAT et al., 2010). Porém, observa-se uma plasticidade e heterogeneidade dos grupos intrínsecos, em suas relações com a presença e ausência de receptores, e às vezes há falhas na correlação de prognóstico por essas classificações (PARKER et al., 2009). Isso demonstra que, apesar de poder ser utilizada na escolha da terapia, a classificação por receptores engloba na realidade subgrupos diversos de doenças. De fato, foi demonstrado que mutações em vias de sinalização específicas, com as vias AKT1, KRAS e KIT, podem estar presentes ou não em subtipos de câncer de mama específicos. Porém, tais mutações ocorrem apenas em um grupo reduzido de casos e, logo, não definem todo o subtipo (SANTARPIA et al., 2012). Novas classificações moleculares para o câncer de mama reforçam essa ideia, demonstrando que cada um dos três grupos intrínsecos possui um conjunto de subclassificações moleculares (CANCER GENOME ATLAS, 2012).

### **1.3. Sistema imune e o câncer**

O microambiente tumoral é composto pelas próprias células tumorais, em proliferação, além de células do estroma tecidual, vasos sanguíneos e células do infiltrado inflamatório. Tal microambiente é dominado pelo tumor, o qual o cria e remodela a todo momento, em aspectos moleculares e celulares (WHITESIDE, 2008). Nos últimos anos, tem crescido o conhecimento sobre o importante papel das células do sistema imune. Tais células foram identificadas em cortes histológicos de secções tumorais no século XIX, por Virchow, o qual inicialmente relacionou o estado de inflamação local com o desenvolvimento neoplásico (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). Porém, ainda é debatido se o papel do sistema imune no desenvolvimento tumoral é indutor ou protetor, e tal discussão será abordada ao longo dessa dissertação.

A visão de que o sistema imune seria capaz de reconhecer e eliminar células neoplásicas, que surgem naturalmente por alterações hereditárias, foi muito debatida ao longo dos anos. Esse processo chamado de vigilância imune protegeria o organismo de desenvolvimentos neoplásicos mais frequentes e ganhou força com experimentos que demonstravam que animais com alguma deficiência no sistema imune eram mais susceptíveis ao câncer. Ficou demonstrado que camundongos que não possuem os genes RAG (Recombination-Activating Gene), importantes na maturação de linfócitos B e T, desenvolveram mais tumores, tanto os induzidos por substâncias químicas quanto os espontâneos (SHANKARAN et al., 2001) e que a presença de moléculas efetoras e sinalizadoras relacionadas ao sistema imune, como STAT1, IFN- $\gamma$  e IFN- $\gamma$ R, era

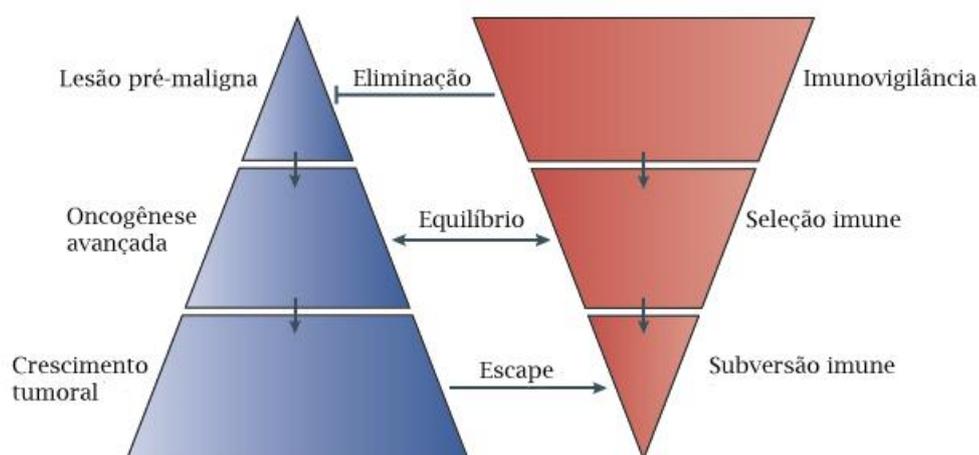
protetora na formação de tumores induzidos ou espontâneos (KAPLAN et al., 1998). Trabalhos posteriores, que visavam testar outros tipos celulares e moléculas, permitiram concluir que a vigilância imune ocorre por meio de mecanismos diversos, os quais provavelmente são ditados de acordo com o tecido e o ambiente de desenvolvimento tumoral (DUNN et al., 2002).

O mesmo evento foi observado em humanos. Por meio de estudos epidemiológicos, foi demonstrado que indivíduos possuindo algum tipo de imunossupressão são mais susceptíveis ao desenvolvimento tumoral, inclusive para os tumores independentes de infecções virais (GATTIM; GOOD, 1971). Nessa linha, o transplante de órgãos é relacionado a um maior risco de câncer, e em algum nível, isso é causado pela utilização de imunossupressores após o procedimento (CHAPMAN; WEBSTER; WONG, 2013). Ainda, estudos de pacientes com câncer demonstraram uma correlação positiva entre a presença de linfócitos na lesão tumoral e um melhor prognóstico da doença, indicando um possível papel protetor do sistema imune (CLEMENTE et al., 1996; NAITO et al., 1998).

A própria existência de casos clínicos de câncer apesar da vigilância imune e a observação de que tumores que surgem em indivíduos com alguma deficiência imune são mais imunogênicos do que aqueles que surgem em hospedeiros imunocompetentes (SHANKARAN et al., 2001) levaram a uma reanálise do papel do sistema imune na tumorigênese. Hoje, tem-se que o sistema imune possui um papel dualístico no estabelecimento do tumor, em um processo chamado de imunoeedição do câncer (DUNN et al., 2002; VESELY et al., 2011). Nesse processo, o sistema imune é responsável por inicialmente prevenir o câncer, matando células muito imunogênicas. Entretanto, as células transformadas com baixa imunogenicidade tendem a permanecer, de forma que há uma seleção das células tumorais. A imunoeedição do câncer é um processo composto de três passos:

- i. A fase de eliminação, em que pela imunovigilância o sistema imune elimina células neoplásicas;
- ii. A fase de equilíbrio, onde caso o tumor não tenha sido totalmente extinguido na fase anterior, há uma seleção Darwiniana das células tumorais;
- iii. A fase de escape, onde ocorre o aparecimento clínico do câncer.

Assim, o sistema imune não apenas protege os indivíduos contra o câncer, mas também molda o fenótipo das células do tumor em desenvolvimento (DUNN et al., 2002; VESELY et al., 2011).



**Figura 2. Relação entre o sistema imune e o desenvolvimento tumoral.** A figura relata como o desenvolvimento tumoral surge a partir de uma relação entre aspectos intrínsecos às células tumorais, como alterações genéticas e/ou epigenéticas que levam à progressão tumoral, e aspectos extrínsecos ao tumor, no caso as ações do sistema imune. Adaptado de ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006.

Além de atuar via imunovigilância, com ação especialmente das células imune adaptativas, o sistema imune também pode influenciar o desenvolvimento local do câncer pela inflamação e suas ações inatas. Sabe-se que a inflamação crônica está relacionada ao desenvolvimento de diversas doenças multifatoriais, como a diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e a asma (SCRIVO et al., 2011). Nessas doenças, a instalação da inflamação parece ser consequência de um desequilíbrio da homeostase e mau funcionamento do tecido. Como esses estímulos inflamatórios não são tão fortes quanto a presença de infecção ou dano, tal inflamação gerada é mais branda (MEDZHITOV, 2008). No caso do câncer, estudos epidemiológicos estimam que 15% dos casos de tumores malignos no mundo sejam associados à presença de infecções no local (MANTOVANI et al., 2008) e acredita-se que os mesmos eventos imunes que levam à imunoedição, e potencialmente à deleção do tumor, podem também criar um ambiente inflamatório favorável ao seu desenvolvimento. Nesse processo paradoxal do câncer, os processos de inflamação crônica tumorigênica e a imunovigilância podem ocorrer no mesmo tumor e no mesmo local, embora se entenda que sejam temporalmente diferentes (COUSSENS; WERB, 2002; VESELY et al., 2011).

No microambiente tumoral, tanto células do sistema imune adaptativo – como linfócitos T, células dendríticas e linfócitos B – quanto células do sistema imune inato – como macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e, mais raramente, células NK – podem ser encontradas de acordo com o tipo de tumor e a região tumoral. Tais células podem contribuir para a progressão tumoral ou interferir com seu desenvolvimento, e a presença das células imunes, suas quantidades, fenótipos e distribuições estariam relacionados ao prognóstico da doença (WHITESIDE, 2008). Por um lado, a

presença de linfócitos T com orientação Th1 e células dendríticas de forma organizada dentro do tumor parece estar relacionada a um melhor prognóstico do câncer colorretal, em diferentes estágios da doença. Isso sugere que para o câncer colorretal, o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente é necessário para o controle da doença (CAMUS et al., 2009). Por outro lado, no câncer de mama, a presença de macrófagos no microambiente tumoral, os quais geralmente são relacionados a um perfil anti-inflamatório e pró-angiogênico é relacionada a um pior prognóstico (LEEK et al., 1996).

Porém, há evidências conflitantes quanto às vantagens ou desvantagens do infiltrado inflamatório em alguns tipos tumorais, como o câncer de próstata e pulmão. Tal fato pode ser resultado de variados tipos de análises, de diferenças no número, localização e tipo celular imune e da observação de características tumorais diversas (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002; DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; WHITESIDE, 2008). Entretanto, tal fato indica que ainda há a necessidade de mais estudos nessa área.

#### **1.4. Os inflamassomas**

No contexto da inflamação, a descoberta dos receptores de reconhecimento da imunidade inata e de suas atividades tem levado a novos entendimentos acerca da resposta imune. Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) são capazes de se ligar seletivamente a moléculas conservadas tipicamente associadas a patógenos (PAMPs), como peptidoglicano e RNA de fita dupla, ou a moléculas associadas ao dano celular do hospedeiro (DAMPs), como ATP extracelular, DNA próprio e cristais de urato monossódico. São descritos quatro grandes famílias de PRRs, sendo elas: receptores do tipo Toll (TLRs), receptores de lectina tipo C (CLRs), receptores do tipo RIG-I e receptores do tipo NOD (NLRs) (DAVIS; WEN; TING, 2011).

Os NLRs são um grupo de proteínas codificadas em humanos por 22 genes, o qual pode ser dividido em três subfamílias: NOD, NLRP e IPAF (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Proteínas pertencentes ao grupo dos NLRs são receptoras intracelulares com três domínios característicos. Em sua região N-terminal, os NLRs podem possuir um domínio pirina (PYD) ou um domínio de recrutamento de caspase (CARD) ou ainda um domínio repetido inibidor de baculovírus (BIR), e tal característica é utilizada na subclassificação desses receptores. A única exceção é a proteína NLRX1 cuja região N-terminal, embora não possua alinhamento com esses domínios, possui uma conformação tridimensional similar. Os domínios presentes na região N-terminal estão relacionados ao recrutamento de moléculas efetoras na via de sinalização. Na região central dos NLRs, o domínio NBD (domínio de ligação de nucleotídeo) é responsável pela atividade dNTPase, e se liga

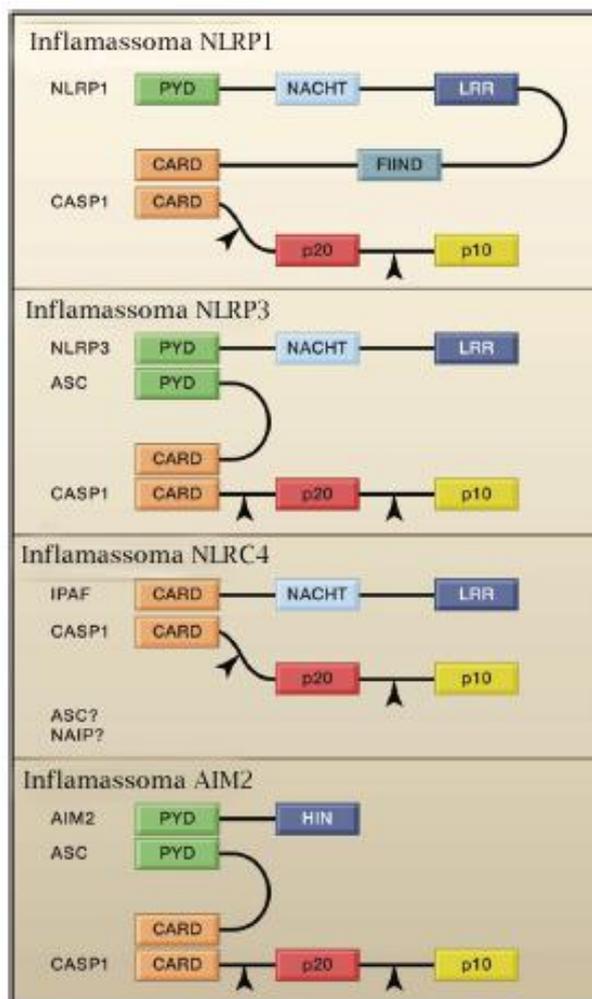
especificamente ao ATP. A região C-terminal é composta por um domínio de repetições ricas em leucina (LRRs) (DAVIS et al., 2011).

Há duas vias de sinalização associadas aos NLRs. A primeira, descrita com os receptores NOD1 e NOD2, ocorre pela interação com RIP2 e desencadeia a via do NF- $\kappa$ B e MAPK. A segunda via conhecida dos NLRs leva à montagem do inflamassoma e à ativação da caspase-1 (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; WILMANSKI; PETNICKI-OCWIEJA; KOBAYASHI, 2008).

O inflamassoma é um complexo macromolecular relacionado ao apoptossoma, e ambos possuem estruturas moleculares e mecanismos de ativação semelhantes. A formação do inflamassoma ocorre após a ativação dos NLRs por meio de suas interações homotípicas com moléculas adaptadoras e efetoras, a ASC e a procaspase-1 respectivamente. O recrutamento da procaspase-1, tanto por ligação à ASC quanto por ligação ao NLR diretamente, causa uma catálise por aproximação, gerando as subunidades catalíticas da caspase1, p20 e p10 (LAMKANFI; WALLE; KANNEGANTI, 2011).

A caspase-1 é uma proteína pertencente à família das caspases, as quais utilizam a cisteína presente em seus sítios ativos para a clivagem de outras proteínas em um sítio após resíduos de aspartato. As caspases existem na forma inativa no citosol, como zimogênios, e são ativadas pela clivagem por outras caspases. De forma geral, a família das caspases pode ser dividida em apoptóticas, como as caspases-3, -7 e -8, e inflamatórias, como as caspases-1 e -11 (MIAO; RAJAN; ADEREM, 2011). A atividade mais descrita para a caspase-1 ativa é a clivagem da pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL18, de forma que a via de sinalização dos NLRs pelo inflamassoma culmina com a secreção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 ativas. Para essa via ocorrer, as moléculas pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18 precisam estar anteriormente presentes no citoplasma celular, e a produção dessas pró-citocinas é dependente de um primeiro sinal via NF- $\kappa$ B, o qual pode ser induzido por sinalização via TLRs ou via TNF. Esse primeiro sinal também é descrito como um promotor da expressão de outros componentes do inflamassoma (DAVIS; WEN; TING, 2011).

Há um grande número de receptores NLRs associados à montagem do inflamassoma, porém apenas poucos foram fisiologicamente descritos, dentre eles os inflamassomas de NLRP3, NLRP1 e NLRC4 (AGOSTINI et al., 2004; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; POYET et al., 2001). A proteína AIM2, embora não estruturalmente relacionada aos NLRs e pertencente à família HIN-200, também foi descrita como formadora de inflamassomas (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2009).



**Figura 3. Domínios presentes nas proteínas formadoras dos principais inflamassomas descritos.** Imagem ilustrativa dos domínios presentes nas proteínas formadoras dos inflamassomas NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2. A figura demonstra as interações homotípicas que ocorrem entre as proteínas formadoras dos inflamassomas. PYD representa o domínio pirina; NACHT indica o domínio de ligação a nucleotídeo; LRR representa as repetições ricas em leucina; FIIND indica o domínio com função a ser descoberta; HIN indica domínio de expressão hematopoiética, induzível por interferon, de localização nuclear. As setas pretas demonstram os sítios de clivagem da caspase-1 após a interação, gerando a subunidade p20 e a subunidade p10. Adaptado de SCHRODER; TSCHOPP, 2010.

Os receptores NLRs formadores de inflamassomas são importantes no reconhecimento de PAMPs e DAMPs intracelulares e na geração de uma resposta imune correspondente. Nesse sentido, atuam de diversas formas quanto ao reconhecimento e tipo de molécula reconhecida. O NLRP1 é ativado na presença da toxina letal de *Bacillus anthrax* (FAUSTIN et al., 2007; LIAO; MOGRIDGE, 2009). A proteína AIM2 se liga a DNA de fita dupla, e acredita-se que esse inflamassoma detecta a presença citosólica do dsDNA (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2009). O

NAIP5, uma das isoformas do gene Naip presente em camundongos, foi recentemente estabelecido como um sensor de flagelina de bactérias como a *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium* e *Yersinia enterocolitica* (KOFOED; VANCE, 2011; ZHAO et al., 2011). Nesses estudos, demonstrou-se que a ativação do NAIP5 induzia uma ativação *downstream* de NLRC4 e clivagem da caspase-1. Também envolvido com a ativação do inflamassoma NLRC4 está o Naip6, também ativado por flagelina, e o Naip2, o qual é um sensor de proteína Rod do sistema excretor do tipo três (TTSS). Isso indica que o NLRC4, antes entendido como um receptor de inflamassoma, deve ser visto como um adaptador, semelhante à ASC, por meio do qual é transmitido o sinal de diversos inflamassomas à caspase-1. Em humanos, em que só há uma isoforma do Naip, essa se assemelha ao Naip2 e 5, sendo o receptor de uma região específica dos receptores TTSS, e ativando o inflamassoma NLRC4 à jusante (ZHAO et al., 2011).

O NLRP3, também chamado de *Cryopyrin* ou NALP3, cliva a procaspase-1 via ASC e pode ser ativado por diversos agonistas, tanto endógenos quanto exógenos, como ATP, cristais de colesterol e alumínio e a acidose extracelular (DAVIS; WEN; TING, 2011; IYER et al., 2009; LI et al., 2008; RAJAMAKI et al., 2010; RAJAMAKI et al., 2013). Da mesma forma, patógenos que entram no citosol, como *Neisseria gonorrhoeae*, o vírus influenza A e *Candida albicans* são capazes de ativar o inflamassoma NLRP3, assim estímulos físicos como a exposição à radiação ultravioleta (ALLEN et al., 2009; DUNCAN et al., 2009; FELDMEYER et al., 2007; HISE et al., 2009). Entretanto, em nenhum desses casos foi demonstrada ainda a ligação direta dessa proteína com ligantes intracelulares, o que levanta a hipótese do NLRP3 ser um sensor das condições internas. Alguns trabalhos relacionam a ativação do NLRP3 com a produção mitocondrial de ROS (ZHOU et al., 2011), embora ainda não haja uma conclusão definitiva de como todos os agonistas do NLRP3 agiriam por essa via.

Recentemente, estudos vêm mostrando que novas vias ativadas pelos inflamassomas e catalisadas pela caspase-1 não culminam com a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 e podem ser responsáveis pelo controle de infecções (LAMKANFI, 2011). Demonstrou-se que diversas proteínas da via glicolítica podem ser clivadas por caspase-1 recombinante. Por exemplo, em ensaios com a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, sua clivagem por caspase-1 levou a uma redução na atividade glicolítica, indicando um possível papel da caspase-1 na diminuição do metabolismo de células infectadas (SHAO et al., 2007). Além disso, a caspase-1 foi demonstrada como indutora da sobrevivência celular na infecção por bactérias formadoras de poros, via a ativação de fatores transcricionais como SREBP1 e SREBP2 (GURCEL et al., 2006).

Parece haver também um envolvimento entre a ativação da caspase-1 e a secreção de moléculas por uma via secretória não convencional, independente de retículo endoplasmático (RE) e aparato

de Golgi (NICKEL; RABOUILLE, 2009). Dentre as moléculas que não possuem uma sequência sinal para o RE e, logo, são secretadas de forma não-convencional, estão a IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , FGF2 e HMGB1. Também já ficou demonstrado que a interrupção da atividade da caspase-1 altera a secreção de IL-1 $\alpha$  e FGF2 em queratinócitos e fibroblastos irradiados com UV (KELLER et al., 2008). E finalmente, em outros experimentos, a ativação da caspase-1 via inflamassoma NLRP3 ou NLRC4 foi necessária para a secreção do HMGB1 (LAMKANFI et al., 2010). A via exata pela qual a caspase-1 realiza essa secreção não é conhecida, mas supõe-se que pode ser pela ativação proteolítica de um aparato de secreção desconhecido ou pela indução da piroptose, um tipo de morte celular também relacionada à ativação da caspase-1 (LAMKANFI, 2011).

A piroptose é um tipo de morte celular programada, regulada pela caspase-1. Esse tipo de morte celular foi demonstrado em macrófagos e células dendríticas, onde ocorre *downstream* à ativação dos inflamassomas. A principal característica da piroptose é a formação de poros de aproximadamente 1 a 2 nm na membrana plasmática, ocorrendo então o inchaço do citoplasma e a lise osmótica da célula (LAMKANFI, 2011). Devido ao extravasamento do conteúdo celular, esse tipo de morte inicia uma resposta inflamatória local. A piroptose possui diversas características similares à apoptose, a morte celular programada responsável pela manutenção homeostática de tecidos no organismo adulto e durante a embriogênese. Dentre essas características, pode-se citar: a condensação nuclear e fragmentação do DNA, a maturação da caspase-7 e a exposição de fosfatidilserina como um evento inicial (DEMEYERE et al., 2013; LAMKANFI, 2011; MIAO; RAJAN; ADEREM, 2011). Como características diferenciadoras entre esses dois tipos de mortes celulares está a integridade da membrana plasmática, que é mantida na apoptose porém não na piroptose, e a clivagem da enzima nuclear PARP1, evento singular à apoptose (FINK; COOKSON, 2006).

A apoptose é um tipo de morte celular que ocorre pela via de sinalização das caspases apoptóticas. A partir de um estímulo de morte, que pode ser extra ou intracelular, ocorre a montagem de oligômeros intermediários (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006). Na via intrínseca, o citocromo c liberado da mitocôndria se liga ao Apaf-1, proteína relacionada aos NLRs, culminando com a formação o oligômero apoptossoma, o qual cliva as caspases iniciadoras 8 e 9. Na via extrínseca, a sinalização por receptores de morte FAS ou TRAIL, forma-se o complexo DISC e a via também culmina com a ativação das caspases iniciadoras. Uma vez ativas, as caspases iniciadoras amplificam o estímulo de morte pela clivagem de outras caspases, principalmente as efetoras (caspase-3 e -7), as quais então clivam componentes celulares importantes para a caracterização da apoptose. Nesse tipo de morte celular não há rompimento da membrana plasmática, e em vez disso ocorre a diminuição do volume celular, a convulsão de sua superfície

celular e formação de brotamentos da membrana, que culminam com a formação de corpos apoptóticos. Por não haver extravasamento do conteúdo intracelular e porque durante o processo de morte o HMGB1 sofre oxidação, inibindo esse DAMP nuclear, as células que entram em apoptose induzem uma tolerância imunológica (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2006; FUCHS; STELLER, 2011; KAZAMA et al., 2008).

Outra função recentemente associada à caspase-1 ativa é a clivagem da caspase-7. A caspase-7 está intimamente relacionada à caspase-3 e, uma vez ativadas pelas caspases iniciadoras, ambas possuem funções muito similares na indução da apoptose. Estudos proteômicos e bioquímicos demonstraram que a caspase-7 possui um sítio de clivagem da caspase-1, e *in vivo* a caspase-7 é clivada em resposta a estímulos microbianos que induzem a ativação dos inflamassomas NLRP3 e NLRC4 (LAMKANFI et al., 2008). No entanto, a caspase-3 não sofreu clivagem em resposta a tais estímulos, demonstrando que em termos inflamatórios as caspases-3 e -7 não possuem funções equivalentes. Além disso, a clivagem da caspase-7 não foi relacionada ao processamento da proIL-1 $\beta$  e proIL-18. Estudos com macrófagos ainda demonstraram que a deficiência de caspase-7 em células infectadas por *Legionella pneumophila* causou uma menor capacidade de contenção da replicação bacteriana (AKHTER et al., 2009). Isso pode ser associado a problemas na fusão do fagossomo com o lisossomo e a uma indução tardia da morte celular do macrófago, o que demonstra a importância da presença da caspase-7 na resposta ao patógeno. Ainda, há evidências de que a caspase-7 ativada via inflamassoma NLRP3 está relacionada à clivagem do PARP1, de forma que esse fator se desliga da cromatina, expondo genes para a regulação da transcrição por NF $\kappa$ B (ERENER et al., 2012). Tal trabalho explica as diferenças entre a caspase-3 e a caspase-7 e a indução da transcrição gênica via ativação do inflamassoma NLRP3.

Estudos recentes apontam para regulações complexas envolvidas na ativação dos inflamassomas. Foi demonstrado que a IL1 $\beta$  e a IL18, embora ambas sejam clivadas pela caspase-1, podem sofrer regulações de secreção diferenciadas via NLRP3, sendo uma citocina preferencialmente secretada em condições específicas, como a secreção preferencial de IL18 na colite experimental, e isso foi demonstrado em modelos de inflamação *in vivo* (SCHMIDT; LENZ, 2012; ZAKI; BOYD; et al., 2010). Além disso, há a atuação de diferentes caspases na regulação dos inflamassomas, as quais podem estar envolvidas em diferentes níveis. A caspase-8, uma caspase tipicamente apoptótica, parece estar envolvida na regulação negativa do NLRP3, via a interação com a RIPK3, proteína associada a um tipo de morte celular chamado necroptose, o que coloca a caspase-8 como uma caspase capaz de inibir diferentes vias de ativação imune (KANG et al., 2013). A caspase-8 pode estar também relacionada à liberação de IL1 $\beta$  por meio da ativação de um inflamassoma não canônico via o sensor extracelular Dectina-1, e dessa forma atua na indução de

um ambiente pró-inflamatório em resposta a infecções fúngicas e por micobactéria (GRINGHUIS et al., 2012). A caspase-11 foi demonstrada também estar relacionada à indução de secreção de mediadores inflamatórios e desencadeamento de uma morte celular inflamatória. Embora tais vias sejam semelhantes aos inflamassomas descritos, foi demonstrado que elas ocorrem independentemente do inflamassoma NLRP3, embora possam ser relacionadas ao NLRC4 (AKHTER et al., 2012). A ativação de caspase-11 foi chamada de via dos inflamassomas não canônicos, embora ainda não seja descrita a formação de um inflamassoma em si que contenha essa caspase. Sua ativação pode estar relacionada a alterações na membrana lisossomal, talvez independentemente do reconhecimento de PAMPs ou DAMPs e foi demonstrada sua capacidade de atuar na polimerização de actina para a fusão fagossomo-lisossomos (AKHTER et al., 2012; SHIN; BRODSKY, 2013).

## **1.5. Receptores inatos e o câncer**

Os principais papéis efetores da ativação dos inflamassomas são a secreção das citocinas maduras IL1 $\beta$  e IL18 e a indução da piroptose. Tais eventos desencadeiam uma cascata local inflamatória, que pode estar relacionada à resolução de doenças causadas por patógenos, especialmente os intracelulares, mas também à indução de diversas doenças autoinflamatórias, como a febre mediterrânea familiar, gota e aterosclerose (DI VIRGILIO, 2013; SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

No câncer, os papéis são controversos para os inflamassomas. Enquanto que as citocinas IL1 $\beta$  e IL18 já haviam sido preliminarmente associadas a piores prognósticos, uma vez que induzem um ambiente inflamatório crônico (NICOLINI; CARPI; ROSSI, 2006), as funções dos inflamassomas, que estariam *upstream* dessas citocinas parecem protetoras. Em um modelo de câncer colorretal associado à colite, induzida por dextrano sulfato de sódio, foram demonstrados os papéis protetores dos inflamassomas NLRP3, NLRC4 e NLRP6. Em geral, tais induções inflamatórias estavam associadas à sinalização por IL-18 e à manutenção da integridade da barreira epitelial nesse tecido (HU et al., 2010; ZAKI; LAMKANFI; KANNEGANTI, 2011; ZAKI; VOGEL; et al., 2010). De fato, o ambiente tumoral foi relatado como um sítio com alta quantidade de ATP, o que poderia induzir a ativação do inflamassoma local, de forma que esse complexo pode ter importantes funções no estabelecimento do tumor ou em uma resposta imune contra ele.

Porém, o que chama mais atenção no que concerne a relação inflamassomas e tumores são os recentes relatos de proteínas do inflamassoma presentes em células não hematopoiéticas. Foi demonstrado que diferentes inflamassomas podem estar presentes em células da barreira epitelial do

cólon, hepatócitos e queratinócitos, onde respondem a diferentes tipos e níveis de estresse (KOPFNAGEL; WITTMANN; WERFEL, 2011; SUN et al., 2013; ZAKI; BOYD; et al., 2010). No carcinoma nasofaríngeo induzido pelo EBV, a ativação do inflamassoma NLRP3, AIM2 e RIG-I por PAMPs, DAMPs e por agentes terapêuticos foi relacionada a uma alta secreção de IL1 $\beta$  e ao recrutamento de neutrófilos, levando ao melhor prognóstico da doença (CHEN et al., 2012). Ainda, a expressão do gene AIM2 em células de câncer mamário foi relacionada à supressão de suas características tumorais, com a indução de morte celular e diminuição do crescimento *in vivo* (CHEN et al., 2006). Embora no trabalho a proteína AIM2 não tenha sido relacionada à formação do inflamassoma, pode-se levantar a questão de que esta é uma das vias de sinalização dessa proteína, e logo passível de estar envolvida nas atividades estudadas. Por outro lado, no melanoma, foi demonstrado que há ativação constitutiva do inflamassoma NLRP3 e que, quando inibido, há a redução na invasão e metástase (AHMAD et al., 2013).

De forma similar, a descrição da presença em células de carcinoma dos TLRs, essenciais para o início da sinalização do inflamassoma, é contraditória e levanta a questão sobre esses mecanismos imunes na indução ou inibição dos tumores (GALLI et al., 2013; XIE et al., 2010). Embora alguns resultados sejam controversos, tanto quanto à presença dos NLRs quanto dos TLRs, eles trazem como questão a necessidade de que mais estudos sejam realizados. Ainda, frente ao que foi apresentado quanto aos papéis da inflamação e do sistema imune de forma geral no estabelecimento de tumores, a nova possibilidade de expressão de componentes imunes pelas próprias células tumorais coloca essas células como novos focos na indução de um contexto inflamatório local e levanta questões sobre as funções do estabelecimento desse contexto inflamatório.

## **1.6. Justificativa**

Considerando a grande incidência do câncer de mama, tanto mundial quanto no Brasil, avanços no entendimento dos mecanismos de indução e proteção para esta doença podem trazer novas possibilidades para o diagnóstico precoce e para os tratamentos, o que representa um tema de grande importância para a saúde pública. Dado a importante atuação que o sistema imune pode exercer no estabelecimento e na progressão tumoral, a maior compreensão desses mecanismos pode ser essencial para os avanços das terapias. Porém até o presente momento, ainda não foi relatada a existência de algum inflamassoma ou de suas possíveis funções no câncer de mama.

No estudo das atividades celulares, a possibilidade de comparar diversos estados de diferenciação permite análises diferenciadas do processo de progressão tumoral. Nesse sentido, a utilização de linhagens de células de câncer de mama com diferentes características de

diferenciação, como a MDA-MB-231 e a MCF7 (PRAT et al., 2010), pode ajudar a compreender se há relação entre os processos inflamatórios investigados e o nível de diferenciação tecidual do tumor.

Pelo exposto, o presente trabalho se propôs a investigar a presença e função tumoral dos componentes do inflamassoma NLRP3 em células de linhagem de adenocarcinoma mamário, utilizando para isso dois tipos celulares em estágios opostos de diferenciação, células MCF7 e MDA-MB-231.

## **1.7. Objetivos**

### **Objetivo Geral**

Investigar o papel do inflamassoma NLRP3 e seu microambiente pró-inflamatório nas características tumorais no modelo adenocarcinoma mamário *in vitro*.

### **Objetivos Específicos**

- Investigar a presença e ativação dos componentes do inflamassoma NLRP3 em células MCF7 e MDA-MB-231 e o perfil inflamatório induzido.
- Analisar o papel da ativação inflamatória nessas células tumorais de mama pela análise de eventos de morte, proliferação e ciclo celular e na população de células-tronco tumorais.
- Verificar os efeitos causados pelo microambiente inflamatório via a ativação do inflamassoma NLRP3 em monócitos humanos nos eventos de morte, proliferação e ciclo celular e na população de células-tronco tumorais das células MCF7 e MDA-MB-231.

## 2. Materiais e Métodos

---

### 2.1. Reagentes e equipamentos

Para manutenção das culturas de células, foi utilizado DMEM, SFB, Tripsina 0,25% em EDTA, todos obtidos da empresa GIBCO – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. Na obtenção de PBMC, utilizou-se Histopaque e DMSO da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. Para estimulações, empregou-se LPS, ATP e Nigericina da Invivogen, San Diego, CA, EUA, e para inibição da caspase-1, o inibidor específico Ac-YVAD-Cho utilizado foi obtido da empresa Enzo Life Sciences, Inc.

Os anticorpos primários utilizados ao longo do trabalho foram: anti-ASC (SC-30135) e anti-caspase1 conjugado à FITC (SC-622) da Santa Cruz Biotechnology, Inc.; anti-NLRP3 (XA-1033) da ProSci, Loveland, CO, EUA; anti-PARP1 (abc26) da Millipore, Billerica, MA, EUA; anti- $\beta$ -actina conjugado à HRP (a3854) da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; anti-CD24-PE (MHCD2404) e anti-CD44-FITC (MHCD4401) da Molecular Probes – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-coelho conjugado à HRP (NA934V) e anti-camundongo conjugado à HRP (NA931V), ambos da GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra; IgG de cabra anti-coelho – Alexa Fluor 546 (A11010) e IgG de coelho anti-camundongo Alexa Fluor 680 (A21065), ambos da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. Como controles isotípicos, foram utilizados os anticorpos IgG1-PE (SC-2866) e IgG<sub>2b</sub>-FITC (SC-2857), ambos da Santa Cruz Biotechnology, Inc. Como marcador fluorescente nuclear, utilizou-se DAPI da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

Na análise por Western Blot, utilizou-se inibidor de protease da Boston Bioproducts e géis de SDS pré-prontos Amersham ECL Gel 4%-12%, 15 wells – GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra. A revelação foi realizada com solução SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific - Thermo Fisher Scientific, Inc), a aquisição de imagens foi por meio do equipamento Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra) e a análise realizada no programa ImageJ (NIH, EUA).

Para imunofluorescência, utilizou-se Triton x-100 e BSA da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, leite desnatado Molico e meio de montagem anti-decaimento da fluorescência, ProLong Gold da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. A análise foi realizada em Microscópio confocal de Varredura a Laser SP5 (Leica, Wetzlar, HE, Germany).

Os reagentes utilizados ao longo do trabalho foram: *kits* de ELISA da BD Biosciences, Inc. para IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$ ; FAM-FLICA *in vitro* Caspase Detection Kit da Immunochemistry

Technologies, Bloomington, MN, EUA; MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) e Iodeto de Propídeo da Molecular Probes – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay da Promega, Inc.; RNase livre de DNase, Anexina-V conjugada a FITC e CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, todos da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA.; Colchicina da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

Para leitura de absorbâncias, foi utilizado o equipamento Spectramax M5 e os dados analisados pelo programa SoftMax Pro 5.2, ambos da Molecular Devices, LLC, EUA. O citômetro de fluxo utilizado foi BD FACSCalibur, BD Biosciences, Inc., e a análise de seus dados foi realizada no programa FlowJo v.5.2.7, Tree Star, Inc. Análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc.

## **2.2. Cultivo celular**

Para analisar o efeito da ativação do inflamassoma NLRP3 no tumor de mama, foram utilizadas as células de adenocarcinoma mamário MCF7 e MDA-MB-231, fornecidas pelo Laboratório de Genética e Morfologia e Laboratório de Patologia Molecular do Câncer, ambos da Universidade de Brasília. As células foram cultivadas com meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e com 25µg/ml de gentamicina e mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

A escolha e utilização dessas linhagens ocorreu pois, uma vez que se encontram em pontos opostos na classificação de subtipos de câncer de mama, representam extremos da diferenciação tecidual. A linhagem MCF7 foi primeiramente estabelecida em 1973 da efusão pleural de uma paciente com adenocarcinoma de mama, sendo MCF-7 um acrônimo para *Michigan Cancer Foundation-7*, se referindo ao Instituto em Detroit (MI – USA) onde esta linhagem celular foi estabelecida (SOULE et al., 1973). Essa célula possui morfologia epitelial, possui positividade para o ER e é classificada como luminal, o que representa uma célula bem diferenciada, com expressão de E-caderina, e ausência de expressão de vimetina (SOMMERS et al., 1994). Nessa linhagem celular, é demonstrada a presença de células-tronco tumorais pelos marcadores CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>-</sup>, porém em pequena porcentagem, cerca de apenas 1% da população (SUN, H. et al., 2013). É relatada a ausência de expressão de caspase-3 nessa linhagem celular, o que, entretanto, não altera a capacidade de execução de apoptose nessa célula (LIANG; YAN; SCHOR, 2001).

As linhagem celular MDA-MB-231 foi estabelecida em 1978 da efusão pleural de mulheres com carcinoma de mama, e logo correspondem a células metastáticas. Elas foram descritas como

células de origem epitelial, capazes de gerar carcinomas em camundongos. São negativas para ER, com morfologia de fuso, porém distintas de fibroblastos (CAILLEAU; OLIVE; CRUCIGER, 1978). Mais tarde, com as classificações terapêuticas do câncer de mama, essas células entraram para a classificação de baixa expressão de claudina, grupo caracterizado pela baixa expressão de genes envolvidos nas adesões epiteliais célula-célula e de diferenciação luminal (PRAT et al., 2010). A linhagem MDA-MB-231 possui uma alta razão de mRNA CD44/CD24 e foram descritas como possuindo mais de 90% de células-tronco tumorais, definidas pelo marcador CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> em sua população (SUN, H. et al., 2013).

Nos ensaios, o número de células plaqueadas foi ajustado de acordo com cada desenho experimental e tempo para análise, e esse será citado nos experimentos correspondentes.

### **2.3. Obtenção de monócitos**

Na avaliação da possível influência de um microambiente inflamatório nas células de câncer de mama, foi utilizado o sobrenadante condicionado de monócitos estimulados ou não. Para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), 12ml de sangue periférico de doadoras foram coletados em tubos contendo EDTA e, em seguida, transferidos para tubos de 50ml. Cuidadosamente adicionou-se 12ml de Histopaque ao fundo dos tubos, de forma a gerar duas fases distintas. Os tubos foram centrifugados a 2500 r.p.m. por 35 minutos, com aceleração 1 e desaceleração 0. Dentre as quatro fases formadas, foi coletado o anel branco com aspecto nebuloso, o qual foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se Tampão Fosfato Salino (PBS) 1x, em quantidade suficiente para 50ml. Centrifugou-se em 1800 r.p.m. por 25min com aceleração e desaceleração 8. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em SFB, para posterior contagem e congelamento em solução de 10% DMSO em SFB. Para a obtenção de monócitos, os tubos foram descongelados e plaqueados em uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  PBMC em placas de 24 poços com 500µl de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e com 25µg/ml de gentamicina. Após uma hora em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi descartado, e o meio trocado para deixar apenas as células que aderiram.

### **2.4. Estimulações e tratamentos**

Na análise de ativação do inflamassoma nas células tumorais da mama, foi utilizado como primeiro estímulo o LPS (500ng/ml, *overnight*) e como segundo estímulo, o ATP (5mM, 4h) ou

Nigericina (20 $\mu$ M, 1h), de forma que os grupos foram nomeados LPS+ATP ou LPS+Nig, respectivamente. Como controle negativo, foram utilizadas células cultivadas apenas em meio de cultivo. O primeiro ponto de análise, logo ao fim das estimulações, foi denominado p.0. Para os pontos de análise de 24h, 48h e 72h, o meio de cultivo foi trocado no momento p.0 e as células foram mantidas em cultura pelos períodos correspondentes.

Na análise do microambiente, foram utilizados os sobrenadantes de monócitos estimulados e não estimulados. Os monócitos estimulados receberam LPS (500ng/ml) durante aproximadamente 8h, e em seguida Nigericina (20 $\mu$ M) por 1h. O meio foi trocado e, após 16 horas, este foi adicionado em uma proporção de 1:5 na cultura das células de adenocarcinoma mamário, sendo nesse momento também coletada uma alíquota para dosagem de citocinas. O sobrenadante de monócitos não estimulados foi composto apenas de DMEM suplementado e foi adicionado nas mesmas condições dos estimulados. As análises ocorreram 24h, 48h e 72h após a adição do sobrenadante condicionado à cultura de células de câncer mamário.

Para analisar os possíveis efeitos da caspase-1 no fenótipo de morte observado nas células de câncer de mama, foi utilizado o inibidor específico de caspase-1 Ac-YVAD-Cho, em concentrações de 25 $\mu$ M por uma hora na cultura antes da estimulação com a Nigericina. Como controles, foram utilizados os volumes correspondentes de DMSO.

## **2.5. Western Blot**

Para a detecção de proteínas essenciais aos inflamassomas e relacionadas à sua ativação e morte celular, lisados proteicos foram analisados por Western Blot para as proteínas ASC, NLRP3 e PARP1. A marcação da proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como controle interno.

Entre  $1 \times 10^6$  e  $2 \times 10^6$  células foram cultivadas em garrafas de cultura com 25cm<sup>2</sup> de área, com 3ml de meio de cultivo. Após estimulações, as células foram coletadas junto com seus sobrenadantes e lavadas duas vezes com PBS. Adicionou-se 50 $\mu$ l de PBS 1x com 1 $\mu$ l de inibidor de protease e 50 $\mu$ l de Tampão Laemmli 2x (100mM Tris, 4% SDS, 20% Glicerol, Azul de bromofenol, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol). As amostras foram então fervidas por 5 minutos, passadas pela agulha de uma seringa de 1ml e guardadas a -20°C.

Para o gel de SDS, géis de acrilamida pré-prontos de gradiente entre 4% e 12% foram utilizados de acordo com o indicado para o produto. O tampão Tris-Glicina (25mM Tris; 250mM Glicina; 1% SDS – pH 8,2) foi utilizado para a corrida, que ocorreu a 160V por 1h. Após a corrida, o gel foi corado para visualização de proteínas totais com azul de Comassie ou seguiu para o Western Blot (WB).

Para visualizar proteínas totais, o gel foi incubado com solução Comassie (25g Azul Brillhante Comassie R-2S0; 500ml de metanol; 400ml de água destilada; 100ml de ácido acético glacial) por uma hora em agitação e depois descorado com solução própria (500ml de metanol; 400ml de água destilada; 100ml de ácido acético glacial) *overnight*.

Para o WB, o gel foi transferido em sistema *semi-dry* entre 40 minutos e 1 hora, em 15V, utilizando membranas de nitrocelulose e solução de transferência (24mM Tris, 193 mM Glicina, 20% Metanol). As membranas foram então bloqueadas por 1 hora com 5% leite desnatado e 0,05% Tween-20 em PBS em agitação. Os anticorpos primários foram diluídos na solução de bloqueio e incubados com a membrana *overnight* a 4°C em agitação, nas seguintes diluições: 1:500 anti-ASC; 1:1000 anti-NLRP3; 1:10.000 anti-PARP1. O anticorpo contra  $\beta$ -actina é conjugado à HRP e por isso membranas para sua marcação foram mantidas em solução de 0,05% Tween-20 em PBS durante o período de marcação dos outros anticorpos primários.

As membranas foram então lavadas três vezes por 5 minutos cada com 0,05% Tween-20 em PBS e incubadas com os anticorpos secundários conjugados à HRP, diluídos em solução de bloqueio em 1:5.000. O anticorpo anti- $\beta$ -actina foi utilizado em diluição de 1:20.000. As incubações ocorreram por 1h em temperatura ambiente sob agitação. As membranas foram novamente lavadas e incubadas com proporções iguais de solução para revelação. Após a captura de imagens, a análise das quantidades de proteínas foi realizada pela normalização das intensidades das bandas de proteínas alvo para a intensidade de  $\beta$ -actina. A porcentagem demonstrada nas imagens significa a proporção de expressão proteica, tendo-se a expressão da célula não estimulada como 100%.

## **2.6. Imunofluorescência**

Para a análise de expressão das proteínas do inflamassoma NLRP3 e determinação de suas localizações celulares por microscopia de fluorescência confocal, foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células em placas de 24 poços, contendo lamínulas no interior. Após o período de estimulações (ponto p.0), as células foram fixadas com formaldeído 3,7% por 15 minutos em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, as células foram permeabilizadas com 0,2% Triton x-100 em PBS durante 20 minutos, em temperatura ambiente. Após seguinte lavagem com PBS, foi adicionada solução de bloqueio (1% de leite em pó desnatado, 2,5% de BSA, 8% de SFB em PBS) por 20 minutos em temperatura ambiente.

A proteína ASC foi marcada com anticorpo anti-ASC em diluição 1:300 e 5 $\mu$ g/ml de anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 546; a proteína NLRP3 foi marcada com anticorpo anti-NLRP3 em diluição 1:300 e 5 $\mu$ g/ml de anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 680; a

proteína Caspase-1 foi marcada com anticorpo anti-caspase1 conjugado a FITC, em diluição de 1:200. Os anticorpos foram incubados *overnight* a 4°C em câmara úmida ou por 1h a 37°C. Para visualização do núcleo, as células foram marcadas com DAPI em concentração final 300nM. A montagem das lâminas foi realizada com meio de montagem anti-decaimento da fluorescência.

## **2.7. Ensaio de ELISA**

Os níveis de citocinas inflamatórias secretadas antes e após os estímulos foram obtidos por ELISA. Para isso, foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células em placas de 24 poços em 300µl de meio de cultivo. A coleta de sobrenadantes ocorreu no ponto p.0.

Para a dosagem das citocinas IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$ , os *kits* foram utilizados com as diluições indicadas pelo fabricante. Placas de 96 poços específicas para ELISA foram sensibilizadas com anticorpo de captura em solução de *coating* (0,2M Fosfato de Sódio, pH 6,5 com 11,8g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 16,1g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; q.s.p. 1l), *overnight* a 4°C. Após lavagens, as placas foram bloqueadas por 1 hora em temperatura ambiente com solução de 10% SFB em PBS (dilúente de ensaio). Foram então adicionadas as amostras aos poços e realizadas as curvas padrões correspondentes. Após 2 horas, e realizadas as lavagens, as placas receberam o anticorpo de detecção em dilúente de ensaio, por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, a enzima Avidina-HRP em dilúente de ensaio foi adicionada por 30 minutos em temperatura ambiente. A revelação foi realizada adicionando o substrato TMB e cessada entre 5 e 15 minutos com a adição de solução de parada (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 450 nm.

## **2.8. Detecção de caspase-1 ativa**

Para quantificação da caspase-1 ativa, foi utilizado o reagente FAM-FLICA-YVAD com leitura em citômetro de fluxo. Para isso,  $1 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas de 24 poços e o reagente foi incubado em concentração final de 1x, ao mesmo tempo em que o estímulo Nigericina foi adicionado. A placa foi mantida em estufa de cultivo celular protegida da luz, durante 1h, havendo agitação a cada 10 minutos. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com tampão de apoptose 1x fornecido pelo fabricante, sendo que na segunda, o tampão foi incubado com as células a 37°C por 10 minutos. As células foram coletadas junto aos seus sobrenadantes. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em tampão de apoptose 1x para leitura. A aquisição foi no canal FL1H, em escala logarítmica, com 10.000 eventos totais.

## 2.9. Viabilidade celular

### 2.9.1. MTT

A viabilidade celular foi mensurada pela formação de cristais após a adição do reagente MTT à cultura. No ensaio,  $3 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de 96 poços. Após as estimulações e os tempos correspondentes, o sobrenadante foi substituído por MTT, em concentração final de 0,5 mg/ml, diluído em DMEM, cuja incubação ocorreu por 4h na estufa de cultivo. O sobrenadante foi descartado e os sais de formazan formados foram diluídos com DMSO. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 595nm. Para os cálculos de viabilidade, após a retirada do valor “branco” de todas as leituras, a absorbância do grupo não estimulado foi considerada como 100% e a viabilidade dos grupos experimentais foi calculada proporcionalmente.

### 2.9.2. Liberação de LDH

Para análise da lise celular, realizou-se a quantificação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase por meio do kit CytoTox 96. No ensaio, entre  $1 \times 10^4$  e  $3 \times 10^3$  células foram plaqueadas em placas de 96 poços, com 100µl de meio DMEM suplementado com 5% de SFB. Para controle positivo, células foram tratadas com solução de lise por 1 hora antes da retirada do sobrenadante.

O teste foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Basicamente, 50µl de sobrenadante foi adicionado aos 50µl de solução de substrato e incubado por 30 minutos. A reação foi parada com 25µl de solução de parada e as absorbâncias lidas em comprimento de onda de 492nm. Para cálculo da quantidade de LDH no meio, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Secreção de LDH} = \frac{OD_{492} \text{ Experimental} - OD_{492} \text{ DMEM 5\%}}{OD_{492} \text{ Lise} - OD_{492} \text{ DMEM 5\% com sol. lise}}$$

### 2.9.3. Morte celular

O tipo de morte celular induzido após os estímulos foi analisado por meio da marcação com Anexina-V e PI. Para isso, entre  $5 \times 10^4$  e  $2 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após os tratamentos, as células foram colhidas juntamente com seus sobrenadantes para coleta de células mortas na amostra. Após lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em 100 µl de Tampão de Ligação de Anexina 1x (TLA) (HEPES 10mM; NaCl 140mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5mM – pH 7,4) e 5 µl de Anexina-V-FITC e incubadas por 15 min em temperatura ambiente no escuro. Em seguida, adicionou-se 400 µl de TLA 1x contendo PI para uma concentração final de 2 µg/ml por 5 minutos em 4°C. As células foram lavadas uma vez com TLA 1x e lidas em citômetro de fluxo

imediatamente. Foram adquiridos 10.000 eventos e analisados pelas fluorescências nos canais de aquisição FL1H e FL2H em escalas logarítmicas.

Para controle experimental, células apoptóticas foram induzidas pelo uso de 1 mM de Monastrol, fornecido por parceria com Laboratório do Prof. Brenno Neto do Instituto de Química dessa universidade, por 72h. Células necróticas foram obtidas com aquecimento por 15 minutos a 65°C.

## **2.10. Análise do conteúdo de DNA com Iodeto de Propídeo**

O conteúdo de DNA celular da população foi acessado por meio da marcação com Iodeto de Propídeo (PI). Esse marcador é um intercalante de DNA, e com isso a quantidade de marcação presente na célula está relacionada à quantidade de DNA que essa célula possui. Assim, em análise por citometria de fluxo, pode-se quantificar as populações que possuem 2n de DNA, populações em G0/G1; com 4n de DNA, populações em G2/M; e as intermediárias, que estão na fase S. Ainda, aquelas células cujo DNA está fragmentado apresentam uma quantificação de fluorescência abaixo do pico G0/G1, sendo então chamadas de pico sub-G1.

Logo, com o dado de PI, foi realizada a análise do ciclo celular e o nível de fragmentação nuclear pela quantificação da população sub-G1. Para isso, foram plaqueadas entre  $5 \times 10^4$  e  $2 \times 10^5$  células por poço em uma placa de 12 poços, em 800µl de meio de cultivo e realizados os devidos tratamentos.

Com a coleta das células e seus sobrenadantes, essas foram centrifugadas por 10 minutos a 300 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 100µl de PBS. Foi adicionado 900µl de etanol 70% gelado por tubo. As amostras foram mantidas a 4°C por 2h. Então, os tubos foram centrifugados a 5000 r.p.m. por 10 minutos. Verteu-se o sobrenadante e adicionou-se 1ml de PBS. Após segunda centrifugação, as amostras foram ressuspensionadas em solução com 0,1% de Triton x-100, 100µg/ml de PI e 50µg/ml de RNase livre de DNase em PBS, e mantidas a 37°C por 10min protegidas da luz. Os tubos foram então centrifugados nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensionadas em PBS para aquisição.

Após a aquisição em citômetro de fluxo de 10.000 eventos totais no canal FL2-A em escala linear, as amostras foram analisadas em um gráfico de FL2-A por FL2-W para a exclusão de eventos em *doublets*, ou seja, aqueles que correspondem à mais de uma célula passando ao mesmo tempo pelo fotodetector. O pico sub-G1 foi analisado por meio da marcação de regiões e o ciclo celular acessado apenas na população de células vivas, em plataforma do próprio programa.

## **2.11. Proliferação celular**

Na análise de proliferação celular, as células foram marcadas com o marcador CFSE, seguindo as recomendações do fabricante. Tal marcador entra passivamente em células viáveis e, após clivagem por esterases citoplasmáticas, torna-se fluorescente. Dessa forma, a cada divisão celular, uma célula divide seu conteúdo fluorescente para as células-filhas, de forma que a cada geração há metade da fluorescência da geração anterior. Assim, pode-se acompanhar a taxa de proliferação de uma célula em cultura.

Para o ensaio,  $4 \times 10^6$  células diluídas em 1 ml de 0,1% BSA em PBS foram marcadas com  $2 \mu\text{l}$  de solução de CFSE estoque de 5mM (concentração final:  $10 \mu\text{M}$ ) por 10 minutos em  $37^\circ\text{C}$ . Após o período, 5 ml de DMEM suplementado gelado foi adicionado e as células foram incubadas por 5 minutos no gelo. As células foram lavadas mais três vezes com DMEM suplementado gelado e contadas para plaqueamento de  $5 \times 10^4$  a  $2 \times 10^5$  células em placas de 12 poços. Durante toda a cultura, as células foram mantidas no escuro.

Para controle de células que não proliferaram, células foram tratadas com colchicina  $10 \mu\text{M}$  em dois momentos: um ao fim do dia, juntamente com a estimulação do LPS; e outro pela manhã, juntamente com a adição da Nigericina. A colchicina foi mantida por uma hora na cultura, após o que o meio foi trocado e essas células foram mantidas em cultura pelo tempo experimental.

Após o tempo experimental, as células foram retiradas das placas, lavadas duas vezes com PBS e 20.000 eventos totais foram adquiridos em citômetro de fluxo, no canal FL1H com escala logarítmica. A análise dos dados foi realizada com a sobreposição das curvas e com análise de células parentais em uma plataforma específica para tal tipo de ensaio.

## **2.12. População de células-tronco tumorais**

Para determinação da população de células-tronco tumorais, utilizou-se o fenótipo  $\text{CD}24^-/\text{CD}44^+$ . Para isso, as células foram plaqueadas em quantidades entre  $5 \times 10^4$  e  $2 \times 10^5$  células em placas de 12 poços. Após os tratamentos, as células foram coletadas, lavadas com 1% BSA em PBS e marcadas com os anticorpos anti-CD24-PE e anti-CD44-FITC nas concentrações de 1:20 em 1% BSA em PBS. Os controles isotípicos foram incubados nas mesmas condições experimentais. Após 30 minutos incubando a  $4^\circ\text{C}$ , as células foram centrifugadas e adicionadas em 1% BSA em PBS para leitura no citômetro de fluxo, a qual ocorreu com a aquisição de 20.000 eventos totais, nos canais FL1H e FL2H. Os controles de aquisição para compensação do equipamento foram

realizados com PBMC marcados com ambos os anticorpos ou apenas um deles. As análises foram realizadas considerando os isotipos como negativos.

### **2.13. Análises estatísticas**

As análises dos dados foram realizadas utilizando o teste ANOVA com pós-teste Dunnet ou Bonferroni, como indicado em cada caso. Valores de  $p$  menores que 0,05 foram considerados significativos.

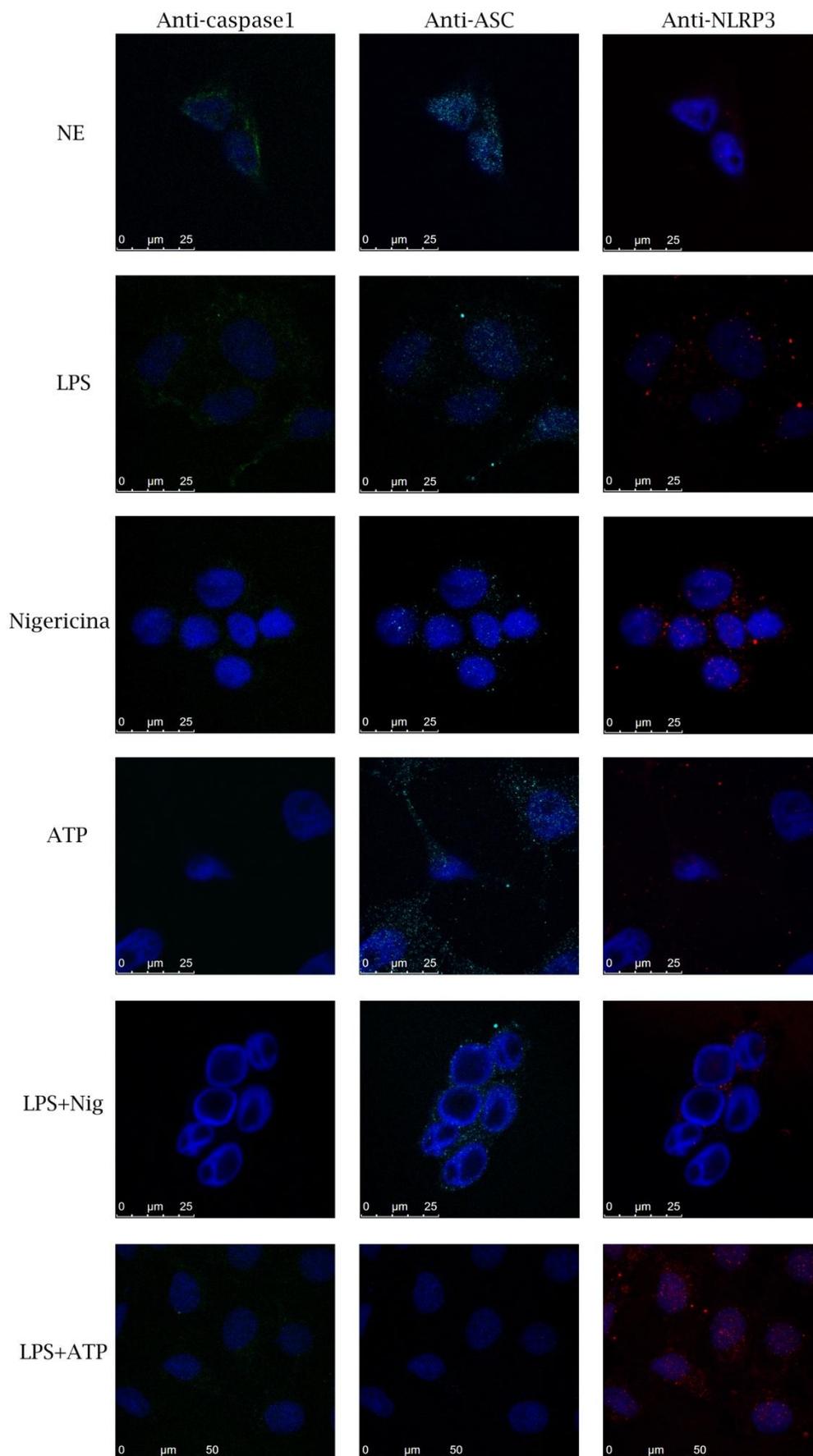
## 3. Resultados

---

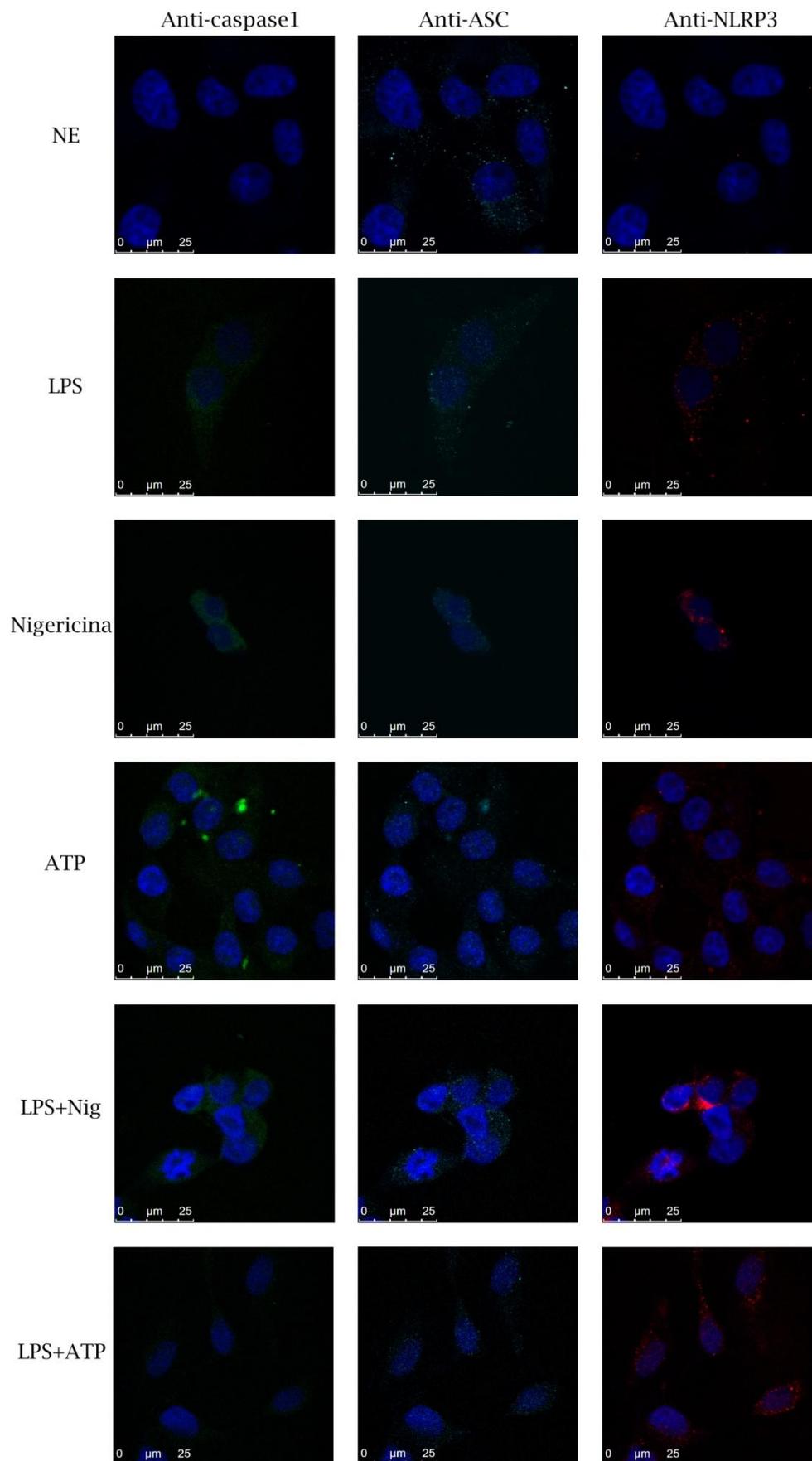
### 3.1. Presença e regulação dos componentes do inflamassoma NLRP3 em MCF7 e MDA-MB-231

Como ainda não existem relatos do inflamassoma NLRP3 em células de adenocarcinoma mamário, primeiramente se investigou a presença de seus componentes nessas células na presença de estímulos. Para uma detecção inicial dos componentes do inflamassoma por microscopia confocal, as proteínas ASC, NLRP3 e caspase-1 foram marcadas com anticorpos específicos nas células MCF7 e MDA-MB-231, estimuladas ou não com os agonistas do inflamassoma. O LPS foi utilizado como primeiro sinal e o ATP ou a Nigericina como segundo sinais. O uso de apenas LPS foi para compreender se a resposta era específica ao inflamassoma NLRP3 ou a um ambiente inflamatório, e o uso dos segundos sinais isolados visou entender se as proteínas estavam presentes sem o requerimento de primeiros sinais.

Por meio das análises foi possível inferir que na linhagem MCF7, ocorre a presença constitutiva dos componentes do inflamassoma, e o tratamento com LPS parece aumentar apenas NLRP3 (Figura 4). A presença dos agonistas Nigericina ou ATP induz a diminuição da marcação de caspase-1. Nessa linhagem, o estímulo LPS+Nigericina diminui a expressão das três proteínas marcadas, enquanto que LPS+ATP parece regular mais fortemente a caspase-1 e a ASC. Na linhagem MDA-MB-231, a presença de apenas LPS ou Nigericina ou ATP induz um aumento da expressão protéica, especialmente da proteína NLRP3 (Figura 5). De forma similar à linhagem MCF7, na MDA-MB-231, a estimulação com LPS+Nigericina diminuiu a marcação para NLRP3, e com LPS+ATP alterou a as quantidades de marcação para caspase-1.



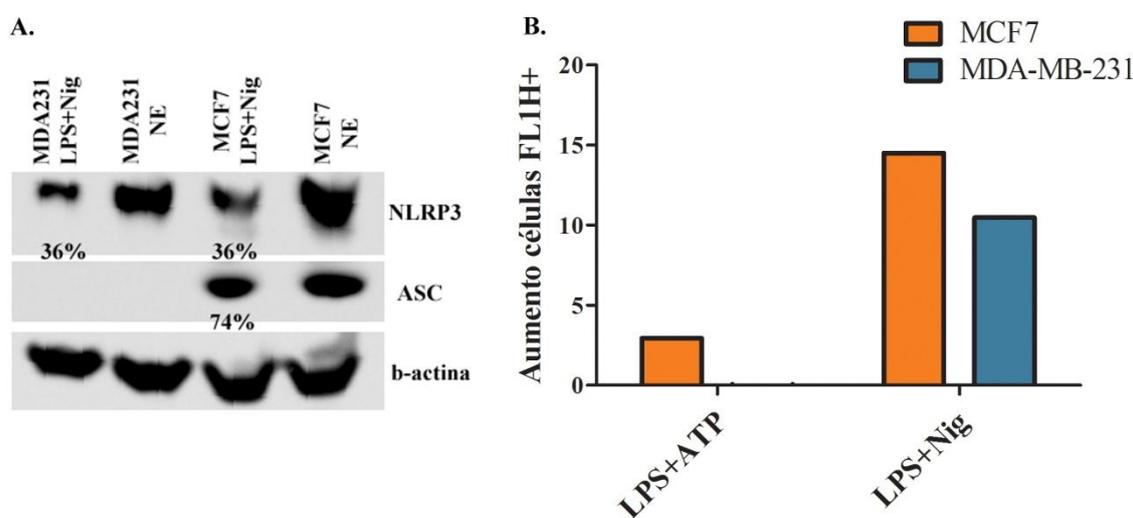
**Figura 4. Presença de componentes do inflamassoma NLRP3 em MCF7 em p.0.** Células MCF7 tratadas com LPS (500ng/ml, *overnight*), ATP (5mM, 4h) e Nigericina (20μM, 1h) ou sem tratamento (NE) foram marcadas com anticorpos anti-Caspase 1 (em verde), anti-ASC (em ciano) e anti-NLRP3 (em vermelho) e observadas em microscopia de fluorescência confocal. O núcleo celular (azul) foi marcado com DAPI (300nM).



**Figura 5. Presença de componentes do inflamassoma NLRP3 em MDA-MB-231 em p.0.** Células MDA-MB-231 tratadas com LPS (500ng/ml, *overnight*), ATP (5mM, 4h) e Nigericina (20μM, 1h) ou sem tratamento (NE) foram marcadas com anticorpos anti-Caspase 1 (em verde), anti-ASC (em ciano) e anti-NLRP3 (em vermelho) e observadas em microscopia de fluorescência confocal. O núcleo celular (azul) foi marcado com DAPI (300nM).

A identificação das proteínas do inflamassoma NLRP3 por meio de Western Blot apontou para uma diminuição na expressão dessas proteínas quando ocorre a utilização dos agonistas desse complexo (Figura 6B). No caso da ASC, sua expressão caiu para 74% nas células MCF7, enquanto que a proteína NLRP3 foi regulada negativamente para 36% da sua expressão basal em ambas as linhagens celulares. O WB demonstrou resultados conflitantes com os dados de imagens de confocal, demonstrando que a linhagem MDA-MB-231 não possui a proteína ASC.

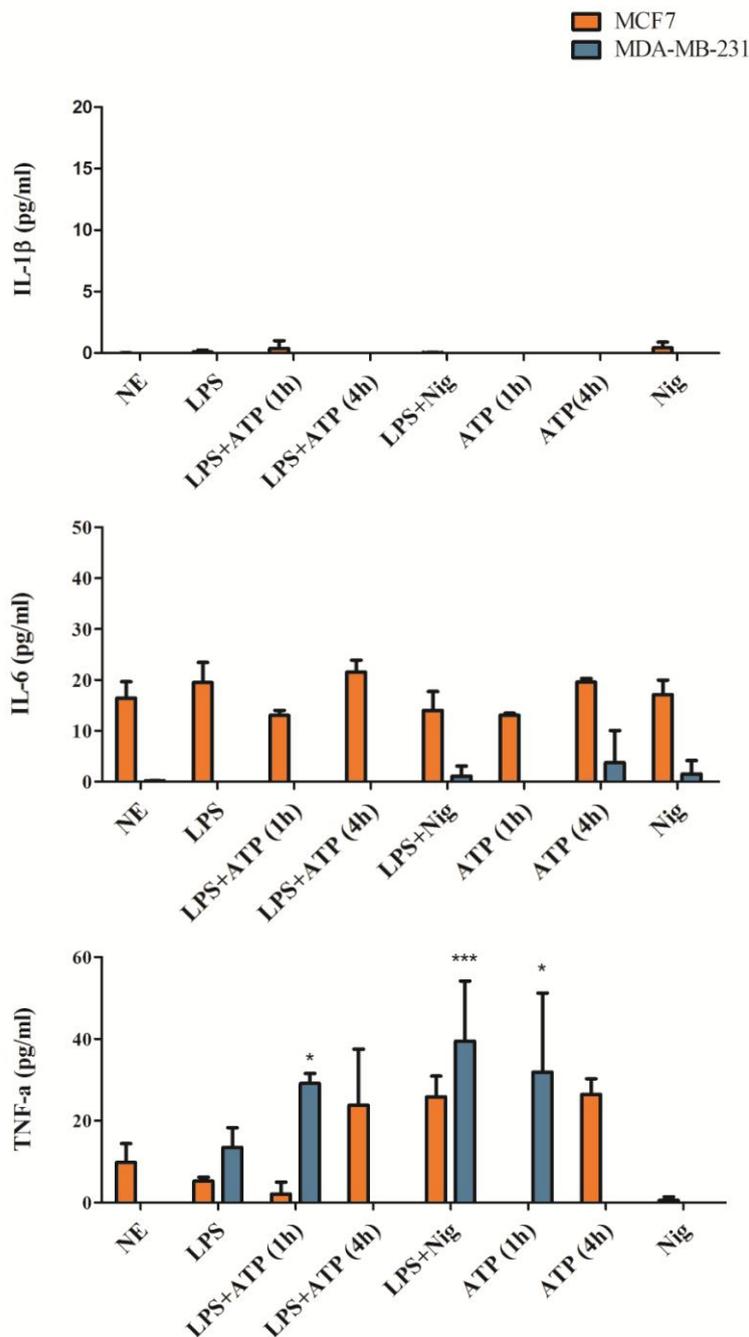
A ativação da caspase-1 é o efeito *downstream* do inflamassoma NLRP3, e tal caspase é responsável pela execução e amplificação do sinal de ativação do inflamassoma. Com o uso do marcador FAM-YVAD, específico ao sítio ativo da caspase-1, foi observado que ocorre a ativação da caspase-1 após a presença do agonista do inflamassoma NLRP3, sendo esta ativação representada por uma porcentagem de células fluorescentes até 15 unidades acima do grupo com células não estimuladas (Figura 6A). Ainda, a presença de caspase-1 ativada se mostrou maior na linhagem MCF7, embora em ambas as linhagens o segundo estímulo Nigericina tenha sido mais eficaz que o ATP na indução dessa ativação.



**Figura 6. Ativação de caspase-1 e regulação de componentes do inflamassoma NLRP3 em células de adenocarcinoma mamário em p.0.** **A.** Células MCF7 e MDA-MB-231 foram tratadas com LPS (500ng/ml *overnight*) e Nigericina (20 $\mu$ M, 1h) ou ATP (5mM, 4h), incubadas com FAM-YVAD-FLICA e quantificadas em citômetro de fluxo no canal FL1H. O gráfico demonstra a porcentagem de células positivas para o canal em relação às células não estimuladas. **B.** WB do lisado total das células tratadas com LPS e Nigericina, nas mesmas condições, e não estimuladas (NE), com marcação de NLRP3 (118KDa), ASC (22KDa).  $\beta$ -actina (42KDa) foi utilizado como controle interno. As porcentagens representam a relação com as células não estimuladas, após cada banda ter sido normalizada para a sua intensidade de  $\beta$ -actina correspondente.

A secreção da citocina IL1 $\beta$  é um dos principais mecanismos efetores da ativação dos inflamassomas, e ela geralmente sinaliza para um microambiente pró-inflamatório com a presença

de citocinas como a IL6 e TNF $\alpha$ . Entretanto, em ambas as linhagens celulares utilizadas, a utilização dos agonistas do inflamassoma NLRP3 não induziu a secreção de IL1 $\beta$ . Na linhagem MDA-MB-231, a sinalização com agonistas do inflamassoma induziu um pequeno aumento de TNF $\alpha$ , porém a IL6 não aumentou em nenhuma das linhagens após os tratamentos (Figura 7).



**Figura 7. Uso de agonistas do inflamassoma NLRP3 não altera os padrões de secreção de citocinas pró-inflamatórias em linhagens de câncer de mama.** Sobrenadantes de cultura de células MCF7 e MDA-MB-231, estimuladas ou não, foram quantificados por ELISA para a presença de IL-1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$ . Gráficos representativos de três repetições experimentais, com média e desvio padrão. ANOVA, pós-teste Dunnett. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.

É possível inferir a partir dos dados que na célula MCF7 não só existem todos os componentes do inflamassoma, como eles parecem estar funcionais, uma vez que a caspase-1 é ativada após o uso de agonistas. Ainda, parece haver algum nível de regulação desses componentes após o uso de agonistas, dada suas diminuições nas expressões nas células estimuladas. Na MDA-MB-231, a proteína ASC, presente em baixas quantidades, coloca em questão a hipótese de um inflamassoma NLRP3 funcional e convencional. Entretanto, nessa linhagem também há a ativação da caspase-1 e uma regulação da expressão da proteína NLRP3 após o tratamento com Nigericina.

Em ambas as células, a estimulação com agonistas do inflamassoma NLRP3 não induziu a resposta padrão de secreção de citocinas pró-inflamatórias, notadamente a IL1 $\beta$ .

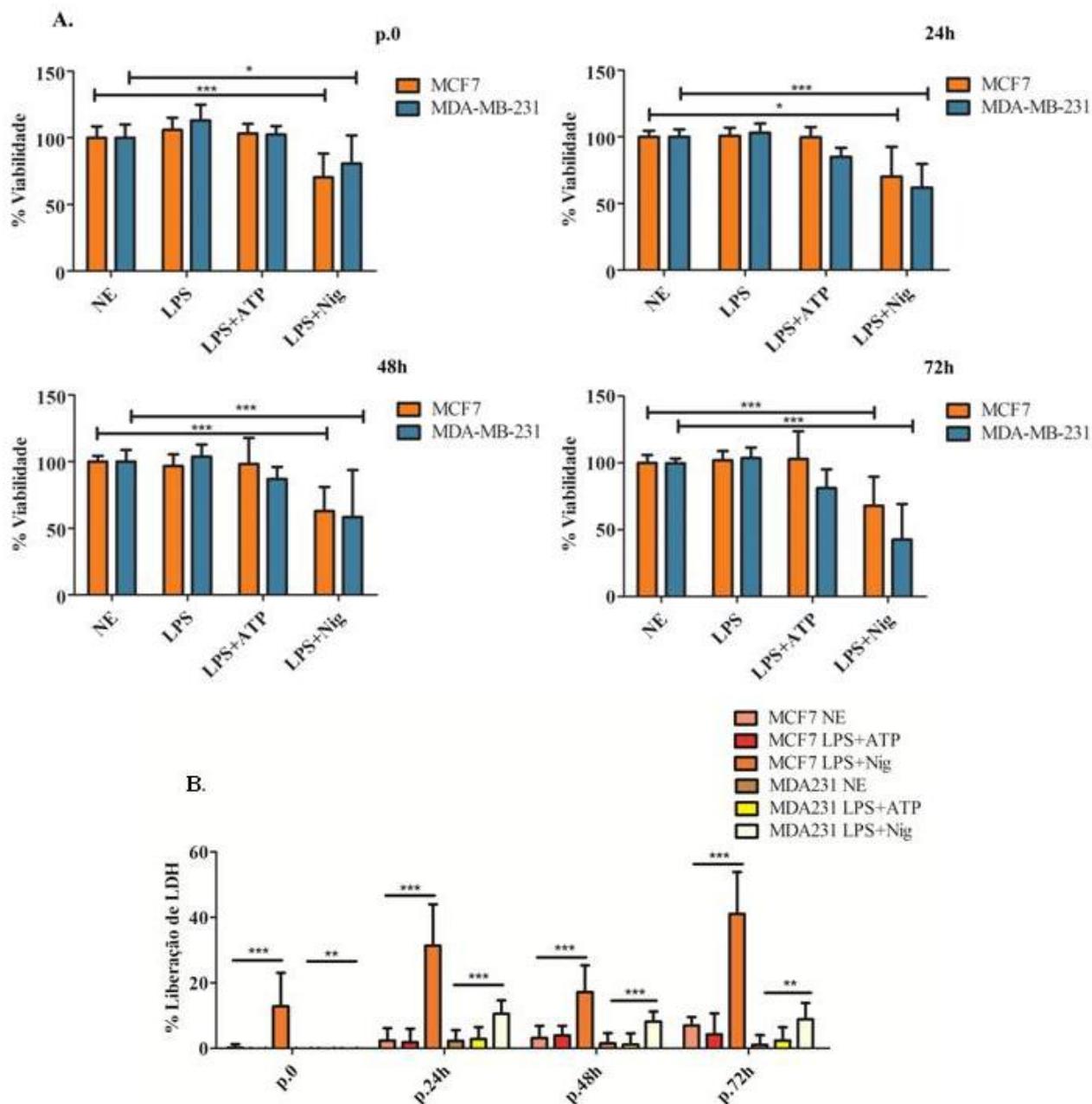
### **3.2. Agonistas do NLRP3 induzem morte celular em MCF7 e MDA-MB-231**

Uma vez analisada a expressão e ativação dos componentes do complexo do inflamassoma NLRP3, e que seu outro mecanismo efetor importante é a indução de morte celular, quantificou-se inicialmente a viabilidade celular das células de adenocarcinoma mamário por meio de MTT, na presença dos agonistas do inflamassoma NLRP3. O tratamento com Nigericina como segundo sinal induziu uma redução na viabilidade das duas linhagens celulares (Figura 8A). A presença de apenas LPS não alterou a viabilidade celular, indicando que as células são sensíveis ao agonista do NLRP3 e não a apenas um ambiente inflamatório.

As principais mortes celulares induzidas pela ativação dos inflamassomas são a apoptose e a piroptose. Ambas são mortes celulares programadas marcadas pela fragmentação de DNA e a exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática externa. Porém, uma marca típica de diferenciação entre esses dois tipos de morte celulares é a integridade da membrana celular. Enquanto que na apoptose a membrana celular é mantida íntegra durante todo seu processo, podendo sofrer permeabilizações apenas tardiamente, a piroptose é marcada pela rápida formação de poros na membrana e o extravasamento de conteúdo celular. Sendo assim, para acessar o tipo de morte induzida nas células de adenocarcinoma mamário com o uso dos agonistas do inflamassoma NLRP3, foi primeiramente analisada a presença de LDH, uma enzima citosólica, no meio de cultura, indicador de que há rompimento de membrana plasmática.

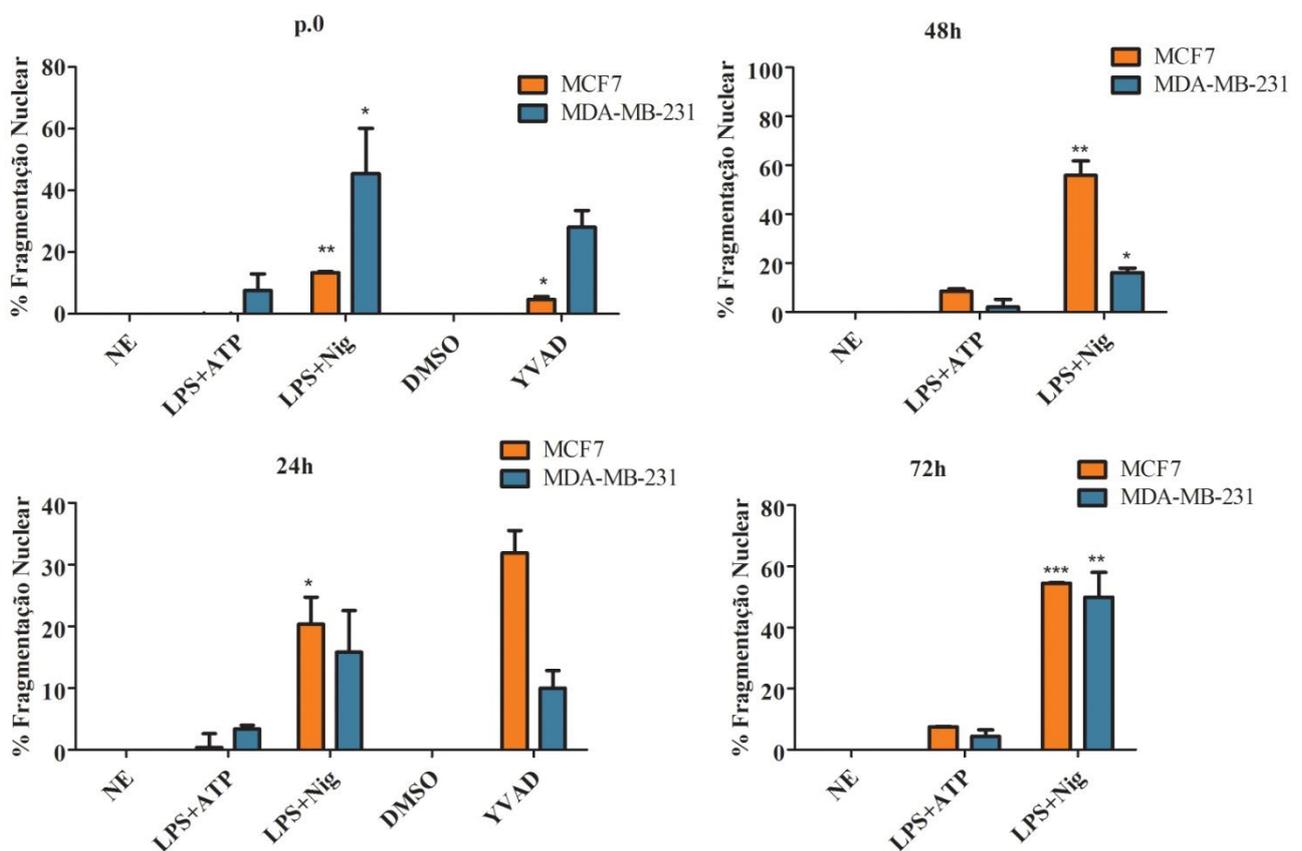
A liberação de LDH no meio foi detectada precocemente nas células MCF7 na presença de LPS e Nigericina, indicando que há rompimento celular nessa linhagem induzido pela ativação do inflamassoma NLRP3 (Figura 8B). Tal liberação foi reduzida no período de 48h, porém voltou a aumentar em 72h. Foi detectado LDH no meio extracelular também na linhagem MDA-MB-231, porém em períodos mais tardios e em níveis semelhantes em 24h, 48h e 72h, indicando que o efeito

da estimulação com agonistas do inflamassoma não é tempo dependente para o rompimento de membrana nessa linhagem.



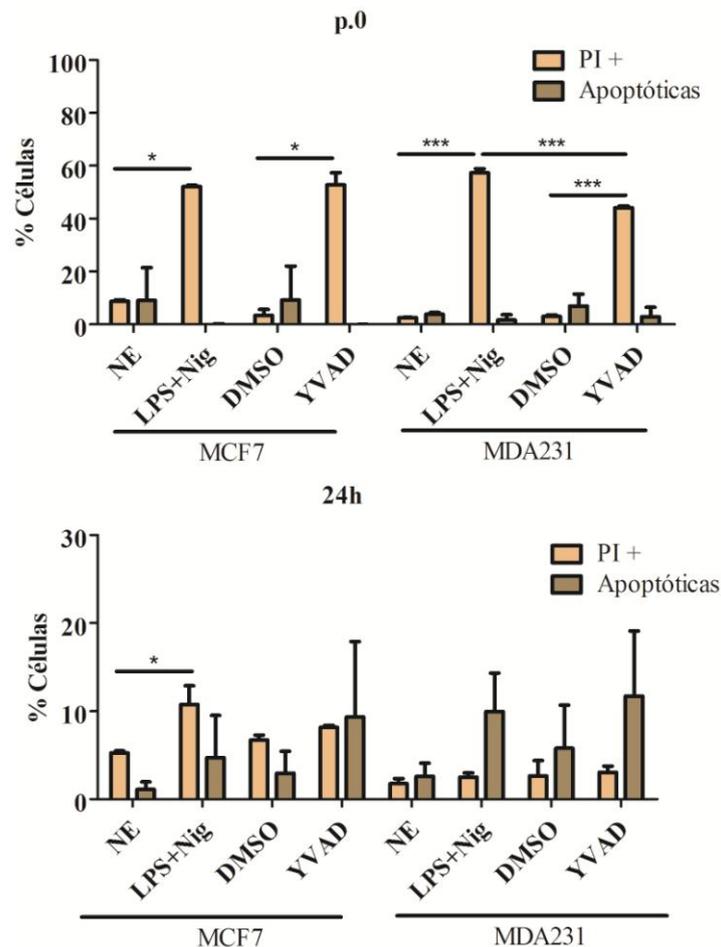
**Figura 8. Redução na viabilidade celular e liberação de conteúdo citoplasmático de células de adenocarcinoma mamário pela estimulação com agonistas do inflamassoma NLRP3 em p.0, 24h, 48h e 72h.** A. Após o tratamento com LPS (500ng/ml, *overnight*) ATP (5mM, 4h) ou Nigericina (20μM, 1h), as células foram incubadas com MTT por 4h e permeabilizadas com DMSO. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 595nm e a porcentagem de viabilidade calculada a partir de 100% dos grupos sem tratamentos (NE). Gráfico de três experimentos independentes realizados em triplicata demonstrando média e desvio padrão. ANOVA, pós-teste Dunnet. \*p<0,05. B. Com os mesmos tratamentos representados em A., o sobrenadante da cultura foi analisado quanto à presença de LDH. A porcentagem de LDH no meio foi calculada em relação à quantidade de LDH em lise total. Gráfico de três experimentos independentes realizados em triplicata demonstrando média e desvio padrão. ANOVA, pós-teste Bonferroni. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Quanto à fragmentação de DNA, analisada por meio da quantificação do pico sub-G1, observou-se que logo após o fim das estimulações do inflamassoma NLRP3, em p.0, ocorre um aumento significativo de fragmentação nuclear tanto na linhagem MCF7 quanto na MDA-MB-231, sendo mais proeminente nessa última (Figura 9, Apêndice A). O uso do inibidor de caspase-1 – YVAD – nesse período primário indicou uma diminuição significativa desse efeito em células MCF7 (Figura 9B). Nesta linhagem, a fragmentação nuclear ainda aumentou em 24h e se manteve alta nos períodos seguintes. Nas células MDA-MB-231, com a contínua manutenção da célula estimulada em cultura, ocorreu primeiro uma diminuição da fragmentação nuclear, porém níveis elevados foram retomados em 72h. Tais dados sugerem haver dois momentos distintos de regulação da morte celular após a estimulação com os agonistas do NLRP3. Como a utilização do ATP induziu uma menor ativação de caspase-1 (Figura 6B), a qual se mostrou relacionada a uma menor indução de fragmentação nuclear (Figura 9, Apêndice A), a partir desse ponto, continuou-se apenas com a Nigericina como segundo sinal.



**Figura 9. Indução de fragmentação nuclear após estimulação com agonistas do inflamassoma NLRP3 em linhagens de adenocarcinoma mamário em p.0, 24h, 48h e 72h.** Células estimuladas com LPS (500ng/ml *overnight*) e ATP (5mM, 4h) ou Nigericina (20µM, 1h) foram analisadas quanto ao seu conteúdo de DNA com iodeto de propídeo por citometria de fluxo. O inibidor Ac-YVAD-CHO foi utilizado (25µM) por 1h antes da Nigericina. DMSO se refere ao grupo controle do Ac-YVAD-CHO, cujas células receberam o mesmo volume de diluente DMSO. Quantificação de sub-G1 ao longo de dois experimentos independentes em triplicata, com gráfico mostrando média e desvio padrão. ANOVA, pós-teste Bonferroni. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Por ser um evento precoce no desencadeamento da morte celular, a exposição de fosfatidilserina, indicada pela marcação com Anexina-V, foi analisada apenas nos tempos p.0 e 24h. Foi demonstrado por este teste em tempos precoces há a indução do rompimento da membrana plasmática, com mais de 50% das células em ambas as linhagens se tornando PI positivas (Figura 10, Apêndice B). Por outro lado, neste mesmo momento, não houve indução significativa de apoptose. O uso do inibidor YVAD no período primário p.0 reduziu a quantidade de células MDA-MB-231 positivas para PI, porém não alterou essa característica na linhagem MCF7. Já em 24h, o evento de morte foi mais brando em ambas as linhagens, havendo um aumento significativo de células PI positivas apenas na MCF7 com LPS e Nigericina em relação àquelas não estimuladas no mesmo tempo. Isso indica que o rompimento de membrana detectado é induzido pela presença dos agonistas do inflamassoma, e ocorre de forma rápida.



**Figura 10. Células de câncer mamário apresentam rompimento de membrana precoce na presença dos agonistas do NLRP3 em p.0 e 24h.** As células MCF7 e MDA-MB-231 foram tratadas com LPS (500ng/ml, *overnight*) e Nigericina (20μM, 1h), grupo LPS+Nig, ou não tratadas, grupo NE, e marcadas com Anexina-v-FITC (FL1H) e Iodeto de Propídeo (FL2H) e analisadas por citometria de fluxo. O grupo YVAD se refere àquelas que receberam o inibidor de caspase-1 Ac-YVAD-Cho (25μM) 1h antes da Nigericina. O grupo DMSO é o controle do YVAD, com o volume correspondente em DMSO. Porcentagem de células positivas para Iodeto de Propídeo (PI+) ou para apenas Anexina-V (Apoptóticas) de dois experimentos

independentes em monoplicata, com gráfico mostrando média e desvio padrão. ANOVA, pós-teste Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Nos eventos de apoptose, as caspases 3 e 7 ativas clivam a enzima PARP1, gerando dois fragmentos inativos, um de 24kDa e outro de 89kDa. Porém, na piroptose, essa enzima permanece em seu estado normal e ativo. Para completar a caracterização do tipo de morte celular induzido após o uso dos agonistas do inflamassoma NLRP3 nas células MCF7 e MDA-MB-231, foi realizado um WB do lisado celular total, utilizando-se um anticorpo que detecta a parte clivada de 89kDa do PARP1. Não houve aparecimento da proteína marcada, indicando que o tipo de morte celular induzido não leva à fragmentação dessa enzima (Figura 11).



**Figura 11. Tratamento com agonistas do inflamassoma NLRP3 não induz a clivagem de PARP1 em células de adenocarcinoma de mama em p.0.** WB do lisado total das células tratadas com LPS (500ng/ml, overnight) e Nigericina (20 $\mu$ M, 1h) (LPS+Nig), não estimuladas (NE) e tratadas com peróxido de hidrogênio (10 $\mu$ M, 24h) (Apotóticas) com marcação para o fragmento de PARP1 de 89kDa e  $\beta$ -actina (42KDa) como controle interno.

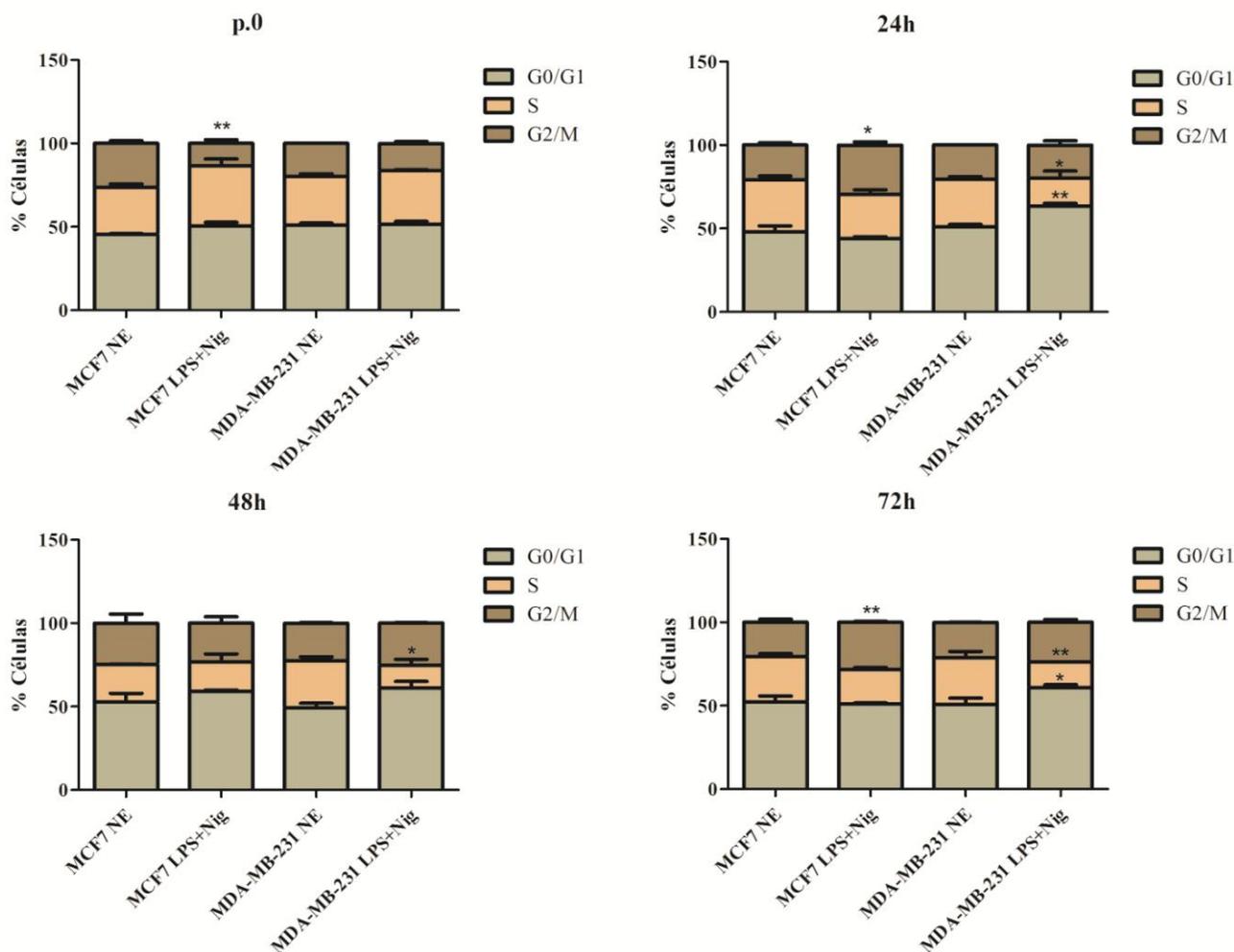
Assim, por meio dos resultados, observamos que na presença dos agonistas do inflamassoma NLRP3 há a diminuição da viabilidade celular em ambas as linhagens celulares, com uma rápida fragmentação do núcleo e rompimento da membrana plasmática concomitante, o que ocorre na ausência da clivagem da PARP1. Ainda, a utilização do inibidor de caspase-1 demonstra que, no período p.0, essa morte é parcialmente dependente dessa caspase, o que não é observado em 24h. Com os dados de Anexina/PI, notamos que a inibição da caspase-1 não impede a morte celular induzida pelo tratamento com o LPS e a Nigericina nas células MCF7, porém há a diminuição na fragmentação nuclear, indicador de uma mudança no tipo de morte induzido.

### **3.3. Alterações no ciclo celular em MCF7 e MDA-MB-231 por agonistas do NLRP3**

Um dos principais fenótipos do câncer, e que determina em grande parte suas características nocivas, é a grande capacidade de proliferação das células tumorais. Para compreender se haveria efeito no processo de divisão celular após o uso dos agonistas do inflamassoma NLRP3, foram utilizados como parâmetros o perfil de ciclo celular e a taxa de proliferação das células MCF7 e MDA-MB-231.

Na análise de ciclo celular, a linhagem MCF7 desenvolveu dois padrões distintos (Figura 12). Inicialmente, houve uma redução significativa da fase G2/M, indicando que as células estavam retidas nas fases G0/G1 e S. Em períodos mais tardios, houve uma inversão no padrão, ocorrendo então um aumento significativo da fase G2/M, com uma tendência à redução da fase S e sem nenhuma alteração em G0/G1

Na linhagem MDA-MB-231, ocorreram alterações a partir do ponto de análise de 24h, com significativa diminuição da fase S e aumento da fase G0/G1 (Figura 12). Isso demonstra que as células tratadas com LPS+Nigericina ficam retidas na fase G0/G1 do ciclo celular, reduzindo de forma significativa a frequência de progressão à fase S quando comparada à população de células não submetidas ao tratamento.

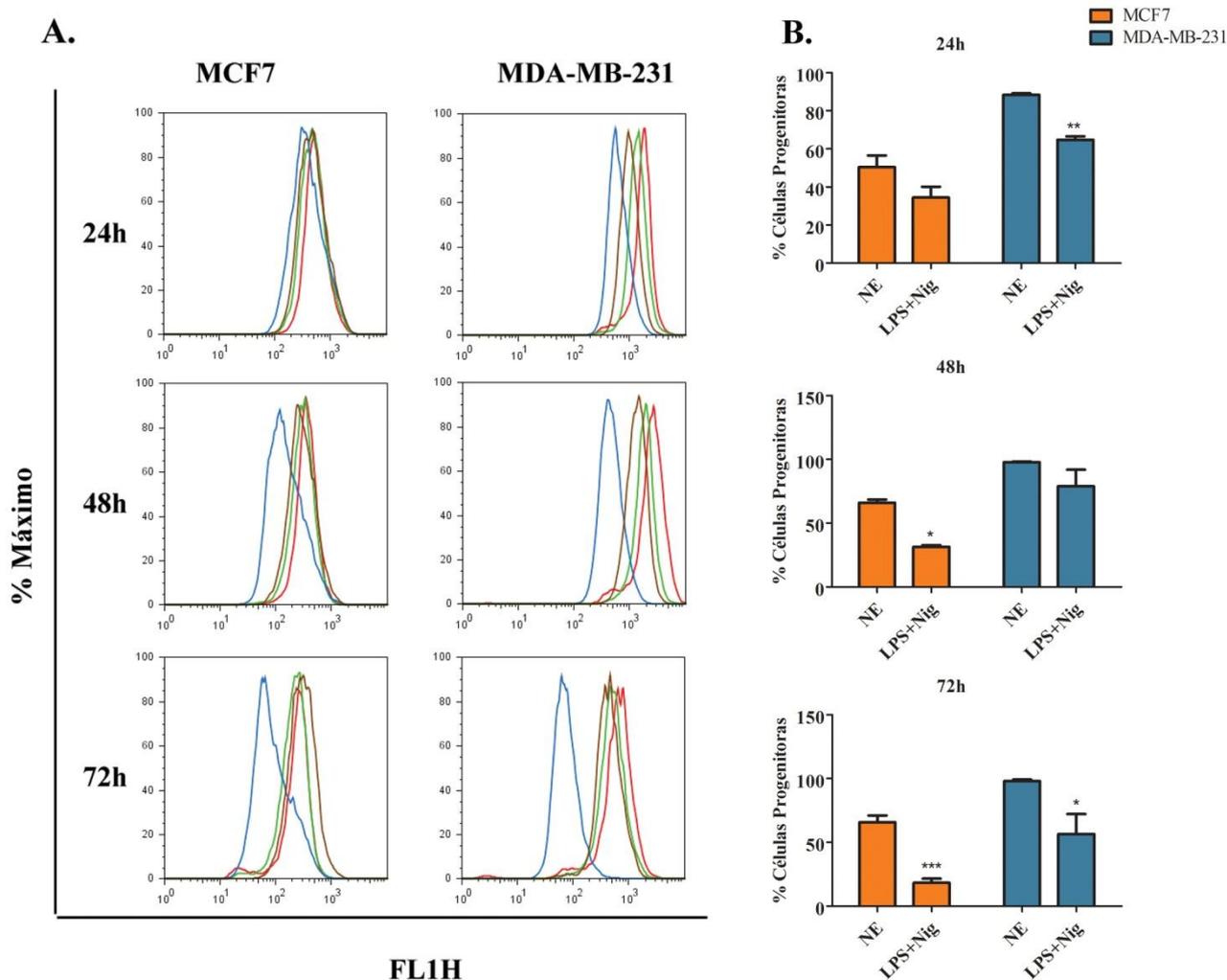


**Figura 12.** O uso de agonistas do inflamassoma NLRP3 induz alterações no ciclo celular de células de câncer de mama em p.0, 24h, 48h e 72h. Células foram tratadas com LPS (500ng/ml *overnight*) e Nigericina (20μM, 1h) e marcadas com PI (FL2A) para análise de ciclo celular por citometria de fluxo. A determinação do ciclo celular foi realizada em plataforma específica do FlowJow. Gráficos representam as médias e desvios padrões de dois experimentos independentes em monoplicata com as quantificações das subpopulações em G0/G1, S e G2/M. ANOVA, pós-teste Bonferroni. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

### 3.4. Alterações na proliferação celular em MCF7 e MDA-MB-231 após agonistas do NLRP3

Para o estudo da proliferação celular pelo marcador CFSE, foram utilizados dois momentos de tratamento com colchicina como controle. A colchicina é um agente que para a divisão celular na metáfase e, quando utilizado em ensaios com CFSE, permite observar a intensidade de fluorescência gerada caso as células não tivessem dividido em cultura, sendo o pico de fluorescência inicial. No ensaio, a utilização da colchicina em dois momentos visou compreender se as alterações na proliferação celular ocorriam no momento da utilização do LPS (correspondente ao pico colchicina 1) ou quando ocorria a estimulação com Nigericina (correspondente ao pico da colchicina 2).

De forma consistente com os resultados de ciclo celular, as curvas de proliferação celular das células MDA-MB-231 tratadas foram semelhantes às curvas de colchicina, embora o leve deslocamento que ocorre no pico LPS+Nig demonstra que a parada da proliferação não é imediata, como é na colchicina (Figura 13A). Quanto ao número de células progenitoras, na MDA-MB-231 a redução é especialmente observada em 24h (Figura 13B). O fato de não observarmos essa redução em tempos no tempo de análise de 48h pode ser devido a limitações no modelo matemático aplicado pela plataforma de análise, uma vez que, na análise dos histogramas, há uma clara diferenciação das curvas de células não tratadas e tratadas.



**Figura 13. Agonistas do inflamassoma NLRP3 diminuem a proliferação celular de células de adenocarcinoma de mama em 24h, 48h e 72h.** Células MCF7 e MDA-MB-231 marcadas com CFSE foram tratadas com LPS (500ng/ml, *overnight*) e Nigericina (20μM, 1h), e após troca de meio, mantidas em cultura por 24h, 48h e 72h. A aquisição dos dados ocorreu em citômetro de fluxo. A colchicina (10μM, 1h) foi utilizada em dois momentos, concomitante com o LPS e com a Nigericina. **A.** Gráficos representativos de duas repetições experimentais cada uma em monoplicata, demonstrando as curvas de colchicina 1 (vermelho), colchicina 2 (verde), NE (azul) e LPS+Nig (marrom). **B.** Gráfico das médias e desvios padrões da porcentagem de células progenitoras em cada população experimental de dois experimentos independentes em monoplicata. ANOVA, pós-teste Bonferroni. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Já os efeitos na taxa de proliferação na MCF7 são mais pronunciados para os pontos mais tardios de 48h e 72h (Figura 13), em que há redução no número de células progenitoras e uma crescente semelhança da curva das células tratadas com a da colchicina.

### 3.5. Efeitos na população de células-tronco tumorais de MCF7 e MDA-MB-231 após agonistas do NLRP3

Atualmente é descrito que células-tronco tumorais são um pequeno grupo de células dentro da população tumoral as quais são as principais responsáveis pela liberação de fatores de proliferação e angiogênese e na promoção da metástase. Para compreender a relação de tais células com um microambiente inflamatório, após os tratamentos com os agonistas do inflamassoma NLRP3, a quantidade de células-tronco tumorais na população foi determinada por meio dos marcadores de superfície CD24 e CD44, sendo o fenótipo tronco-tumoral representado por CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>.

Com os resultados desses marcadores, observamos que, apesar de atuarem na proliferação, a utilização de agonistas do inflamassoma NLRP3 não influencia no fenótipo epitelial (CD24) ou mesenquimal (CD44) na linhagem celular MCF7 (Tabela 1, Apêndice D). Nas células MDA-MB-231, a presença dos agonistas do inflamassoma NLRP3 levou a um aumento na população celular CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>-</sup> e uma diminuição na população duplo negativa, o que demonstra a ocorrência algum tipo de polarização epitelial com os estímulos.

**Tabela 1. Efeitos do uso de agonistas do inflamassoma NLRP3 no fenótipo CD24/CD44 de células tumorais da mama em p.0 e 24h.**

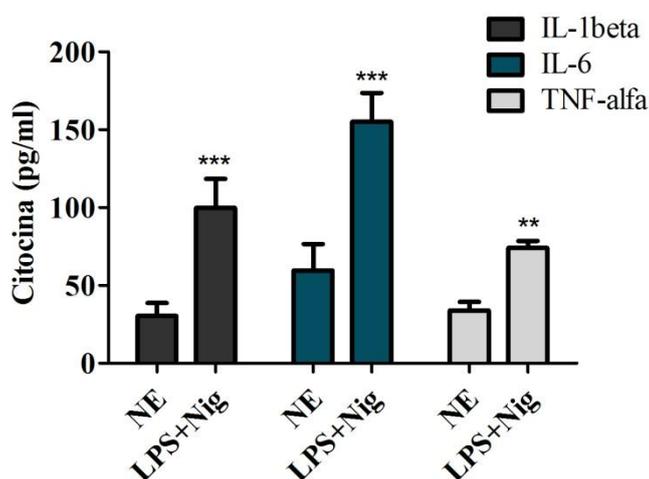
	CD24 <sup>+</sup> /CD44 <sup>-</sup>	CD24 <sup>+</sup> /CD44 <sup>+</sup>	CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>-</sup>	CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup>	
<b>p.0</b>	MCF7 NE	27,27 ± 10,30	72,29 ± 10,37	0,20 ± 0,08	0,24 ± 0,00
	MCF7 LPS+Nig	20,53 ± 0,91	78,80 ± 1,07	0,35 ± 0,08	0,31 ± 0,08
	MDA231 NE	11,62 ± 10,80	0,28 ± 0,09	88,08 ± 10,88	0,01 ± 0,01
	MDA231 LPS+Nig	18,94 ± 1,59	20,81 ± 18,80	57,98 ± 23,28	2,26 ± 2,88
<b>24h</b>	MCF7 NE	39,23 ± 1,82	59,55 ± 1,85	0,84 ± 0,04	0,36 ± 0,00
	MCF7 LPS+Nig	42,88 ± 6,89	56,23 ± 6,78	0,44 ± 0,13	0,44 ± 0,24
	MDA231 NE	24,32 ± 12,87	0,51 ± 0,30	75,15 ± 13,17	0,01 ± 0,01
	MDA231 LPS+Nig	70,97 ± 7,43**	3,73 ± 3,31	25,28 ± 10,75**	0,00 ± 0,00

Tabela representando as médias ± os desvios padrões para cada população analisada dos valores obtidos em dois experimentos independentes em monocultura. NE: Não estimuladas; LPS+Nig: LPS (500ng/ml *overnight*) e Nigericina (20µM, 1h). ANOVA, pós-teste Bonferroni. \*\*p<0,01.

### 3.6. A ação do microambiente pró-inflamatório gerado pela ativação do NLRP3 de monócitos nas células de adenocarcinoma mamário

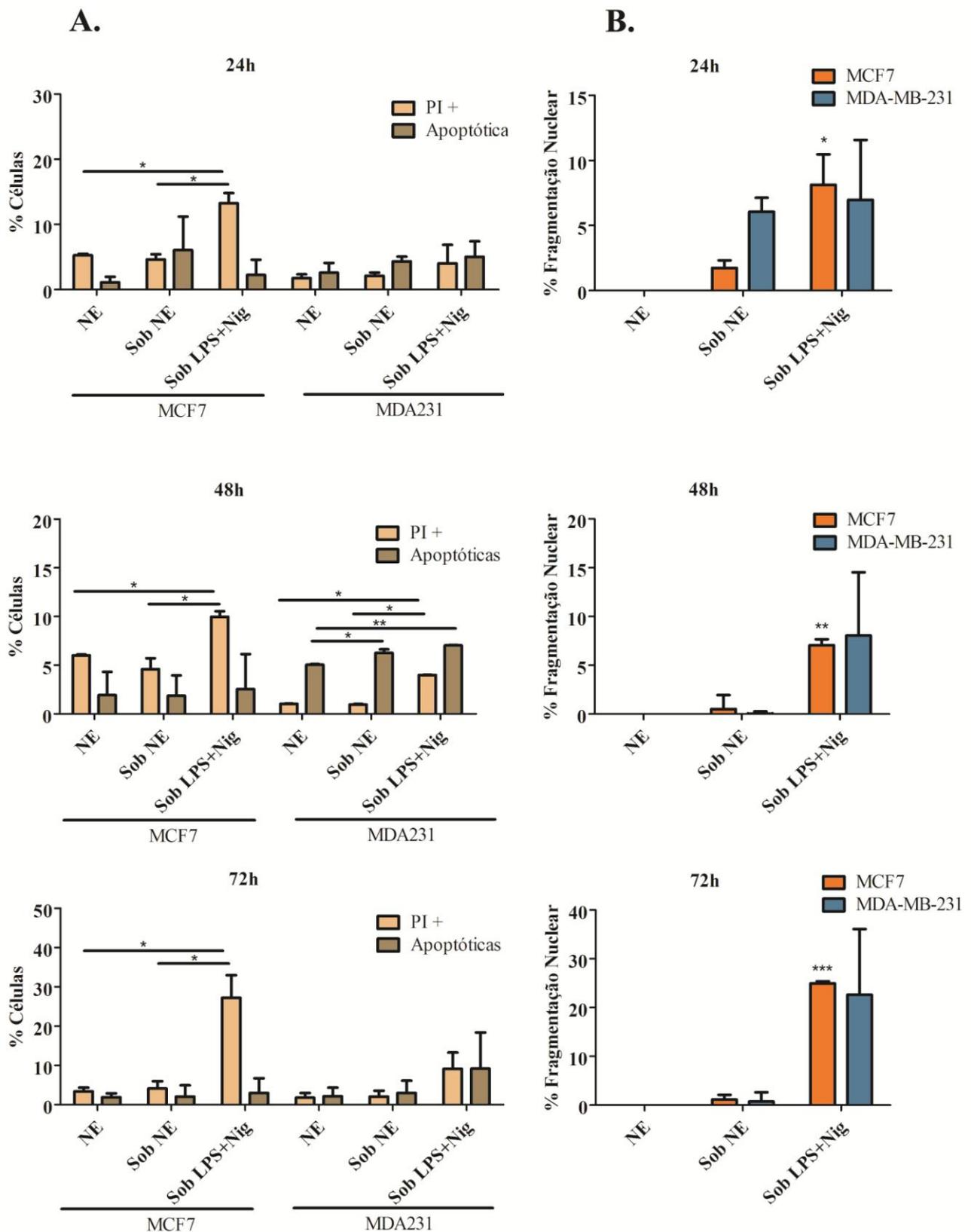
Até o momento, os dados obtidos demonstraram que a presença de ativadores do inflamassoma NLRP3 nas próprias células de adenocarcinoma mamário leva a eventos de morte celular e redução da sua proliferação. Existem diversos relatos da relação entre o câncer e a inflamação local, porém pouco foi relatado sobre o papel do inflamassoma NLRP3 no microambiente do câncer de mama. Procurou-se então investigar quais os efeitos do microambiente pró-inflamatório causado pela ativação do inflamassoma NLRP3 em monócitos sobre as células de câncer de mama. Para isso, o sobrenadante de monócitos estimulados com LPS e Nigericina foi adicionado ao meio de cultura das células MCF7 e MDA-MB-231. Para garantir que os efeitos observados eram causados por fatores secretados pelos monócitos e não um reflexo dos próprios estímulos ainda presentes no meio, após as estimulações, o sobrenadante dos monócitos foi trocado e as células foram mantidas em cultura por mais 16h.

A dosagem das citocinas presentes nos sobrenadantes dos monócitos na presença de LPS+Nigericina demonstrou que de fato eles estavam ativados e possuíam um típico perfil de ativação pró-inflamatória, havendo aumento de secreção de IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$ , citocinas típicas após a ativação do inflamassoma NLP3 (Figura 14). A coleta para dosagem dos sobrenadantes ocorreu no mesmo momento da sua utilização na cultura das células tumorais e, logo, demonstra a quantidade de citocinas que foi colocada na cultura das células MCF7 e MDA-MB-231.



**Figura 14. Secreção de citocinas pró-inflamatórias após a ativação de monócitos para o inflamassoma NLRP3.** Monócitos obtidos do sangue periférico humano foram estimulados com LPS (500ng/ml, 8h) e Nigericina (20 $\mu$ M, 1h), após o que o sobrenadante foi trocado e as células mantidas em cultura por 16h. Gráfico mostra as médias e desvios padrões representativos da dosagem dos sobrenadantes coletados. ANOVA, pós-teste Bonferroni. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

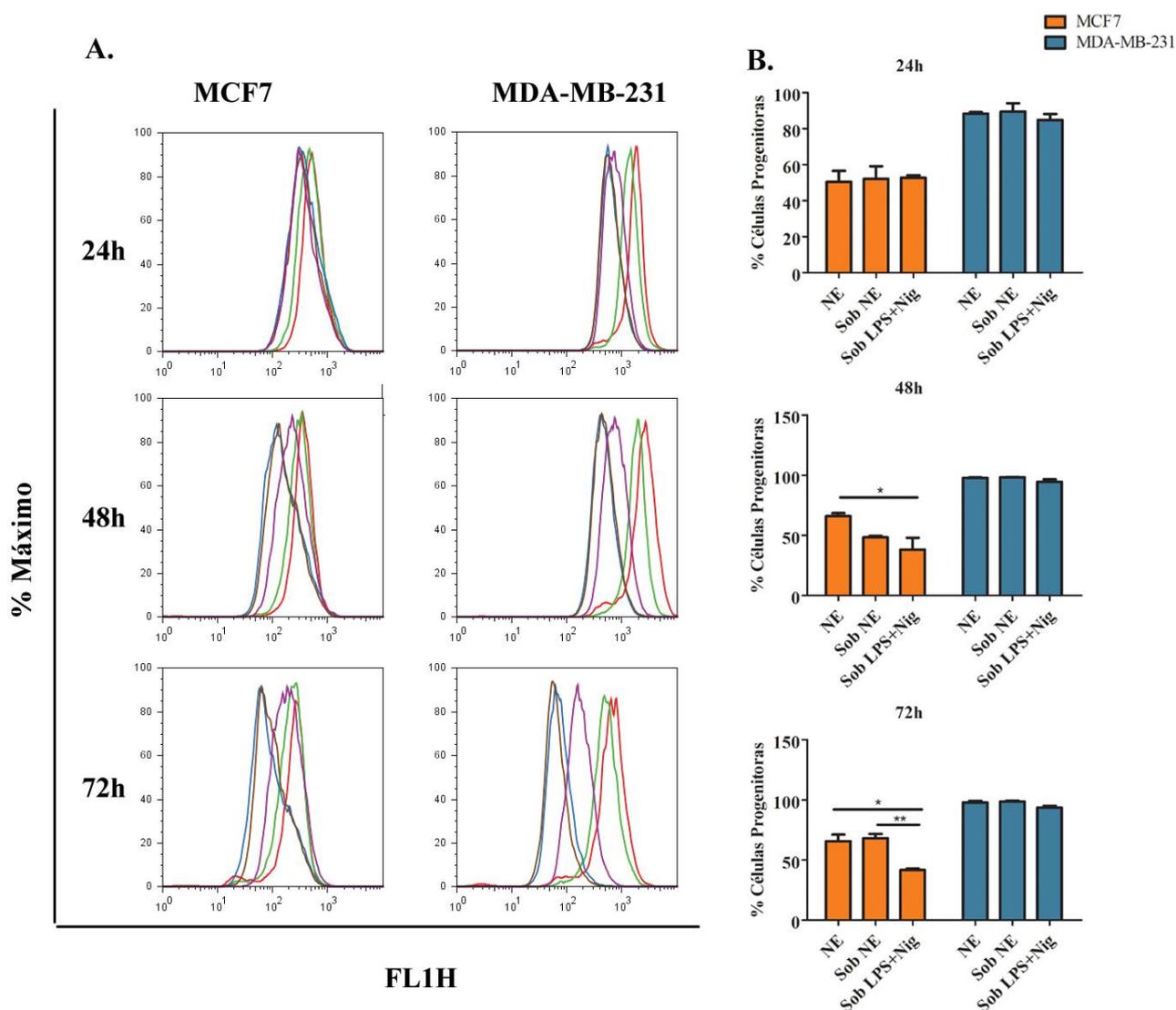
A utilização dos sobrenadantes condicionados na cultura de células induziu, após 24h, uma morte celular em MCF7 pelo sobrenadante de monócitos estimulados. Essa morte celular foi similar à observada anteriormente, com rompimento de membrana e de fragmentação nuclear (Figura 15), sendo tempo dependente para ambos os parâmetros. Nesse mesmo período, não houve aumento significativo na morte da linhagem MDA-MB-231 com a presença dos sobrenadantes (Figura 15). Apenas em 48h, o tratamento induziu um aumento de apoptose nessas células, embora tal aumento tenha ocorrido também com o sobrenadante não estimulado.



**Figura 15. Indução de morte celular pela presença de sobrenadante de monócitos após a ativação do inflamassoma NLRP3 em 24h, 48h e 72h.** O sobrenadante de monócitos estimulados para o inflamassoma NLRP3 foi adicionado à cultura de MCF7 e MDA-MB-231 (Sob LPS+Nig), em uma proporção de 1:5 e seus efeitos comparados ao do sobrenadante de monócitos sem estímulos (Sob NE) e às células em cultura sem tratamentos (NE). Em **A.**, após 24h, 48h e 72h de tratamento, as células foram analisadas para a presença de fosfatidilserina e rompimento de membrana celular, por marcação com Anexina-V e PI. PI+ indica a porcentagem de células positivas para iodeto de propídeo (PI); Apoptóticas indica marcação apenas de Anexina-V. Gráficos demonstram a quantificação da porcentagem de células de dois experimentos independentes, com média e desvio padrões. Em **B.**,

nos mesmos períodos, houve a quantificação da fragmentação de DNA pela análise do pico sub-G1 em leitura de PI. Gráficos representam a média e desvio padrão de dois experimentos independentes em monoplicata. ANOVA, pós-teste Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

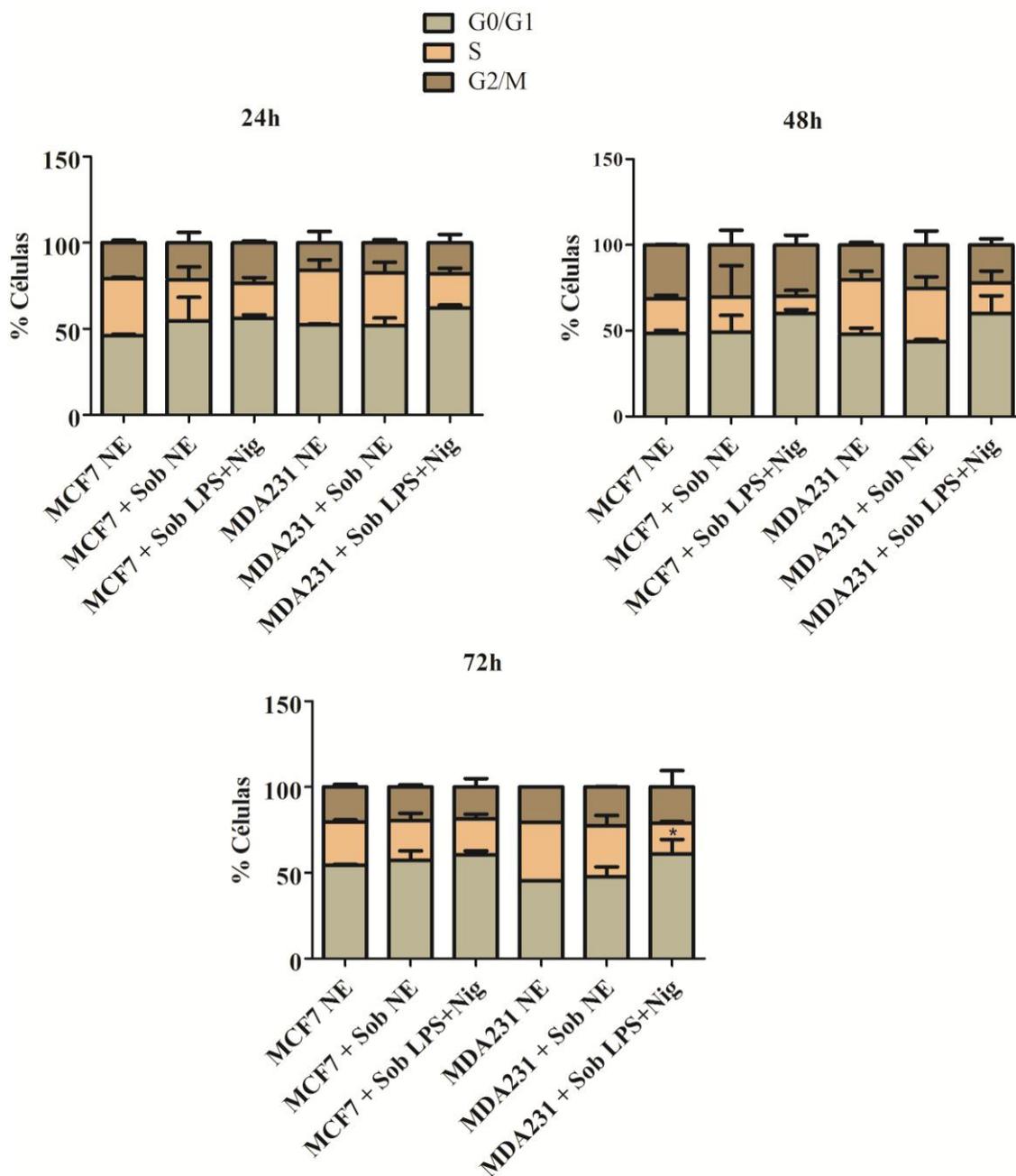
A análise de proliferação celular comprovou que o tratamento com o sobrenadante estimulado diminuiu a taxa de proliferação na linhagem celular MCF7 a partir de 48h, com uma diminuição similar na porcentagem de células progenitoras (Figura 16). Nas células MDA-MB-231, houve claro atraso na curva de proliferação celular na presença do sobrenadante estimulado, especialmente em tempos mais longos, embora não se tenha observado diminuição significativa na porcentagem de células progenitoras, o que pode ocorrer novamente devido a dificuldades com células de alta taxa de divisão para esse ensaio.



**Figura 16. Redução da proliferação celular de células tumorais da mama na presença de sobrenadantes condicionados de monócitos.** As linhagens MCF7 e MDA-MB-231 marcadas com CFSE foram cultivadas por 24h, 48h e 72h na presença de sobrenadantes de monócitos estimulados (Sob LPS+Nig) ou não (Sob NE), após o que foram analisadas por citometria de fluxo. **A.** Gráficos representativos da leitura de CFSE (FL1H) de dois experimentos independentes em monoplicata, demonstrando as curvas colchicina 1 (vermelho), colchicina 2 (verde), NE (azul), Sob NE (marrom), Sob LPS+Nig (roxo). **B.** Média e desvio padrão da porcentagem de células progenitoras presentes em

cada população após o cultivo com os sobrenadantes condicionados, em dois experimentos independentes em monocultiva. ANOVA, pós-teste Bonferroni. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

No ciclo celular, não foram observadas diferenças significativas após os tratamentos nas células MCF7, que apresentou apenas uma tendência de redução da fase S (Figura 17). Nas células MDA-MB-231, houve também apenas uma tendência de redução da fase S, a qual foi significativa apenas em 72h. Nesse momento, houve também um aumento significativo de G0/G1, indicando que as células estavam retidas nessa fase.



**Figura 17. Influências no ciclo celular de células de adenocarcinoma mamário após o cultivo com sobrenadantes condicionados de monócitos por 24h, 48h e 72h.** As células MCF7 e MDA-MB-231 foram cultivadas na presença de sobrenadantes de monócitos estimulados para o inflamassoma NLRP3 (Sob LPS+Nig) ou não (Sob NE) e analisadas quanto às quantidades de DNA na célula por marcação com

PI. Gráficos demonstram a média e desvios padrões das quantidades de células em cada população em dois experimentos independentes em monocultiva. ANOVA, pós-teste Bonferroni. \*p<0,05.

As células MCF7 apresentaram alteração na expressão dos marcadores CD24 e CD44 apenas no tempo inicial de 24h, no qual ocorreu uma redução significativa da subpopulação CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> após o uso dos sobrenadantes condicionados (Tabela 2). Nos outros tempos de análise tanto para a MCF7 quanto para a MDA-MB-231, não ocorreram mudanças no padrão de expressão desses marcadores.

**Tabela 2. Determinação do fenótipo CD24/CD44 das células tumorais da mama após o cultivo com sobrenadantes condicionados de monócitos em 24h, 48h e 72h.**

		CD24 <sup>+</sup> /CD44 <sup>-</sup>	CD24 <sup>+</sup> /CD44 <sup>+</sup>	CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>-</sup>	CD24 <sup>-</sup> /CD44 <sup>+</sup>
<b>24h</b>	MCF7 NE	39,23 ± 1,82	59,55 ± 1,85	0,84 ± 0,04	0,36 ± 0,00
	MCF7 + Sob NE	49,09 ± 6,09	49,81 ± 5,97*	0,73 ± 0,18	0,36 ± 0,06
	MCF7 + Sob LPS+Nig	53,63 ± 0,34	44,55 ± 1,03**	1,39 ± 0,49	0,42 ± 0,20
	MDA231 NE	24,32 ± 12,87	0,51 ± 0,30	75,15 ± 13,17	0,01 ± 0,01
	MDA231 + Sob NE	26,49 ± 29,54	0,64 ± 0,03	72,69 ± 29,30	0,16 ± 0,21
	MDA231 + Sob LPS+Nig	29,46 ± 16,60	0,65 ± 0,25	69,83 ± 16,34	0,06 ± 0,01
<b>48h</b>	MCF7 NE	33,29 ± 7,42	66,33 ± 7,52	0,25 ± 0,09	0,12 ± 0,02
	MCF7 + Sob NE	38,45 ± 5,64	60,78 ± 5,91	0,43 ± 0,17	0,33 ± 0,11
	MCF7 + Sob LPS+Nig	57,36 ± 28,43	35,16 ± 36,59	7,10 ± 8,34	0,38 ± 0,19
	MDA231 NE	45,80 ± 25,32	1,00 ± 0,15	53,15 ± 25,10	0,05 ± 0,07
	MDA231 + Sob NE	55,40 ± 2,40	1,80 ± 0,37	42,61 ± 2,78	0,19 ± 0,01
	MDA231 + Sob LPS+Nig	14,87 ± 6,83	2,44 ± 0,04	82,50 ± 6,72	0,18 ± 0,15
<b>72h</b>	MCF7 NE	53,72 ± 6,62	45,15 ± 7,30	0,91 ± 0,54	0,21 ± 0,13
	MCF7 + Sob NE	49,98 ± 11,32	49,00 ± 11,13	0,80 ± 0,02	0,21 ± 0,17
	MCF7 + Sob LPS+Nig	50,70 ± 25,40	46,34 ± 23,19	2,46 ± 1,75	0,48 ± 0,45
	MDA231 NE	42,53 ± 3,93	0,69 ± 0,22	56,77 ± 4,15	0,00 ± 0,00
	MDA231 + Sob NE	26,38 ± 29,66	1,51 ± 0,07	71,76 ± 29,28	0,34 ± 0,31
	MDA231 + Sob LPS+Nig	58,46 ± 36,15	4,79 ± 1,29	36,67 ± 37,35	0,07 ± 0,09

Tabela representando as médias ± os desvios padrões para cada população analisada dos valores obtidos em dois experimentos independentes. NE: Não estimuladas; Sob NE: Sobrenadante de monócitos não estimulados. Sob LPS+Nig: Sobrenadante de monócitos estimulados com LPS e Nigericina. ANOVA, pós-teste Bonferroni. \*p<0,05, \*\*p<0,01.

## 4. Discussão

---

O câncer de mama, além de ser um dos mais incidentes no mundo, é também um dos mais relatados como influenciado pelo sistema imune e tal característica traz complicações inclusive para o acompanhamento clínico e a escolha de tratamentos. Nesse tipo de câncer, as ações do sistema imune são principalmente relatadas como indutoras e o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais previamente à doença apresenta melhores prognósticos (COTTERCHIO et al., 2001). De forma similar, a inflamação gerada pela própria biópsia, prática comum na clínica para o diagnóstico do câncer de mama, foi descrita como relacionada a uma maior incidência de metástase em modelos animais (HOBSON et al., 2013). Reconhece-se como principais atuantes as citocinas IL6 e IL8. Essas citocinas, frequentemente secretadas pelo próprio tumor, estão relacionadas às características celulares como crescimento livre de ancoragem, resistência à apoptose, crescimento tumoral, indução de células-tronco tumorais e resistência a quimioterápicos (DETHLEFSEN; HOJFELDT; HOJMAN, 2013; HARTMAN et al., 2013; KORKAYA et al., 2012). Os mediadores inflamatórios IL1 $\beta$  e Cox2, quando inibidos em células tumorais ou células estromais do microambiente tumoral, também foram relacionados a características tumorais (REED et al., 2009). Além disso, a sinalização por microRNAs e pelo fator de transcrição NF $\kappa$ B também foram relacionados ao câncer de mama (ILIOPOULOS; HIRSCH; STRUHL, 2009; ROKAVEC; WU; LUO, 2012). SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) presentes no gene do NF $\kappa$ B e de algumas citocinas foram associados a piores prognósticos no câncer de mama (MURRAY et al., 2013).

Porém, alguns dados ainda não são completamente compreendidos. Em análises clínicas, as características associadas à secreção de IL6 não são confirmadas e ainda há discussão sobre o papel da IL1 $\beta$  e da Cox2, uma vez que suas sinalizações parecem ser diferenciadas dependendo do estágio de desenvolvimento tumoral (DETHLEFSEN et al., 2013; REED et al., 2009). De forma geral, a correlação entre os subtipos moleculares do câncer de mama e suas diferentes regulações imunes pode ser responsável por parte de tais diferenças (HERRERA et al., 2012), e tais dados indicam que, assim como para os outros tumores, ainda existe uma necessidade de maior compreensão das vias inflamatórias, suas relações e consequências no câncer de mama.

De forma geral, essas informações apontam para o fato de que o microambiente tumoral é decisivo para os eventos de progressão, morte celular e metástase, e as células presentes nesse microambiente, assim como seus fenótipos, influenciam o destino da progressão tumoral e logo o prognóstico do paciente. Macrófagos associados aos tumores são particularmente descritos como indicadores de mau prognóstico no câncer de mama, atuando na angiogênese e no remodelamento tecidual (LEWIS et al., 1995). Essas funções efetoras são típicas de uma polarização de

diferenciação do macrófago em M2, um perfil relacionado à imunossupressão, remodelamento de tecido e baixa resposta anti-tumoral (ALLAVENA et al., 2008). Esse perfil M2 se contrapõe aos macrófagos classicamente ativados, chamados M1, os quais induzem fortes respostas imunes e destruição de tecido. Embora esses fenótipos sejam na realidade um espectro contínuo de perfis de ativação, o microambiente tumoral tende a diferenciar macrófagos semelhantes ao M2, os quais são os relacionados ao pior prognóstico.

Nesse sentido, a função dos inflamassomas surge como uma grande questão na ativação e polarização da resposta imune, uma vez que estão relacionados a uma forte indução inflamatória local, com a secreção de citocinas pró-inflamatórias e alarminas. A recente demonstração da existência dos inflamassomas em células não hematopoiéticas junto com a possibilidade de indução de morte celular por esse complexo levanta a questão se as células tumorais, tão resistentes às mortes celulares, seriam também resistentes à piroptose ou ainda capazes de induzirem um microambiente inflamatório (ZITVOGEL et al., 2012). Para o câncer de mama, já foi demonstrada a ação de componentes ligados às vias dos inflamassomas, como a proteína AIM2 e a citocina IL1 $\beta$ , embora nunca tenha se comentado sobre a questão da formação do inflamassoma nessas células tumorais (CHEN, I. F. et al., 2006; JIN et al., 1997). Além disso, a fagocitose de células MCF7 em processo de autofagia leva a uma ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos, o que demonstra então uma via de ativação desse inflamassoma no contexto do microambiente tumoral (PETROVSKI et al., 2011).

Com isso, nos questionamos quais seriam as funções do inflamassoma NLRP3 nas próprias células de câncer de mama e os efeitos do seu microambiente inflamatório. Para responder essas questões, esse trabalho apresentou dois direcionamentos: a investigação da presença e efeito dos componentes do inflamassoma NLRP3 nas células de câncer de mama e a análise dos efeitos do sobrenadante de monócitos após a ativação do inflamassoma NLRP3.

Primeiramente, foi possível demonstrar que na linhagem MCF7 há a expressão dos componentes do inflamassoma, as proteínas NLRP3 e ASC, de forma constitutiva e há a ativação da caspase-1 após a estimulação com Nigericina, indicando uma ativação do complexo macromolecular (Figuras 4 e 6).

Na linhagem MDA-MB-231, o WB demonstrou ausência da proteína ASC, em ambas as condições utilizadas (Figura 6A), o que corrobora dados encontrados por Hong *et al.*(2013). A discordância dos resultados entre as imagens de confocal e WB pode ser apenas um reflexo das limitações de cada técnica. Apesar disso, detectamos que a linhagem possui a proteína NLRP3 e ativa a caspase-1 na presença da Nigericina (Figuras 5 e 6). A falta ou baixa expressão de ASC

indicaria que esse tipo celular não é capaz de montar o inflamassoma de forma convencional, porém o ensaio com FAM-FLICA indicou que tal fato não influenciou negativamente a ativação da caspase-1, uma vez que essa célula tinha níveis similares de fluorescência aos das células MCF7.

Diferentemente do observado em células do sistema imune, a estimulação com agonistas do inflamassoma NLRP3 não levou à formação do agregado particular de ASC em nenhuma das linhagens (WANG et al., 2013). Essa questão provavelmente se deve ao fato de que as células utilizadas são de origem epitelial e, conseqüentemente, podem possuir formas de ativação dos inflamassomas diferenciadas em relação às células de origem mieloide.

Em ambas as linhagens não só havia a presença de componentes do inflamassoma NLRP3 como esses pareciam ter suas expressões reduzidas na presença do estímulo (Figura 6A). Foi descrito que a autofagia, um mecanismo celular de reciclagem de organelas, pode ser responsável por inibir a ativação do inflamassoma NLRP3, pois pela retirada de mitocôndrias danificadas, diminui as quantidades intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ZHOU et al., 2011). A autofagia pode ainda agir de modo direto na ativação do inflamassoma ao engolfar as proteínas necessárias para sua ativação, NLRP3 e ASC, e direcioná-las à destruição nos lisossomos. Ainda, um estímulo iniciador da autofagia é a própria presença das proteínas sensoras do inflamassoma ativadas (SHI et al., 2012). A inibição da ativação do inflamassoma pela autofagia como responsável pela diminuição da expressão das proteínas-chave para o inflamassoma é um mecanismo passível de ocorrer na MCF7, em concordância com trabalhos que mostram a ativação da autofagia como evasão da morte celular nessas células (ABEDIN et al., 2007)

Existem duas vias efetoras principais após a ativação do inflamassoma NLRP3: a secreção de citocinas e a indução da piroptose. No estudo, a ativação da caspase-1 não foi relacionada à secreção de sua citocina chave, a IL1 $\beta$ , nem de citocinas pró-inflamatórias relacionadas, como a IL6 e TNF $\alpha$  na linhagem MCF7, havendo apenas uma baixa secreção de TNF $\alpha$  na MDA-MB-231 (Figura 7). Embora esse resultado fosse relativamente esperado para a MCF7, já que essa linhagem possui uma fraca assinatura imune, foi um resultado surpreendente para a MDA-MB-231. A MDA-MB-231 é classificada terapeuticamente como triplo negativa, já que não possui a expressão de ER, PR e HER2. Esse fato está associado a diversas características mesenquimais, dentre elas um de forte padrão de expressão de genes inflamatórios (PRAT et al., 2010; VOSS et al., 2011). As grandes quantidades de IL6 encontradas mesmo na ausência de estímulos por Voss *et al.* (2011) não correspondeu aos dados encontrados no presente trabalho, em que não houve secreção dessa citocina inclusive após estimulação.

A ativação da caspase-1 pelos inflamassomas também leva a uma morte celular com a liberação de conteúdos citoplasmáticos, chamada piroptose. Essa morte celular programada foi

encontrada em diversos modelos e é caracterizada pela perda de integridade de membrana e fragmentação nuclear, eventos dependentes da ativação de caspase-1 (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009; FINK; COOKSON, 2005). No presente trabalho, o uso de Nigericina como agonista do inflamassoma NLRP3 levou a praticamente 50% de morte em ambas as populações, e as características da morte celular desencadeada foram semelhantes às relatadas pela literatura para a morte piroptótica, em que há rompimento de membrana, fragmentação nuclear e manutenção da enzima PARP1 (Figuras 8 a 11). O fato de o rompimento de membrana ter ocorrido rapidamente, após apenas 1h de incubação com a Nigericina, nos indica que esse evento foi um evento precoce no desencadeamento da morte celular, o que exclui a possibilidade de observação de uma necrose secundária e a confusão com uma possível apoptose. Ainda, parece haver mais de um ponto de regulação dessa morte celular, uma vez que os parâmetros de fragmentação nuclear e permeabilização de membrana mudaram suas características ao longo do tempo (Figuras 8 e 9, Apêndice A). Deng, Huang, Ling (2010) publicaram que a utilização de Rotenona, um agonista do inflamassoma NLRP3, em MCF7 também induziu a morte celular, porém por apoptose, embora não tenham relacionado à ativação do complexo macromolecular. Tais discordâncias de resultados podem ser devido a diferentes técnicas de análises e desenhos experimentais utilizados. Por outro lado, a ausência de caspase-3 nessa linhagem parece não afetar a capacidade da célula de morrer por piroptose, e isso pode estar relacionado ao fato de esse programa de morte celular ocorrer independentemente dessa caspase (LAMKANFI, 2011).

A utilização do inibidor de caspase-1, Ac-YVAD-CHO, não alterou o padrão de permeabilização de membrana na MCF7, porém diminuiu sua fragmentação nuclear no ponto p.0 (Figuras 9 e 10, Apêndices A e B). Na MDA-MB-231, a utilização do inibidor reduziu a permeabilização de membrana e indicou uma redução na fragmentação nuclear, embora sua quantificação não tenha sido significativa. Esses dados indicam que a caspase-1 participa da via de indução de morte celular nas duas linhagens e que, na sua ausência, ocorre uma reduzida morte celular na MDA-MB-231, e uma mudança em seu fenótipo na MCF7. O fato de que o ATP utilizado como segundo sinal induz menor ativação de caspase-1 nessas células e está relacionado também a uma menor porcentagem de morte celular (Figuras 6B e 9), a qual ocorreu com fragmentação nuclear, reforçam o conceito de que a caspase-1 está relacionada à via de indução de morte após o uso dos agonistas do inflamassoma nas células MCF7 e MDA-MB-231.

É muito debatido se a secreção de citocinas e a indução de morte por piroptose via caspase-1 são vias interligadas. Alguns autores defendem que a secreção de citocinas ocorre pela própria liberação do conteúdo intracelular durante a piroptose, colocando essas vias como conectadas, enquanto outros defendem que a caspase-1 pode ativar um aparato de secreção de citocinas

independente do Retículo Endoplasmático, e por isso tais vias de morte e secreção de citocinas poderiam ser independentes (KELLER et al., 2008; LAMKANFI, 2011). Parte da dificuldade na distinção dessas vias se deve porque, na maior parte das células do sistema imune, ambas são desencadeadas ao mesmo tempo na presença dos agonistas dos inflamassomas. Porém, demonstrou-se que a secreção de IL1 $\beta$ , IL18 e HMGB1, embora ocorram de forma dependente da ativação de caspase-1, são vias interdependentes entre si (LAMKANFI et al., 2010; SCHMIDT; LENZ, 2012). Isso corrobora resultados encontrados em células epiteliais intestinais, em que na ativação do inflamassoma há secreção de IL18, mas não de IL1 $\beta$  (ZAKI; BOYD; et al., 2010), e reforça o conceito de que a caspase-1 é, de alguma forma, regulada quanto aos mecanismos efetores os quais desencadeia.

No presente trabalho, a diferença nos desencadeamentos da piroptose e da secreção de citocinas pode estar relacionada a diversos motivos. Primeiramente, no caso da MCF7, essa linhagem é descrita como não secretora de citocinas, e essa barreira talvez esteja relacionada a uma condição anterior à transcrição de proteínas. Em segundo lugar, o mesmo evento que pode levar a uma rápida diminuição nos padrões de expressão das proteínas do inflamassoma após a estimulação com Nigericina pode também estar relacionado à não liberação de citocinas. Por último, pode ser que a observação desses eventos de forma separada seja uma evidência de que eles não são interdependentes, ao menos não no modelo estudado.

A utilização dos indutores do inflamassoma NLRP3 também diminuiu a taxa de proliferação das células tumorais da mama e induziu alterações no ciclo celular, em ambas as linhagens (Figuras 12 e 13, Apêndice C), o que indica a influência dos inflamassomas ou de seus agonistas em vias paralelas à de indução de morte e de secreção de citocinas. Isso pode ocorrer pela ativação da autofagia a partir dos inflamassomas, uma vez que foi demonstrado o papel da autofagia na inibição da proliferação celular em MCF7 via a proteína Beclina-1 (LIANG et al., 1999). Nessa célula, o fenótipo populacional de CD24 e CD44 não foi alterado na presença dos estímulos do inflamassoma NLRP3 (Tabela 1, Apêndice D), indicando que as alterações na proliferação não ocorreram por alterações na caracterização epitelial ou mesenquimal desse tipo celular e que o inflamassoma, seus agonistas e demais moléculas *downstream* não estão então relacionados a essa via.

Os resultados dos marcadores CD24 e CD44 para a célula MDA-MB-231 foram surpreendentes por não estarem de acordo com a literatura. Esses marcadores são associados a uma definição de perfil de diferenciação celular, sendo células positivas para CD44 aquelas que possuem características mesenquimais, com motilidade e menor proliferação (SHIPITSIN et al., 2007). A população de células MDA-MB-231 é classicamente definida como células triplo negativas, tendo como fundamental característica a grande presença de células-tronco tumorais definidas com o

marcador CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> (PRAT et al., 2010). Por essas questões, acreditamos que a amostra de células MDA-MB-231 presente no laboratório possa ter sofrido algum tipo de alteração genética ou epigenética que a levou a perder algumas características mesenquimais e, provavelmente, seu perfil muito agressivo. Essa ideia corrobora os resultados também não esperados quanto ao padrão de citocinas secretadas por essas células.

Na segunda abordagem do trabalho, visou-se compreender como a ativação do inflamassoma NLRP3 em monócitos, responsável e descrita por gerar um padrão celular altamente inflamatório, poderia atuar nas células de adenocarcinoma mamário. Em acordo com a ideia de que o problema do infiltrado inflamatório no câncer de mama é pelo desenvolvimento de um perfil anti-inflamatório pelas células imunes, foi demonstrado que a ativação de macrófagos para um perfil inflamatório os torna tumoricidas, levando a uma regressão tumoral (FIDLER, 1974; KEY et al., 1982).

De forma semelhante aos dados da literatura, a utilização dos sobrenadantes de monócitos estimulados para o inflamassoma NLRP3 levou a uma indução de morte celular na MCF7 semelhante àquela observada com os agonistas do inflamassoma, com a presença de permeabilização de membrana e fragmentação nuclear (Figura 15). Porém, na MDA-MB-231, tal efeito não foi observado, havendo apenas a indução de apoptose no período de 48h.

Quanto à proliferação celular, a presença do sobrenadante de monócitos estimulados demonstrou efeitos semelhantes ao da Nigericina, com forte atraso na curva de proliferação em ambas as linhagens (Figura 16). Como comentado anteriormente, a não detecção da diminuição de células progenitoras na MDA-MB-231 pode ser devido a uma dificuldade com a metodologia frente células que proliferam rapidamente, uma vez que, na análise, o pico de fluorescência das células que não se dividem desaparece. Assim, embora as curvas fiquem claramente diferentes, não é observada uma diminuição correspondente nas células progenitoras.

A diminuição na proliferação celular não foi acompanhada por uma alteração significativa no ciclo celular, porém houve uma tendência à redução da fase S em ambas as linhagens (Figura 17). Também, o sobrenadante inflamado de forma geral não alterou os fenótipos CD44 e CD24, em ambas as linhagens (Tabela 2).

Sendo assim, a utilização de sobrenadantes na cultura de células de câncer de mama demonstrou que fatores inflamatórios secretados por monócitos após a ativação do inflamassoma NLRP3 são capazes de induzir alterações fenotípicas nas linhagens estudadas, com indução de morte celular e diminuição da proliferação, demonstrando uma ativação com perfil antitumoral de tais monócitos. Por um lado, as alterações observadas podem ser resultado da presença de IL1 $\beta$ , IL6 e TNF $\alpha$  nos sobrenadantes, já que o nível dessas citocinas se mostrou aumentado no sobrenadante

dos monócitos estimulados em relação aos não estimulados (Figura 14). Porém, os efeitos fenotípicos induzidos pelos sobrenadantes nas células de câncer de mama foram semelhantes aos eventos que ocorrem com a ativação do inflamassoma na própria célula tumoral, e tais citocinas não estavam presentes na cultura da MCF7 e MDA-MB-231. Isso levanta a possibilidade de ação de outros fatores solúveis para a situação observada.

Os efeitos causados pela cultura com sobrenadantes condicionados foram relativamente mais brandos do que quando há a estimulação do próprio inflamassoma nas células tumorais. Este resultado pode ser indicativo de que o efeito fenotípico de ativação do inflamassoma NLRP3 é mais efetivo quando ocorre na própria célula tumoral do que no microambiente tumoral, mas pode também ser consequência da diluição desses sobrenadantes no momento de utilização na cultura.

Com o exposto, este trabalho esclareceu em parte as questões acerca da função do inflamassoma NLRP3 em células tumorais da mama. A demonstração de que, dependendo do tipo de morte ativado em células MCF7, pode haver uma ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos, indica um papel importante desse inflamassoma no microambiente tumoral (PETROVSKI et al., 2011). O presente trabalho demonstrou que, além disso, quando o inflamassoma NLRP3 é ativado nas próprias células tumorais ou em monócitos, gera-se um ambiente antitumoral, o que coloca a ativação desse inflamassoma como importante fator nos processos de parada de progressão tumoral.

Estudos recentes demonstraram que uma morte inflamatória no microambiente tumoral com liberação de ATP pode levar à exposição de antígenos tumorais e indução de uma resposta inflamatória local benéfica para o controle do tumor (KROEMER et al., 2013). Considerando os resultados expostos de que a ativação do inflamassoma NLRP3 levou a uma morte celular acelerada com liberação de conteúdos citoplasmáticos, semelhante à piroptose, a modulação desses componentes nas células tumorais fornece novos horizontes para a clínica do câncer, e traz ao menos duas possíveis contribuições relevantes: (1) novos dados que auxiliam em um melhor entendimento da sinalização celular no microambiente tumoral e seus desdobramentos sobre a fisiologia da célula tumoral; (2) a possibilidade do potencial uso destas moléculas como novos alvos terapêuticos, o que abre perspectivas para o desenvolvimento de mediadores sintéticos que possam contribuir para o controle do câncer de mama. Mais estudos são ainda necessários nessa temática, porém inicialmente traz-se à tona a especial atenção necessária quanto à recomendação do uso de agentes anti ou pró-inflamatórios de baixa especificidade, dado que seus efeitos sistêmicos podem ser variados.

## 5. Conclusões e Perspectivas

---

Com esse trabalho, demonstramos pela primeira vez a presença e atuação dos componentes do inflamassoma NLRP3, um componente típico de células hematopoiéticas, em células tumorais da mama. A presença dos agonistas do inflamassoma nas próprias células tumorais gerou um fenômeno altamente antitumoral, com indução de morte celular e parada de proliferação. Esses resultados sugerem que pode ocorrer a geração e manutenção de um ambiente local pró-inflamatório pela estimulação com agonistas inflamatórios nas próprias células tumorais da mama.

A utilização de sobrenadantes condicionados de cultura de monócitos evidenciou que a ação do inflamassoma NLRP3 pode ocorrer também por meio de fatores secretados e que a ativação pró-inflamatória de monócitos via este inflamassoma possui um direcionamento tumoricida. Esta abordagem também levanta a questão de que a geração de um ambiente fortemente pró-inflamatório local pode ter funções benéficas no controle da progressão tumoral.

Tanto os dados apresentados quanto os da literatura evidenciam que, na realidade, o efeito benéfico ou maléfico de um microambiente inflamatório depende de quais células estão atuando e por quais vias. São então necessários mais estudos no tema abordado. Porém, a modulação do inflamassoma NLRP3 pode representar novos direcionamentos das terapias contra o câncer de mama. Estudos adicionais em andamento em nosso laboratório estão focados em checar diversas outras possibilidades de modulação que não puderam ser esclarecidas por este estudo.

Este trabalho levantou diversas questões, que serão aqui apresentadas como perspectivas de continuidade:

- Qual o mecanismo capaz de diminuir a expressão dos componentes do inflamassoma NLRP3 nas células após o uso de seus agonistas? Haveria o envolvimento de ROS?
- Qual a via molecular por trás da indução de morte após o uso de Nigericina?
- Qual o fator responsável pela indução dos efeitos fenotípicos após o uso de sobrenadantes condicionados? Este fator também atua nos efeitos observados pelo uso dos estímulos do inflamassoma diretamente nas células tumorais?
- As vias analisadas de indução de morte podem ativar a ação efetora de células TCD8+? Como ocorre tal ativação?
- Quais as implicações *in vivo* da ativação do inflamassoma NLRP3 no modelo de câncer de mama?

## 6. Referências

---

- ABEDIN, M. J. et al. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 3, p. 500-10, Mar 2007.
- ACS. **Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition**. Atlanta: American Cancer Society, 2011.
- AGOSTINI, L. et al. NALP3 forms an IL-1 $\beta$ -processing inflammasome with increased activity in muckle-wells autoinflammatory disorder. **Immunity**, v. 20, p. 319-325, 2004.
- AHMAD, I. et al. Thymoquinone suppresses metastasis of melanoma cells by inhibition of NLRP3 inflammasome. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 270, n. 1, p. 70-6, 2013.
- AKHTER, A. et al. Caspase-11 promotes the fusion of phagosomes harboring pathogenic bacteria with lysosomes by modulating actin polymerization. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 35-47, 2012.
- AKHTER, A. et al. Caspase-7 activation by the Nlrp4/Ipaf inflammasome restricts *Legionella pneumophila* infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000361, 2009.
- AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 100, n. 7, p. 3983-8, Apr 1 2003.
- 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.
- ALLEN, I. C. et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 556-65, 2009.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001.
- BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 99-109, 2009.
- BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **The Journal of Pathology**, v. 196, n. 3, p. 254-65, 2002.
- BRABLETZ, T. EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells? **Cancer Cell**, v. 22, n. 6, p. 699-701, 2012.
- CAILLEAU, R.; OLIVE, M.; CRUCIGER, Q. V. J. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. **In Vitro**, v. 14, n. 11, 1978.
- CAMUS, M. et al. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. **Cancer Research**, v. 69, n. 6, p. 2685-93, 2009.
- CANCER GENOME ATLAS, N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61-70, Oct 4 2012.
- CHAPMAN, J. R.; WEBSTER, A. C.; WONG, G. Cancer in the transplant recipient. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 7, 2013.
- CHAVEY, C. et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. R15, 2007.
- CHEN, I. F. et al. AIM2 suppresses human breast cancer cell proliferation in vitro and mammary tumor growth in a mouse model. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2006.
- CHEN, L. C. et al. Tumour inflammasome-derived IL-1 $\beta$  recruits neutrophils and improves local recurrence-free survival in EBV-induced nasopharyngeal carcinoma. **EMBO Molecular Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1276-93, 2012.
- CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G. K. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. **Cell and Molecular Biology Letters**, v. 11, n. 4, p. 506-25, 2006.
- CLEMENTE, C. G. et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer**, v. 77, n. 7, p. 1303-1310, 1996.
- COCK-RADA, A.; WEITZMAN, J. B. The methylation landscape of tumour metastasis. **Biology of the Cell**, v. 105, n. 2, p. 73-90, Feb 2013.

- COTTERCHIO, M. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, p. 1213–1217, 2001.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867, 2002.
- DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 707-35, 2011.
- DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 1, p. 24-37, 2006.
- DEMEYERE, K. et al. *Escherichia coli* induces bovine neutrophil cell death independent from caspase-3/-7/-1, but with phosphatidylserine exposure prior to membrane rupture. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 153, n. 1-2, p. 45-56, 2013.
- DENG, Y. T.; HUANG, H. C.; LIN, J. K. Rotenone induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell-mediated ROS through JNK and p38 signaling. **Molecular Carcinogenesis**, v. 49, n. 2, p. 141-51, 2010.
- DETHLEFSEN, C.; HOJFELDT, G.; HOJMAN, P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 138, n. 3, p. 657-64, 2013.
- DI VIRGILIO, F. The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 3, p. 872-905, 2013.
- DUNCAN, J. A. et al. *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 10, p. 6460-9, 2009.
- DUNN, G. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, n. 1529-2908 (Print), p. 991-998, 20021030 DCOM- 20021204 2002.
- ELL, B.; KANG, Y. Transcriptional control of cancer metastasis. **Trends in Cell Biology**, Jul 6 2013.
- ERENER, S. et al. Inflammasome-activated caspase 7 cleaves PARP1 to enhance the expression of a subset of NF-kappaB target genes. **Molecular Cell**, v. 46, n. 2, p. 200-11, 2012.
- FAUSTIN, B. et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. **Molecular Cell**, v. 25, n. 5, p. 713-24, 2007.
- FAZILATY, H. et al. Crosstalk between breast cancer stem cells and metastatic niche: emerging molecular metastasis pathway? **Tumour Biology**, 2013.
- FELDMEYER, L. et al. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. **Current Biology**, v. 17, n. 13, p. 1140-5, 2007.
- FERNANDES-ALNEMRI, T. et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 509-13, 2009.
- FIDLER, I. J. Inhibition of pulmonary metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages. **Cancer Research**, v. 34, p. 1074-1078, 1974.
- \_\_\_\_\_. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 1474-175X (Print), p. 453-8, 20030602 DCOM- 20030707 2003.
- FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907-16, 2005.
- \_\_\_\_\_. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cell Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1812-25, 2006.
- FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742-58, 2011.
- GALLI, R. et al. Toll-like receptor 3 (TLR3) activation induces microRNA-dependent reexpression of functional RARbeta and tumor regression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 110, n. 24, p. 9812-7, 2013.
- GATTIM, R. A.; GOOD, R. A. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. **Cancer**, v. 28, p. 89-98, 1971.
- GINESTIER, C. et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 5, p. 555–567, 2007.

- GRADY, W. M.; MARKOWITZ, S. D. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 3, p. 101-28, 2002.
- GRIFFITHS, A. J. F.; et al. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 8. ed., 743p, 2006.
- GRINGHUIS, S. I. et al. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1beta via a noncanonical caspase-8 inflammasome. **Nature Immunology**, v. 13, n. 3, p. 246-54, 2012.
- GURCEL, L. et al. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1135-45, 2006.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- \_\_\_\_\_. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.
- HARTMAN, Z. C. et al. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. **Cancer Research**, v. 73, n. 11, p. 3470-80, 2013.
- HERRERA, A. C. et al. Molecular subtype is determinant on inflammatory status and immunological profile from invasive breast cancer patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, n. 11, p. 2193-201, 2012.
- HISE, A. G. et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 5, p. 487-97, 2009.
- HOBSON, J. et al. Acute inflammation induced by the biopsy of mouse mammary tumors promotes the development of metastasis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 139, n. 2, p. 391-401, 2013.
- HONG, S. et al. Restoration of ASC expression sensitizes colorectal cancer cells to genotoxic stress-induced caspase-independent cell death. **Cancer Letters**, v. 331, n. 2, p. 183-91, 2013.
- HU, B. et al. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 107, n. 50, p. 21635-40, 2010.
- ILIOPOULOS, D.; HIRSCH, H. A.; STRUHL, K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. **Cell**, v. 139, n. 4, p. 693-706, 2009.
- INCA. **Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011.
- IYER, S. S. et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 106, n. 48, p. 20388-93, 2009.
- JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.
- JIN, L. et al. Expression of interleukin-1b in human breast carcinoma. **Cancer**, v. 80, p. 421-434, 1997.
- KANG, T. B. et al. Caspase-8 blocks kinase RIPK3-mediated activation of the NLRP3 inflammasome. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 27-40, 2013.
- KAPLAN, D. H. et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 95, n. 0027-8424 (Print), p. 7556-7561, 19980806 DCOM- 19980806 1998.
- KAZAMA, H. et al. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. **Immunity**, v. 29, n. 1, p. 21-32, 2008.
- KELLER, M. et al. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. **Cell**, v. 132, n. 5, p. 818-31, 2008.
- KEY, M. E. et al. Isolation of tumoricidal macrophages from lung melanoma metastases of mice treated systemically with liposomes containing a lipophilic derivative of muramyl dipeptide. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 69, p. 189-198, 1982.

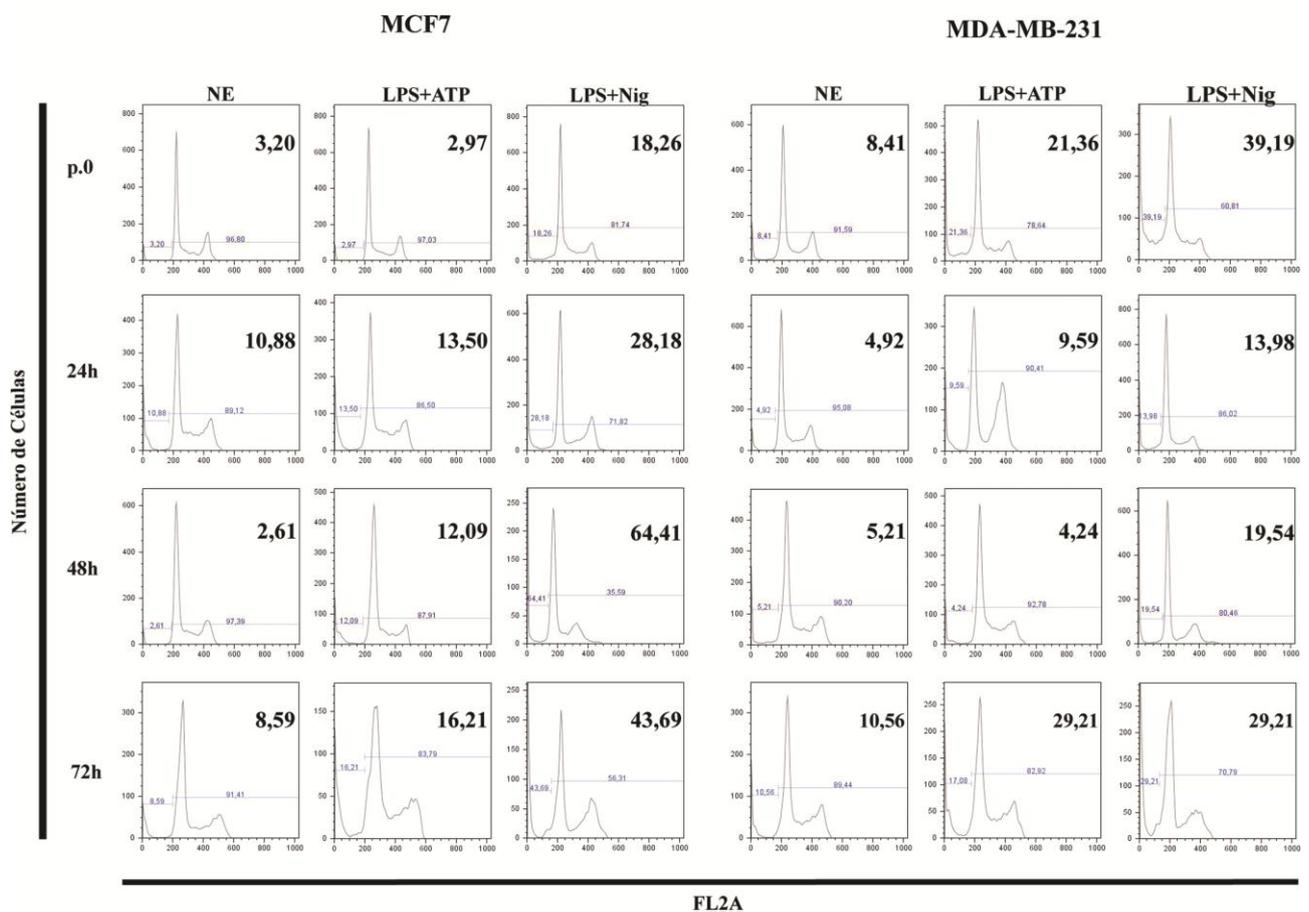
- KOFOED, E. M.; VANCE, R. E. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 592-5, 2011.
- KOPFNAGEL, V.; WITTMANN, M.; WERFEL, T. Human keratinocytes express AIM2 and respond to dsDNA with IL-1beta secretion. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 12, p. 1027-9, 2011.
- KORKAYA, H. et al. Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. **Molecular Cell**, v. 47, n. 4, p. 570-84, 2012.
- KROEMER, G. et al. Immunogenic cell death in cancer therapy. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 51-72, 2013.
- LAMKANFI, M. Emerging inflammasome effector mechanisms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 213-20, 2011.
- LAMKANFI, M. et al. Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, 2008.
- LAMKANFI, M. et al. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 7, p. 4385-92, 2010.
- LAMKANFI, M.; WALLE, L. V.; KANNEGANTI, T.-D. Deregulated inflammasome signaling in disease. **Immunological Reviews**, v. 243, p. 163–173, 2011.
- LEEK, R. D. et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Research**, v. 56, p. 4625-4629, 1996.
- LEWIS, G. E. et al. Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 57, p. 747-751, 1995.
- LI, H. et al. Cutting Edge: Inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. **The Journal of Immunology**, v. 181, p. 17-21, 2008.
- LIANG, Y.; YAN, C.; SCHOR, N. F. Apoptosis in the absence of caspase 3. **Oncogene**, v. 20, 2001.
- LIANG, X. H. et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. **Nature**, v. 402, p. 672-676, 1999.
- LIAO, K. C.; MOGRIDGE, J. Expression of Nlrp1b inflammasome components in human fibroblasts confers susceptibility to anthrax lethal toxin. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4455-62, 2009.
- MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-44, 2008.
- MARINO, N. et al. Breast cancer metastasis: issues for the personalization of its prevention and treatment. **The American Journal of Pathology**, 2013.
- MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proILb. **Molecular Cell**, v. 10, p. 417–426, 2002.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.
- MIAO, E. A.; RAJAN, J. V.; ADEREM, A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. **Immunological Reviews** v. 243, p. 206–214, 2011.
- MURRAY, J. L. et al. Prognostic value of single nucleotide polymorphisms of candidate genes associated with inflammation in early stage breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 138, n. 3, p. 917-24, 2013.
- NAITO, Y. et al. CD8+ T Cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 58, p. 3491-3494, 1998.
- NICKEL, W.; RABOUILLE, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 148-155, 2009.
- NICOLINI, A.; CARPI, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 17, n. 5, p. 325-37, 2006.
- PARKER, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1160-7, 2009.

- PEROU, C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. **Oncologist**, v. 16 Suppl 1, p. 61-70, 2011.
- PETROVSKI, G. et al. Phagocytosis of cells dying through autophagy induces inflammasome activation and IL-1 $\beta$  release in human macrophages. **Autophagy**, v. 7, n. 3, p. 321-330, 2011.
- POYET, J. L. et al. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 30, p. 28309-13, 2001.
- PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010.
- PRAT, A.; PEROU, C. M. Mammary development meets cancer genomics. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 842-4, 2009.
- RAJAMAKI, K. et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. **Plos One**, v. 5, p. e11765-e11765, 2010.
- RAJAMAKI, K. et al. Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 19, p. 13410-9, 2013.
- REED, J. R. et al. Interleukin-1beta and fibroblast growth factor receptor 1 cooperate to induce cyclooxygenase-2 during early mammary tumourigenesis. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 2, p. R21, 2009.
- REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, p. 105-111, 2001.
- ROKAVEC, M.; WU, W.; LUO, J. L. IL6-mediated suppression of miR-200c directs constitutive activation of inflammatory signaling circuit driving transformation and tumorigenesis. **Molecular Cell**, v. 45, n. 6, p. 777-89, 2012.
- SANTARPIA, L. et al. Mutation profiling identifies numerous rare drug targets and distinct mutation patterns in different clinical subtypes of breast cancers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 134, n. 1, p. 333-43, 2012.
- SCHEDIN, P.; ELIAS, A. Multistep tumorigenesis and the microenvironment. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 93-101, 2004.
- SCHMIDT, R. L.; LENZ, L. L. Distinct licensing of IL-18 and IL-1b secretion in response to NLRP3 inflammasome activation. **PLoS ONE**, v. 7, p. e45186, 2012.
- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821-32, 2010.
- SCRIVO, R. et al. Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 7, p. 369-74, 2011.
- SHANKARAN, V. et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, n. 0028-0836 (Print), p. 1107-1111, 20010427 DCOM- 20010607 2001.
- SHAO, W. et al. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 50, p. 36321-9, 2007.
- SHI, C. S. et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. **Nature Immunology**, v. 13, n. 3, p. 255-63, 2012.
- SHIN, S.; BRODSKY, I. E. Caspase-11: the noncanonical guardian of cytosolic sanctity. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 3, p. 243-5, 2013.
- SHIPITSIN, M. et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. **Cancer Cell**, v. 11, n. 3, p. 259-73, 2007.
- SLAMON, D. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v. 235, n. 4785, p. 177-182, 1987.
- SOMMERS, C. L. et al. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 31, p. 325-335, 1994.
- SOULE, H. D. et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, 1973.

- SUN, H. et al. CD44+/CD24- breast cancer cells isolated from MCF-7 cultures exhibit enhanced angiogenic properties. **Clinical and Translational Oncology**, v. 15, n. 1, p. 46-54, 2013.
- SUN, Q. et al. Caspase-1 activation is protective against hepatocyte cell death by up-regulating beclin1 and mitochondrial autophagy in the setting of redox stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 15947-58, 2013.
- VEER, L. J. V. T. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, p. 530-536, 2002.
- VESELY, M. D. et al. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 235-71, 2011.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The multistep nature of cancer. **Trends in Genetics**, v. 9, n. 4, p. 138-141, 1993.
- VOSS, M. J. et al. Luminal and basal-like breast cancer cells show increased migration induced by hypoxia, mediated by an autocrine mechanism. **BMC Cancer**, v. 11, p. 158, 2011.
- WANG, Y. et al. Cellular localization of NLRP3 inflammasome. **Protein and Cell**, v. 4, n. 6, p. 425-31, 2013.
- WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904-12, 2008.
- WILMANSKI, J. M.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; KOBAYASHI, K. S. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 1, p. 13-30, 2008.
- XIE, W. et al. Bacteria peptidoglycan promoted breast cancer cell invasiveness and adhesiveness by targeting toll-like receptor 2 in the cancer cells. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10850, 2010.
- ZAKI, M. H. et al. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 379-91, 2010.
- ZAKI, M. H.; LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T. D. Inflammasomes and intestinal tumorigenesis. **Drug Discovery Today Disease Mechanisms**, v. 8, n. 3-4, p. e71-e78, 2011.
- ZAKI, M. H. et al. IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 8, p. 4912-20, 2010.
- ZHAO, Y. et al. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 596-600, 2011.
- ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221-5, 2011.
- ZITVOGEL, L. et al. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. **Nature Immunology**, v. 13, n. 4, p. 343-51, Apr 2012.
- ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 715-27, Oct 2006.

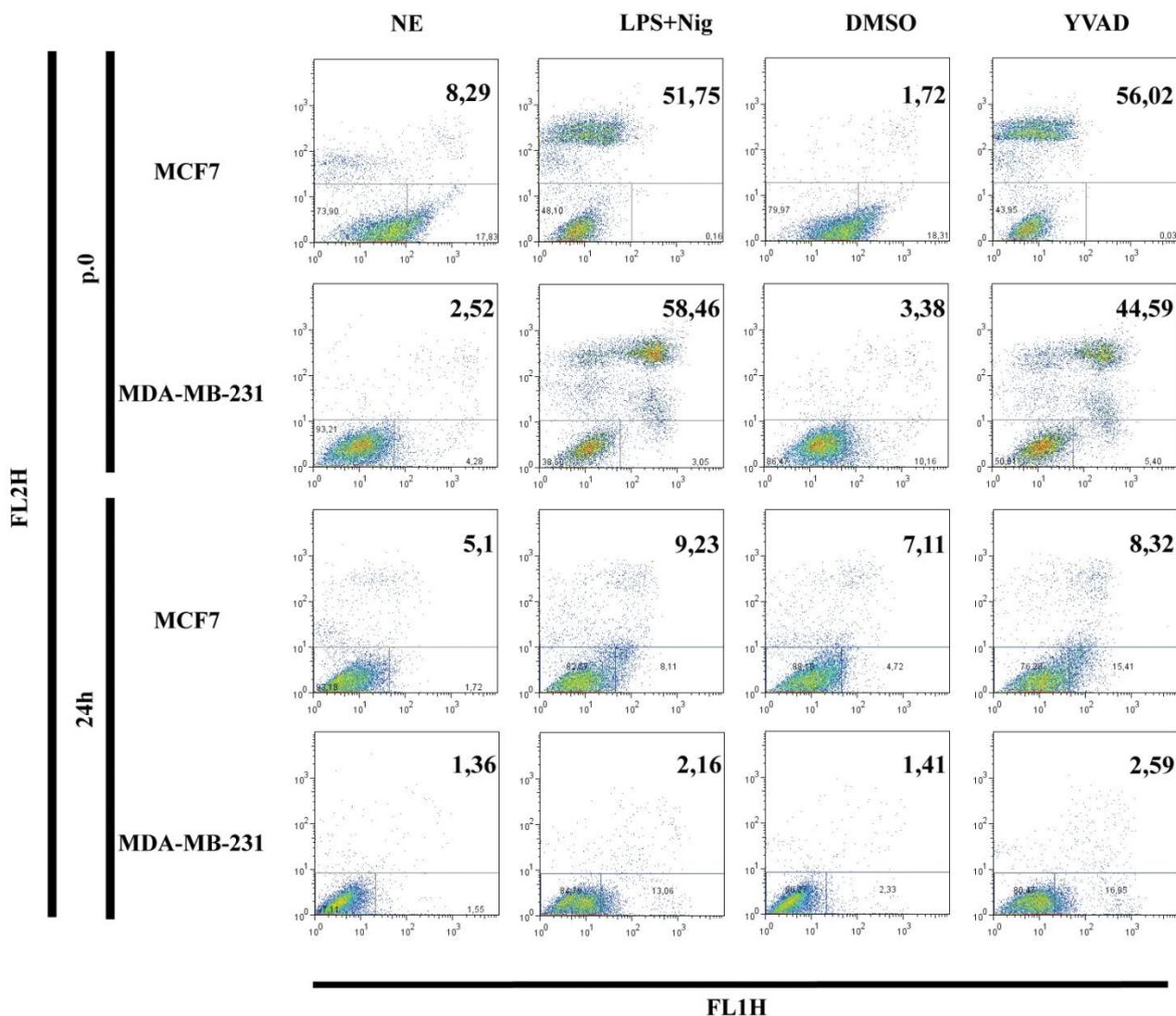
## 7. Apêndices

APÊNDICE A - Indução de fragmentação nuclear após estimulação com agonistas do inflamassoma NLRP3 em linhagens de adenocarcinoma mamário em p.0, 24h, 48h e 72h. Células estimuladas com LPS (500ng/ml overnight) e ATP (5mM, 4h) ou Nigericina (20µM, 1h) foram analisadas quanto ao seu conteúdo de DNA com iodeto de propídeo por citometria de fluxo. Gráficos representativos de dois experimentos independentes em monoplicata demonstrando em destaque a porcentagem de células em sub-G1.

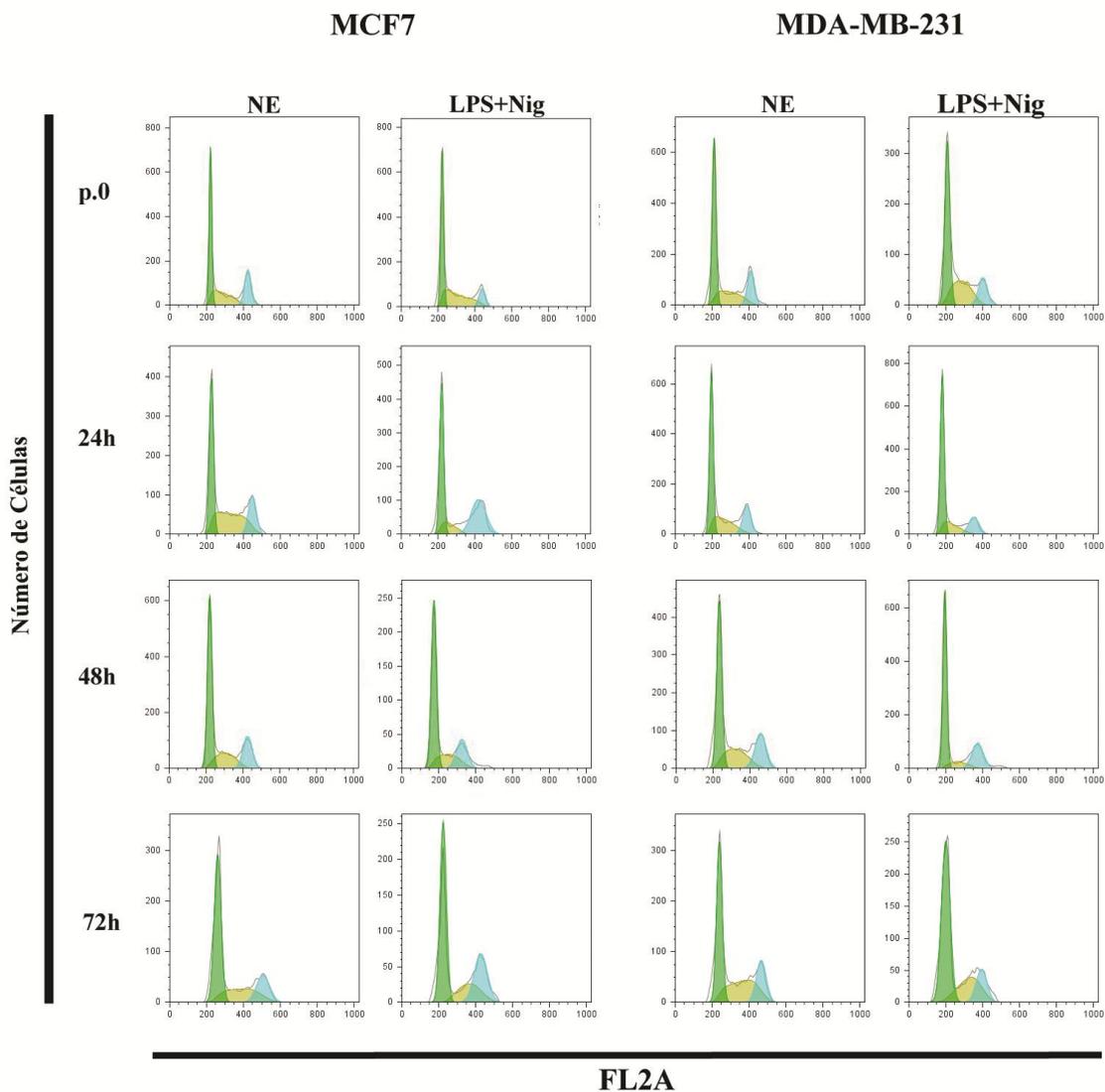


APÊNDICE B - Células de câncer mamário apresentam rompimento de membrana precoce na presença dos agonistas do NLRP3 em p.0 e 24h. As células MCF7 e MDA-MB-231 foram tratadas com LPS (500ng/ml, overnight) e Nigericina (20µM, 1h), grupo LPS+Nig, ou não tratadas, grupo NE, e marcadas com Anexina-v-FITC (FL1H) e Iodeto de Propídeo (FL2H) e analisadas por citometria de fluxo. O grupo YVAD se refere àquelas células que receberam o inibidor de caspase-1 Ac-YVAD-Cho (25µM) 1h antes da Nigericina. O grupo DMSO é o controle do YVAD, com o

volume correspondente em DMSO. Gráficos representativos de dois experimentos independentes em monoplicata, com valor destacado correspondente à porcentagem de células PI+.



APÊNDICE C - O uso de agonistas do inflamassoma NLRP3 induz alterações no ciclo celular de células de câncer de mama em p.0, 24h, 48h e 72h. Células foram tratadas com LPS (500ng/ml *overnight*) e Nigericina (20µM, 1h) e marcadas com PI (FL2A) para análise de ciclo celular por citometria de fluxo. A determinação do ciclo celular foi realizada em plataforma específica do FlowJow. São demonstrados histogramas de análise de ciclo celular representativos de dois experimentos independentes em monoplicata. Em verde, pico G0/G1; em amarelo, o pico S; em azul, a subpopulação em G2/M.



**APÊNDICE D - Efeitos do uso de agonistas do inflamassoma NLRP3 no fenótipo CD24/CD44 de células tumorais da mama em p.0 e 24h.** Após o uso dos agonistas do inflamassoma NLRP3, LPS (500ng/ml, overnight) e Nigericina (20 $\mu$ M, 1h), as células foram analisadas para a expressão dos marcadores de superfície CD24 e CD44 e analisadas por citometria de fluxo. São demonstrados gráficos representativos de dois experimentos independentes em monoplicatas. Controles isotípicos foram utilizados na marcação dos quadrantes e considerados duplo negativos.

MCF7

MDA-MB-231

