



UFRJ
faz **100**
ANOS
1920 | 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis

AQUILES MAÇÃO JUNIOR

**Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) induzem a expressão
de Fator Tecidual em carcinoma mamário humano**

Orientador: Robson de Queiroz Monteiro
Coorientadora: Karina Martins Cardoso

Rio de Janeiro
2021

AQUILES MAÇÃO JUNIOR

Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) induzem a expressão de Fator Tecidual em carcinoma mamário humano

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica. Sob orientação do Prof. Robson de Queiroz Monteiro e coorientação da Dra Karina Martins Cardoso

Rio de Janeiro

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Mação-Junior, Aquiles

Redes extracelulares de neutrófilos (NETs) induzem a expressão de Fator Tecidual em carcinoma mamário humano. Rio de Janeiro: UFRJ/IBqMLM, 2021.

76f.

Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2021.

Orientador: Robson de Queiroz Monteiro

Coorientadora: Karina Martins Cardoso

1. Transição epitélio-mesenquimal 2. Redes extracelulares de neutrófilos 3. Câncer de mama 4. Fator Tecidual I. Robson de Queiroz Monteiro II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBqM, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. III. Dissertação de mestrado.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aquiles Mação Junior

Redes extracelulares de neutrófilos (NETs) induzem a expressão de Fator Tecidual em carcinoma mamário humano

Aprovada em ____/____/____

Orientador: Robson de Queiroz Monteiro
Professor Associado do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da UFRJ

Coorientadora: Karina Martins Cardoso
Doutora em Química Biológica/UFRJ

Membro da banca: Antônio Palumbo Junior
Professor Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ

Membro da banca: João Alfredo de Moraes Gomes da Silva
Professor Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ

Membro da banca: Mariana Sá Pereira
Professora Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da UFRJ

Revisor e suplente interno: Julio Alberto Mignaco
Professor Associado do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da UFRJ

Suplente externo: Mariana Renovato Martins
Professora Adjunta do Instituto de Biologia da UFF

À minha querida mãe Cecília,
que depois de muita luta neste ano
deixou de estar presente nesse plano,
dedico essa dissertação.

AGRADECIMENTOS

À “minha velha” (*in memorian*), por ser a pessoa mais resiliente que conheci, que me mostrou todos os dias como ter leveza diante dos momentos mais difíceis. Por todo carinho, amor, compreensão e apoio ao longo de toda a minha vida. Por me mostrar o quão importante é a educação para quem não tem nada, mesmo sem nem ter tido acesso a ela. Minha mãe, até logo.

À minha “Linda”, minha mulher e minha companheira de uma vida. Por estar sempre comigo, me apoiando e me ajudando em todos os momentos, por seu amor e carinho diário. Por renunciar a tantas coisas para seguirmos juntos nessa jornada. Sem sua força, seu amor e seu apoio, esse projeto seria impossível. Te amo!

À minha pequena Julia, o meu melhor e mais perfeito projeto. Pelos dias ausentes e tão cobrados por ela, por ser esse presente que agradeço todos os dias ter recebido e por me mostrar o que é amar incondicionalmente uma pessoa. Que você continue me enchendo de alegria e amor todos os dias.

À Sil, irmã que a vida me deu. Por se doar por inteira e pensar no próximo mais do que em si mesma. Obrigado pela sua ajuda e força em momentos tão difíceis, com você tudo ficou mais leve.

Ao meu orientador, Robson Monteiro, por ter prontamente aberto as portas do laboratório para desenvolver esse projeto. Pela ajuda, apoio e orientação durante o mestrado. Por além de ser um exímio pesquisador, ser essa pessoa íntegra e humanizada em todos os momentos. Muito obrigado!

À minha “chefa” Karina, por me acolher integralmente no meio do caos. Por compartilhar comigo todos os ensinamentos, risos e lamúrias ao longo desses anos. Por oferecer o tempo que tinha e que não tinha para que esse projeto acontecesse. Sou teu fã.

Aos meus amigos do laboratório de Trombose e câncer, Fausto, Karina, Alex, Vanessa, Babi, Carol, Dani, Vitor, Juliana, Manoela e Sandra, agradeço a parceria e ajuda de sempre. Ao pessoal do Laboratório de Hemostase e Venenos: professora Lina, Taissa, Victor, Ana, Augusto, Marjory e Dário.

À professora Sandra König, pelas conversas e ensinamentos diários.

Aos meus grandes amigos que me acompanham desde sempre, Shana, Robson, Bia, Sheila, Milton e Milena. Por entenderem as minhas ausências e pelas boas risadas que dou quando estou com vocês. Quero levá-los para sempre comigo.

Aos amigos do INCa, em especial as minhas amigas e parceiras de equipe Amanda e Jana, pela ajuda profissional e emocional de sempre. Pelos nossos momentos de risos e descontração durante as nossas reuniões diárias na copa. Parece que quando entro no laboratório os problemas ficam do lado de fora.

Ao responsável pelo laboratório do INCa e amigo Jorge, por sempre incentivar, me escutar e me liberar durante todos os momentos da pós-graduação.

À minha família que direta ou indiretamente fez parte de toda minha trajetória, meu pai, meus irmãos Kirk e Kirlia e meus sobrinhos.

À família que o casamento me deu: Sueli, Nélio, Marcele, Letícia e Daniel. Vocês não têm ideia de como me ajudaram para que isso acontecesse.

Ao professor Julio Mignaco, que gentilmente aceitou revisar este trabalho e pela grande contribuição;

Aos membros da banca, professor Antônio Palumbo, professor João Alfredo de Moraes, professora Mariana Sá e professora Mariana Renovato, por terem aceitado prontamente o convite para fazer parte desta.

Ao professor Eugenio Hottz e à pesquisadora Patrícia Bozza, pela valiosa colaboração, pela recepção em seu laboratório e por ceder material para a realização deste trabalho.

Agradeço aos professores, aos funcionários que conheci no IBqM e às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPERJ e Fundação do Câncer pelo importante suporte financeiro.

RESUMO

O papel das redes extracelulares de neutrófilos (NETs) no câncer vem sendo investigado nos últimos anos, sendo este um agente comprovadamente favorável à progressão tumoral. No câncer de mama, as NETs promovem a metástase e o estabelecimento de um estado pró-trombótico. Recentemente nosso grupo observou uma cooperação entre NETs e com a ativação de um programa celular denominado transição epitélio-mesenquimal (TEM). TEM é um programa associado à aquisição de habilidades metastáticas pelas células tumorais. Além disso, dados da literatura mostram que a TEM induz a expressão do Fator Tecidual (TF), uma proteína iniciadora da coagulação sanguínea. A atividade pró-coagulante de TF e a sua contribuição na progressão do câncer é largamente descrita na literatura. Neste estudo, avaliamos o papel das NETs sobre a modulação do fenótipo pró-coagulante de células de carcinoma mamário. As linhagens celulares luminais MCF-7 e T47D foram incubadas com NETs isoladas. Foi observado um aumento da expressão gênica de TF (gene *f3*) nas células MCF-7, bem como nos níveis proteicos, observados por citometria de fluxo. As células tratadas com NETs aceleraram substancialmente a coagulação do plasma sanguíneo. Para avaliar o efeito da expressão de TF sobre a aquisição de perfil pró-metastático, utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-TF, 10H10. O tratamento de MCF-7 na presença de 10H10 atenuou o efeito de NETs sobre a expressão dos genes *CXCL8*, *IL-6* e *CD44*. Em seguida, utilizamos uma abordagem farmacológica para avaliar as vias de sinalização envolvidas na expressão de TF induzida pelas NETs. Os níveis de expressão de TF foram atenuados mediante tratamento com PD98059 e SP600125, inibidores das vias de sinalização das MAP quinases, JNK e ERK, respectivamente. Além disso, a inibição da elastase neutrofílica (presente nas NETs) atenuou a expressão de TF. Análises *in silico* utilizando dados de pacientes com câncer de mama depositados no repositório The Cancer Genome Atlas (TCGA) apontaram para uma correlação positiva entre a expressão de genes de assinatura neutrofílica e TF. Além disso, observamos uma correlação entre os níveis de expressão de TF e fatores relacionados a TEM. Esses resultados sugerem que as NETs podem contribuir para o aumento da atividade pró-coagulante no câncer de mama através da modulação da expressão de TF. Adicionalmente, TF parece estar envolvido em outros fenômenos pró-tumorais, de forma independente de sua atividade pró-coagulante.

ABSTRACT

The role of neutrophil extracellular traps (NETs) in cancer has been investigated in recent years, as this agent has been proven to be favorable to tumor progression. In breast cancer, NETs promote metastasis and the establishment of a prothrombotic state. Recently, our group observed a cooperation between NETs and the activation of a cellular program called epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT is a program associated with the acquisition of metastatic abilities by tumor cells. Furthermore, literature data show that EMT induces Tissue Factor (TF) expression, a protein that initiates blood clotting. The TF procoagulant activity and its contribution to cancer progression is widely described in literature. In this study, we evaluated the role of NETs in modulating the procoagulant phenotype of breast carcinoma cells. The luminal cell lines MCF-7 and T47D were incubated with isolated NETs. An increase in TF gene expression (*f3* gene) was observed in MCF-7 cells, as well as in protein levels, observed by flow cytometry. Cells treated with NETs substantially accelerated blood plasma clotting. To assess the effect of TF expression on the acquisition of a pro-metastatic profile, the 10H10 anti-TF monoclonal antibody was used. MCF-7 treatment in the presence of 10H10 attenuated the effect of NETs on *CXCL8*, *IL-6* and *CD44* genes expression. We then used a pharmacological approach to assess the signaling pathways involved in NET-induced TF expression. TF express levels were attenuated by treatment with PD98059 and SP600125, inhibitors of MAP kinase, JNK and ERK signaling pathways, respectively. Furthermore, the neutrophil elastase (present in NETs) inhibition attenuated TF expression. *In silico* analysis using data from breast cancer patients deposited in The Cancer Genome Atlas (TCGA) repository pointed to a positive correlation between neutrophil signatures genes expression and TF. In addition, we observed a correlation between TF expression levels and EMT-related factors. These results suggest that NETs may contribute to increase procoagulant activity in breast cancer through TF expression modulation. Additionally, TF appears to be involved in other pro-tumor phenomena, independently of its pro-coagulant activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismos regulatórios da formação das NETs.	11
Figura 2. Nets no câncer	17
Figura 3. Programa de transição epitélio-mesenquimal.	19
Figura 4. Sinalização induzida pelo complexo TF/FVIIa.....	23
Figura 5. Análise da expressão de TF em MCF-7 e T-47D.....	31
Figura 6. Análise de TF por citometria de fluxo em MCF-7 e T-47D	32
Figura 7. Análise do tempo de coagulação	33
Figura 8. Análise da inibição da sinalização induzida por TF	35
Figura 9. Análise da correlação entre os genes relacionados a neutrófilos e. TF	37
Figura 10. Análise da modulação da expressão de TF em vias de transdução de sinal e elastase neutrofílica.	40
Figura 11. Modelo proposto da indução da expressão de TF induzido pelas NETs em células de câncer de mama humano.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa dos tipos de câncer mais frequentes em homens em mulheres no Brasil	2
Tabela 2. Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama.....	4
Tabela 3. Informação sobre os primers usados nos experimentos de qPCR	28
Tabela 4. Análise de correlação entre genes da assinatura neutrofílica, genes relacionados com TEM e gene F3 em amostras de pacientes.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALDH1	Aldeído desidrogenase 1
CSC	Células-tronco tumorais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ER	Receptor de estrogênio
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GCSF	Fator estimulador de colônias granulocitárias
HER2	Receptor do tipo 2 do fato de crescimento epidermal
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MEK/ERK	Quinase ativadora da MAP quinase / Quinase regulada por sinais extracelulares
MMP	Metaloproteinase da matriz (matriz extracelular)
MPO	Mieloperoxidase
NE	Elastase neutrofílica
NETs	Redes extracelulares de neutrófilos
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PR	Receptor de progesterona
RNA	Ácidos ribonucleicos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TLR4	Receptor do tipo toll 4
TF	Fator tecidual
TGF α	Fator de crescimento transformador alfa
TGF β	Fator de crescimento transformador beta

TNF

Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	Introdução	1
1.1	Câncer	1
1.2	Câncer de mama	2
1.3	Microambiente tumoral	5
1.4	Neutrófilos	6
1.5	Redes extracelulares de neutrófilos (NETs)	7
1.6	Bases moleculares da NETose	10
1.7	NETose lítica	10
1.8	NETose vital	13
1.9	NETs e câncer	14
1.10	Transição epitélio mesenquimal (TEM) e câncer	18
1.11	Trombose e câncer	20
1.12	Fator Tecidual	21
2	Objetivos	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	Materiais e Métodos	25
3.1	Cultura de células	25
3.2	Isolamento de neutrófilos	25
3.3	Geração e isolamento de NETs	26
3.4	Extração de RNA e síntese de cDNA	27
3.5	qRT PCR em tempo real	28
3.6	Citometria de fluxo	29
3.7	Ensaio de coagulação in vitro	29
3.8	Análises de expressão gênica por bioinformática	30
3.9	Análise estatística	30
4	Resultados	31
4.1	As NETs induzem a expressão do gene F3 (TF) em linhagem de cancer de mama	31
4.2	NETs induzem a expressão da proteína TF na linhagem MCF-7	32
4.3	MCF-7 tratada com NETs apresenta um fenótipo pró-coagulante	33
4.4	A inibição da sinalização induzida por TF altera o efeito de NETs na linhagem MCF-7	34

4.5	Análise <i>in silico</i> da correlação entre marcadores gênicos de neutrófilos , TF e genes relacionados a TEM.....	36
4.6	Análise das vias envolvidas no sumento da expressão TF por NETs.....	38
5	Discussão.....	41
6	Conclusão	48
7	Pespectivas	49
7	Referências	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é a segunda causa de morte em todo o mundo. Está entre as quatro principais causas de morte de indivíduos antes dos 70 anos de idade, constituindo o principal problema mundial de saúde pública. Estima-se que, anualmente, deverão ocorrer cerca de 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes em decorrência do câncer (AVGERINOS *et al.*, 2019). Alguns fatores como o crescimento populacional, aumento da expectativa de vida e a mudança na prevalência de fatores associados ao risco de desenvolvimento da doença, contribuem para o aumento mundial não só da incidência, como também da mortalidade por câncer (INCA, 2019a).

Segundo BRAY *et al.* (2018), é possível observar um aumento dos principais tipos de câncer associados à uma melhor condição socioeconômica com a incorporação de hábitos associados ao processo de urbanização, como a inatividade física e a alimentação desbalanceada, além da associação de alguns tipos de câncer com agentes infecciosos.

De acordo com o *Global Cancer Observatory – GLOBOCAN* (2020), foi estimado o surgimento de 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo em 2020 e, dentre os três tipos mais frequentes estão o de mama, correspondendo a 11,7 % do total (2.261.419 casos), seguido pelo de pulmão, responsável por 11,4 % (2.206.771 casos), e o câncer colorretal, com 9,8 % do total de casos (1.880.725 casos). A maior incidência de novos casos é nos homens (10,1 milhões de novos casos), onde os cânceres de pulmão e próstata ocupam a primeira e segunda posições, correspondendo a 14,3 % e 14,1 % dos casos, respectivamente, seguido do câncer colorretal (10,6 % dos casos). Nas mulheres, o câncer de mama tem a maior incidência (24,5 % dos casos), seguido do câncer colorretal (9,4 % dos casos) e pulmão (8,4 % dos casos), deixando o câncer do colo do útero em quarto lugar (6,5 % dos casos) (SUNG *et al.*, 2021),

No Brasil, estima-se o a aparecimento de 625 mil novos casos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) entre 2020 e 2022. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA,2019a). A estimativa, em percentual, dos tipos de câncer mais frequentes, separados por gênero, para o próximo triênio está descrita a seguir (Tabela 1).

Tabela 1: Estimativa dos tipos de câncer mais frequentes em homens em mulheres nos anos 2020-2022 (INCA, 2019a).

Homens		Mulheres	
Tipo de câncer	Incidência (%)	Tipo de câncer	Incidência (%)
Pele não melanoma	27,1	Pele não melanoma	29,5
Próstata	29,2	Mama	29,7
Colorretal	9,1	Colorretal	9,2
Pulmão	7,9	Colo do útero	7,4
Estômago	5,9	Pulmão	5,6
Cavidade oral	5,0	Tireoide	5,4

Um conhecimento profundo da epidemiologia e incidência de câncer é de extrema importância, pois fornece informações essenciais não só sobre as possíveis causas de doenças, bem como a população atingida, o que possibilita o desenvolvimento de políticas eficientes de prevenção, rastreamento e diagnóstico da doença e possível estabelecimento de intervenções apropriadas para o tratamento (MONTAGNANA; LIPPI, 2017).

1.2. Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo mais comum de neoplasia diagnosticada mundialmente entre as mulheres, e é classificado como a principal causa de morte

neste grupo. Diferentes estudos demonstram que, anualmente, pelo menos 400.000 mulheres morrerão da doença, dentro de um universo de um milhão de casos diagnosticados. Este valor corresponde a 14% do total de mortes entre todos os tipos de câncer por ano (LI *et al.*, 2016). No Brasil, entre os anos de 2020 e 2022, estima-se que, entre 100.000 mulheres, 61,6 novos casos surgirão a cada ano. Em todas as regiões do país, esse tipo de câncer é o que apresenta maior frequência (INCA, 2019a).

A chegada das pacientes em estágios mais avançados da doença piora o seu prognóstico e tem relação com diferentes fatores, como a dificuldade de acesso das mulheres não só aos métodos diagnósticos, bem como ao tratamento. Para uma maior probabilidade de cura, é fundamental o diagnóstico precoce, visto que quanto mais cedo um tumor invasivo for detectado e o tratamento adequado iniciado, maior é a chance de sobrevivência da paciente (INCA, 2019b).

Dentre os fatores de risco para desenvolvimento de câncer de mama estão os fatores hereditários e genéticos, incluindo a história pessoal ou familiar de câncer de mama ou ovário e mutações herdadas em genes suscetíveis ao desenvolvimento da doença como BRCA1, BRCA2, dentre outros. Estes representam apenas de 5 a 10% dos casos. Diferentes estudos já demonstraram que os fatores não hereditários são os principais impulsionadores (BRAY *et al.*, 2018).

Segundo PIÑEROS *et al.* (2019), estão entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama: a idade acima de 50 anos (fator considerado como o mais importante); o excesso de peso corporal em conjunto com o sedentarismo; o consumo de álcool (considerado o maior fator de risco dietético); exposições frequentes à radiações ionizantes; o uso de terapia hormonal na menopausa; o uso de contraceptivos orais; longa história menstrual e nuliparidade. Em contrapartida, o aleitamento materno e a prática de atividade física exercem efeito protetor, diminuindo o risco de desenvolvimento da doença (PIÑEROS *et al.*, 2019). Apesar dos fatores de risco ligados aos padrões reprodutivos não serem modificáveis, a adoção de um estilo de vida saudável pode reduzir o risco de desenvolvimento da doença. Exames para detecção precoce do tumor, como a mamografia, apesar de

suas limitações, podem aumentar as opções de tratamento e, conseqüentemente, também salvar vidas (TORRE *et al.*, 2016).

Os carcinomas de mama *in situ* e invasivo apresentam uma grande variedade de tipos histológicos e moleculares. O carcinoma ductal infiltrante não específico é o tipo histológico invasivo mais comum, representando 70 a 80 % de todos os tumores de mama, seguido do carcinoma lobular infiltrante e por outros tipos histológicos (INCA, 2019b).

A classificação histopatológica do carcinoma de mama estratifica os tumores baseados no grau tumoral, no estágio e no tipo histológico, sendo o exame anatomopatológico o ponto de partida para o estudo molecular, pois por meio do material recebido, pode-se determinar, por métodos imuno-histoquímicos, o perfil de expressão, que inclui receptores hormonais e padrões de expressão proteica (VIEIRA *et al.*, 2008). Atualmente, a prática clínica normalmente usa uma classificação de cinco subtipos com base nas características histológicas e moleculares. Essa classificação é feita a partir da expressão de quatro marcadores: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e Ki-67 (Tabela 2). Os tumores que expressam ER e/ou receptor de PR são considerados cânceres de mama positivos para receptores hormonais, enquanto os tumores que não expressam ER, PR ou HER2 são classificados como cânceres de mama triplo-negativo (HARBECK *et al.*, 2019). Essa estratificação tem sido útil e estabeleceu a base para a classificação e para o tratamento dos cânceres de mama na prática clínica (YEO; GUAN, 2017).

Tabela 2: Classificação molecular por imuno-histoquímica dos tumores de mama (Adaptado de LI *et al.*, 2015).

Subtipos Moleculares	Padrão de Imunomarcção				
Luminal A	ER+	e/ou	PR+	HER2-	< 14% Ki 67
Luminal B	ER+	e/ou	PR+	HER2 +	≥ 14% Ki 67
				HER2 -	
HER2	ER-		PR-	HER2+	
Basal-like / Triplo negativo	ER-		PR-	HER2-	

1.3. Microambiente tumoral

O tecido tumoral compreende uma gama de populações celulares que contribuem para a manutenção e progressão do câncer. Além das próprias células malignas, células do estroma e células do sistema imune compõem o microambiente tumoral (HANAHAN; COUSSENS 2012). Sua atuação envolve múltiplos passos na progressão do tumor, desde a sua iniciação, crescimento do tumor primário, evasão da resposta imune, angiogênese, até o extravasamento de células metastáticas invadindo outros órgãos distantes do tumor primário, estabelecendo a metástase (HANAHAN; COUSSENS, 2012; YUAN *et al.*, 2016).

O microambiente tumoral suporta a inflamação crônica. Inúmeros fatores secretados podem estimular as células tumorais, aumentando sua agressividade e capacidade metastática (YANG; LIN 2017). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas (IL-8, IL-6, IL-1 β), fatores de crescimento (fator de crescimento transformador beta - TGF- β , fator de crescimento epidérmico - EGF), dentre outros mediadores pró-tumorais, leva à ativação das células tumorais causando modificações oncogênicas e resistência às terapias clínicas existentes.

Esses fatores podem ser provenientes das células imunológicas infiltradas no microambiente tumoral (YANG; LIN 2017) ou até mesmo das próprias células tumorais que, conseqüentemente, recrutam células inflamatórias para o ambiente intratumoral (MANTOVANI *et al.*, 2008). Essa interação entre as células imunes e as células tumorais têm sido amplamente estudada. O olhar para as células imunes presentes no microambiente tumoral está revolucionando as estratégias terapêuticas, sendo o exemplo mais recente a utilização de inibidores imunes de checkpoint (GARNER; DE VISSER, 2020).

Os neutrófilos associados ao tumor vêm sendo pauta para intensas discussões. Isso porque o seu papel sobre a progressão tumoral é controverso. Estudos divergentes apontam para a associação de neutrófilos com respostas pró- ou antitumorais (SENGUPTA *et al.*, 2019). Uma das hipóteses levantadas é a polarização do perfil fenotípico dos neutrófilos, apresentando características anti-inflamatórias (N1) ou pró-inflamatórias (N2) (SHAUL; FRIDLENDER, 2019). Na maior parte dos

tipos tumorais, a presença de neutrófilos no microambiente tumoral está associado a um pior prognóstico (SHAUL; FRIDLENDER, 2019).

1.4. Neutrófilos

Os neutrófilos, também denominados de células polimorfonucleares, são os leucócitos mais abundantes na circulação (50 a 70 %) e têm como principal função a proteção do organismo contra infecções por patógenos como bactérias, leveduras e fungos (NAUSEEF; BORREGAARD, 2014). São considerados um componente crítico do sistema imune inato, atuando na linha de frente de defesa. São reconhecidos por exercerem papel principal na inflamação aguda e, normalmente, são os primeiros leucócitos a serem recrutados para o sítio da inflamação. São capazes não só de conter, como também eliminar patógenos através de diferentes mecanismos (HAMPSON *et al.*, 2013).

Neutrófilos são células arredondadas, com diâmetro entre 10 e 14 µm, com núcleos formados por até cinco lóbulos. O citoplasma dos neutrófilos apresenta, de forma predominante, vesículas secretórias e grânulos, que podem ser classificados como grânulos primários ou azurofílicos, que são formados durante a maturação do neutrófilo e têm como característica a presença da enzima mieloperoxidase (MPO), além de moléculas de caráter proteico como defensinas, lisozima, elastase neutrofílica (NE), dentre outras, que conferem uma importante atividade antimicrobiana. Os grânulos denominados secundários ou específicos, ao contrário dos primários, são negativos para MPO. Estes são formados após os grânulos azurofílicos e apresentam a glicoproteína lactoferrina, além de vários componentes antimicrobianos e lisozima (AMULIC *et al.*, 2012). Outros tipos de grânulos são os terciários e quaternários. Os grânulos terciários apresentam metaloproteinases (MMPs) como componente majoritário, incluindo a gelatinase e a leucolisina. Durante os últimos estágios de maturação dos neutrófilos são formados os grânulos quaternários ou vesículas secretórias. Em seu interior observa-se, predominantemente, proteínas derivadas do plasma, visto que sua formação se dá por endocitose (AMULIC *et al.*, 2012; MAYADAS *et al.*, 2014).

A importância dos neutrófilos na defesa do hospedeiro é amplamente descrita na literatura. Desde sua descoberta, os neutrófilos são reconhecidos como células inflamatórias potentes. Sua ação se inicia com a migração para o local de infecção ou inflamação para a contenção de agentes infecciosos (MULLER, 2013). Suas estratégias de ação envolvem a capacidade fagocitária dos microrganismos, expondo-os às enzimas proteolíticas e microbidas contidas nos grânulos intracelulares (MAYADAS *et al.*, 2014). Outro mecanismo de defesa do neutrófilo é o processo denominado degranulação. Os grânulos contendo proteinases e peptídeos antimicrobianos se fundem com a membrana plasmática, levando à liberação extracelular de seu conteúdo (TENG *et al.*, 2017). Além do processo de fagocitose, com subsequente destruição do patógeno via produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ação de enzimas proteolíticas, os neutrófilos também apresentam como mecanismo de defesa a liberação de redes extracelulares (NETs) com atividade antimicrobiana. Ao detectar a entrada de bactérias, por exemplo, o neutrófilo libera uma estrutura semelhante a uma malha, composta por ácido desoxirribonucleico (DNA), grânulos peptídeos antimicrobianos e enzimas, em um processo denominado NETose (BRINKMANN, 2018).

1.5. Redes extracelulares de neutrófilos (NETs)

As NETs foram descritas pela primeira vez por BRINKMANN *et al.*, em 2004, como estruturas extracelulares grandes, em forma de teia, compostas por milhares de filamentos entrelaçados de, aproximadamente, 15~17 nm. Apresentam, em sua composição, estruturas de DNA revestidas com diversas proteínas, incluindo histonas, proteínas granulares e citoplasmáticas, muitas com atividade pró-inflamatória e antimicrobiana. O sistema imune inato utiliza as NETs como mecanismo de resposta a estímulos patológicos e fisiológicos. As principais funções das NETs são de capturar, neutralizar e matar microrganismos como bactérias, fungos, vírus e parasitas, prevenindo, desta forma, a disseminação destes pelo organismo (PAPAYANNOPOULOS, 2018).

Diversas proteínas foram inicialmente encontradas nas NETs, a maioria de origem granular, algumas nucleares e citoplasmáticas, incluindo a elastase de neutrófilos (NE), MPO, catepsina G, proteinase-3 (PR3), lactoferrina, lisozima, gelatinase, calprotectina, defensinas e catelicidinas. Essas proteínas se originam de todos os diferentes grânulos dos neutrófilos (azurófilos, específicos e terciários), além do citoplasma e citoesqueleto. (BRINKMANN, 2018; MOSCHONAS; TSELEPIS, 2019). A formação das NETs resulta em uma alta concentração local de proteases o que favorece a captura e eliminação de patógenos pelos neutrófilos (CEDERVALL *et al.*, 2018).

A formação e posterior liberação de NETs, um processo que foi denominado NETose, pode ser observado em diferentes tipos de doenças, tais como doenças inflamatórias crônicas, doenças autoimunes e câncer. Apesar de essencial nas respostas imunes às infecções, a produção de NETs precisa ser extremamente regulada, pois a eliminação reduzida e/ou a produção excessiva destas podem ter diversos efeitos patológicos, podendo servir como alvo para a produção de anticorpos (BRANZK; PAPAYANNOPOULOS, 2013). Seu excesso pode tornar-se responsável por induzir lesão tecidual, visto que seus componentes podem não ser específicos apenas para patógenos, mas também podem interagir com diferentes células, tecidos e órgãos, causando danos (BONAVENTURA *et al.*, 2018).

Segundo BRANZK *et al.* (2014), essas armadilhas de defesa persistem por vários dias após sua liberação e a enzima responsável por sua dissolução é a DNase I. Em estudo realizado por KOLACZKOWSKA *et al.* (2015) em camundongos com infecção sistêmica por *Staphylococcus aureus*, observou-se uma rápida degradação das NETs, mediante o tratamento com a enzima DNase I por via intravenosa, nos animais. Entretanto, a dinâmica de depuração das NETs por enzimas endógenas é pouco compreendida. Segundo FARRERA & FADEE (2013) é possível que existam mecanismos adicionais de depuração, visto que as proteínas das NETs persistem por muito tempo após a degradação. Os autores sugerem que essa “limpeza” seja realizada por macrófagos já que, *in vitro*, a DNase I facilita a fagocitose das NETs por estas células (FERRERA; FADEL, 2013).

Anteriormente, pensava-se que as NETs eram formadas em apenas poucos minutos após a estimulação dos neutrófilos. Entretanto, observou-se posteriormente que estas eram liberadas apenas pelos neutrófilos de 3 a 4 horas após ativação (RAVINDRAN *et al.*, 2019). Apenas um terço dos neutrófilos consegue utilizar essa estratégia e, segundo BRINKMANN *et al.* (2004) e CLARK *et al.* (2007), esta via de ativação parece envolver receptores do tipo *Toll*, Fc (receptores para a região Fc da imunoglobulina) e citocinas.

A formação e liberação das NETs foi descrita inicialmente como um novo tipo de morte celular. Entretanto, em 2012, YIPP *et al.* descreveram que existem, pelo menos, duas formas distintas de liberação das NETs: uma delas requer a lise celular, resultando na morte do neutrófilo – NETose lítica - enquanto a outra forma, mecanismo não letal, não requer o rompimento da membrana citoplasmática – NETose vital – o que permite que os neutrófilos permaneçam viáveis e migrando pelo tecido, mesmo algum tempo após a liberação do conteúdo nuclear ao exterior (YIPP *et al.*, 2012). O processo de NETose lítica, resultante da expulsão das NETs por lise celular, é lento, o que permite a abertura de uma janela temporal na qual os patógenos podem estabelecer um processo infeccioso (BRANZK; PAPAYANNOPOULOS, 2013; DA-SILVA; FINOTTI, 2019). Entretanto, no mecanismo alternativo de NETose vital, onde não ocorre a lise da célula, há uma liberação rápida das NETs após alguns minutos de exposição ao estímulo, através da secreção da cromatina e dos conteúdos granulares (YIPP *et al.*, 2012).

Apesar de um dos mecanismos de NETose resultar na morte do neutrófilo, esta apresenta características distintas dos outros tipos de morte celular, como a apoptose e a necrose. Enquanto na necrose e na apoptose há a exposição de fosfatidilserina, o mesmo não ocorre na NETose (KENNY *et al.*, 2017). Não há desintegração de membranas e organelas, nem a formação de bolhas na membrana, somente vacuolização da célula. O DNA não sofre fragmentação, conforme ocorre nos outros tipos de morte celular (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2012; REMIJSSEN *et al.*, 2011). A cromatina se descondensa na NETose, ao contrário da apoptose, onde observa-se uma condensação nuclear e posterior fragmentação do mesmo (ELMORE, 2007).

1.6. Bases moleculares da NETose

Diversos estímulos podem ser indutores do processo de NETose, estejam eles presentes no contexto da inflamação estéril ou de uma infecção. Dentre eles estão os patógenos como bactérias (BRINKMANN *et al.*, 2004), vírus (RAFTERY *et al.*, 2014), fungos (URBAN *et al.*, 2006), protozoários (SOUSA-ROCHA *et al.*, 2015), plaquetas ativadas (CLARK *et al.*, 2007), anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (BEN-SMITH *et al.*, 2001), peptídeos derivados do complemento (YOUSEFI *et al.*, 2009), citocinas inflamatórias como IL-8 (BRINKMANN *et al.*, 2004) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (GARCIA-ROMO *et al.*, 2011), fumaça de cigarro (QIU *et al.*, 2017), peróxido de hidrogênio (FUCHS *et al.*, 2007), cristais de urato (MITROULIS *et al.*, 2011), além de compostos artificiais como o forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e ionóforo de cálcio, que são utilizados em estudos *in vitro* (FUCHS *et al.*, 2007). Estes mecanismos podem ser dependentes da ativação de NADPH oxidase, que apresentam como agonistas compostos e microrganismos citados anteriormente como o PMA, LPS, bactérias e outros; ou independentes da NADPH oxidase que, entre os quais estão os ionóforos de cálcio e cristais de urato (RAVINDRAN *et al.*, 2019).

O processo de NETose tem início no interior do neutrófilo. Após a ação de um ou mais fatores desencadeadores, o neutrófilo sofre alterações morfológicas, como a perda de seu formato arredondado, tornando-se mais plano. O núcleo da célula perde sua morfologia lobular, adquirindo uma forma arredondada, e o envoltório nuclear é rompido (VOROBEVA; PINEGIN, 2014).

1.7. NETose lítica

De todos os mecanismos de formação de NETs, o Nox2-dependente é o mais bem descrito na literatura. A liberação de NETs via morte celular é um evento irreversível e requer a produção de ROS geradas pela ativação da NADPH oxidase ao se ligar à membrana do fagossomo (BRINKMANN, 2018). Foi proposto por REMIJSSEN *et al.*, (2011) que a capacidade oxidativa das ROS seria capaz de bloquear o processo de apoptose pela inativação das caspases, e poderia levar a célula à

autofagia, quando em associação a outros estímulos, o que promoveria a dissolução das membranas celulares. Estes radicais produzidos pela NADPH oxidase são responsáveis por dois importantes caminhos para a NETose: (1) a dissociação de grânulos azurófilos, liberando duas enzimas, NE e MPO, que são encaminhadas para o núcleo da célula e; (2) a ativação da enzima peptidil arginina deaminase 4 (PAD4), que desempenha um importante papel na descondensação da cromatina (LI *et al.*, 2010) (Figura 1).

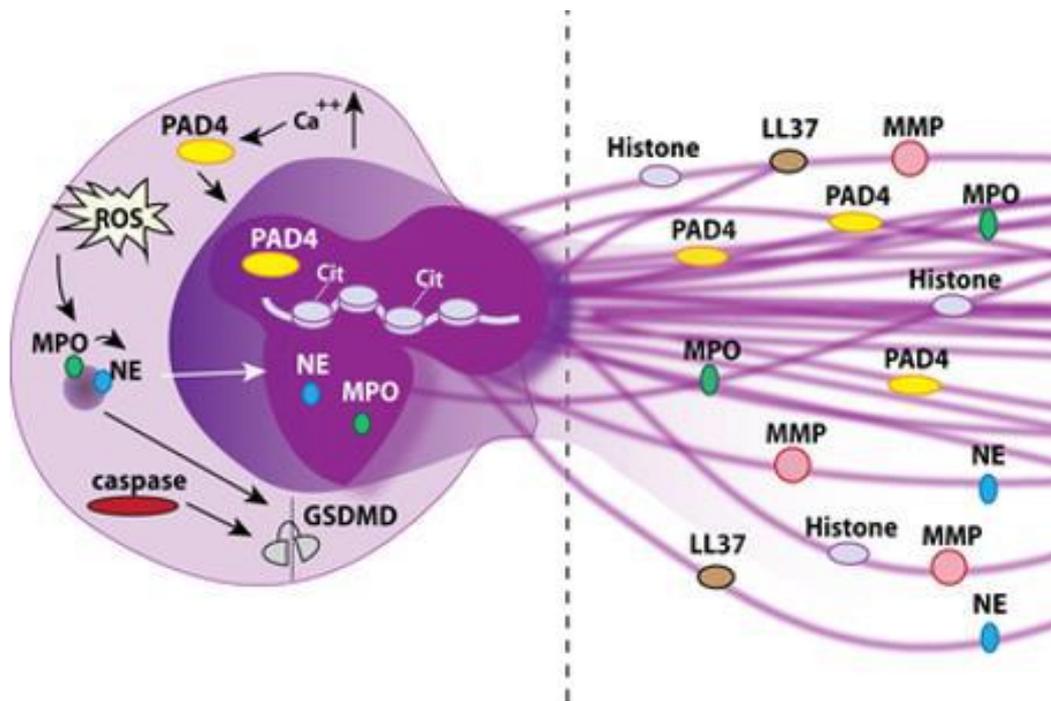


Figura 1: Representação dos mecanismos regulatórios da formação das redes extracelulares de neutrófilos (NETs). A partir de diferentes estímulos, ocorre uma rápida ativação da NADPH oxidase e conseqüentemente gerando um aumento de ROS. O DNA liberado segue acompanhado de proteínas granulares localizadas no citoplasma dos neutrófilos, como NE, MPO e PAD4 (SORVILLO *et al.*, 2019).

Quando o neutrófilo é ativado, ocorre a liberação de cálcio do retículo endoplasmático para o citosol, que resulta na ativação da proteína quinase C (PKC) e posterior fosforilação de gp91-phox/Nox2 (KAPLAN; RADIC 2012). A ação do complexo NADPH oxidase transfere elétrons de NADPH, o que provoca a redução do oxigênio molecular (O₂) em ânion superóxido (O₂⁻) que, posteriormente é convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela ação da superóxido dismutase (SOD), processo conhecido como *burst* respiratório, ou pode ainda reagir com o óxido nítrico

(NO) e formar o peroxinitrito (ONOO-) (MOSCHONAS; TSELEPIS, 2019; BORREGAARD, 2010).

Em 2007, FUCHS *et al.*, observaram que a incubação prévia de neutrófilos com inibidores de NADPH oxidase impedia a formação de NETs. Os mesmos autores descreveram também que pacientes portadores de doença granulomatosa crônica, não conseguem produzir NETs devido a uma deficiência na gp91-phox. Em consequência, os pacientes são mais propensos à infecções recorrentes e graves (BIANCHI *et al.*, 2009).

A ativação de PAD4 promove a citrulinação das histonas H3, H2A e H4, através da desaminação dos resíduos de arginina carregados positivamente, gerando citrulina. A citrulinação das histonas leva à perda de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre as histonas e o DNA, o que culmina no evento de descondensação da cromatina (MOSCHONAS; TSELEPIS, 2019). A arginina é parte integrante da cauda de histonas que interagem com o DNA. Durante a citrulinação, a mudança de carga desse aminoácido reduz a interação das histonas com o DNA, resultando em um relaxamento da compactação de ácido nucleico e a perda dos lóbulos nucleares (WANG *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* demonstraram que a NE por si é capaz de descondensar a cromatina, entretanto é possível que outros mecanismos desconhecidos estejam envolvidos no desmonte do núcleo (PAPAYANNOPOULOS *et al.*, 2010).

A NE, além de degradar o citoesqueleto de actina no citoplasma, também sofre translocação para o núcleo da célula, atua sobre a histona H1 e modifica as histonas matrizes, degradando-as parcialmente. Posteriormente, a MPO se liga à cromatina e age de forma sinérgica com a NE, eventos estes que contribuem para a descondensação da cromatina e subsequente formação das NETs (PAPAYANNOPOULOS, 2018).

A produção de ROS via MEK-ERK (quinase da proteína quinase ativada por mitógeno/ quinase regulada por sinais extracelulares) desencadeia uma outra via – da MPO – para a liberação de NETs. A MPO ativa, de forma oxidativa, a NE, liberando-a dos grânulos azurófilos. Além da NE, são liberadas também azurocina, do complexo denominado azuroma (contém MPO, lactoferrina, lisozima e proteinase 3). Após a

saída dos grânulos, a protease se liga ao citoesqueleto e é ativada pelo complexo H₂O₂/MPO, iniciando a degradação da actina F. Essa etapa é importante na imobilização dos neutrófilos, que possibilita a liberação das redes de neutrófilos, no local exato da infecção, facilitando o rompimento da membrana plasmática antes da expulsão das NETs (METZLER *et al.*, 2014; PAPAYANNOPOULOS *et al.*, 2010).

1.8. NETose vital

Diferente da NETose lítica, a NETose vital, como a própria denominação diz, é um processo no qual não ocorre a morte da célula. Nesta, a liberação de NETs e os eventos convencionais de defesa do hospedeiro (recrutamento de leucócitos, quimiotaxia e fagocitose) coexistem. Vários autores já demonstraram essa via alternativa de NETose utilizando marcadores de alta afinidade para componentes nucleares que são impermeáveis à membrana de células viáveis, ou através da liberação de DNA mitocondrial sem causar lise e morte da célula (CLARK *et al.*, 2007; YOUSEFI *et al.*, 2008; YOUSEFI *et al.*, 2009).

Existem algumas diferenças básicas entre os dois tipos de NETose. A primeira é a natureza do estímulo e tempo de liberação de NETs. Enquanto na NETose lítica, o fator estimulador mais descrito é o PMA e o tempo de liberação dessas NETs é longo, na NETose vital, um estímulo bacteriano gram-negativo, o LPS, induz esta liberação em poucos minutos. Uma outra diferença entre os dois tipos de NETose depende da capacidade funcional dos neutrófilos que, em modelo animal de infecção bacteriana, demonstrou a manutenção da capacidade de promover a quimiotaxia e fagocitose de bactérias vivas, tornando-se citoplastos anucleares (YIPP; KUBES, 2013).

Por último, outra fundamental diferença entre os tipos de NETose depende dos mecanismos pelos quais ocorre a liberação das NETs. Enquanto na versão lítica ocorre a ativação de NADPH oxidase (HAKKIN *et al.*, 2011), culminando na descondensação da cromatina, extrusão das proteínas granulares e perfuração da membrana plasmática, na NETose vital, observa-se o tráfego vesicular do DNA para o espaço extracelular através da coalescência destas vesículas à membrana

plasmática, sem lise da mesma e, conseqüente liberação de NETs (PILSCZEK *et al.*, 2010).

Ao final de ambos os tipos de NETose, as NETs formam uma barreira física, o que impede que os microrganismos se disseminem e, além disso, aumenta a concentração de produtos microbicidas no local (ROCHA *et al.*, 2015).

1.9. NETs e câncer

A formação de NETs já foi previamente descrita no câncer, podendo esta exercer uma atividade protetora contra o tumor ou a favor deste. Sua atividade protetora está associada aos próprios componentes das NETs, como a MPO, algumas proteinases e histonas, que são capazes não só de inibir a progressão e crescimento tumorais, como também a disseminação das células tumorais para outros locais (MASUCCI *et al.*, 2020). Entretanto, diversos estudos demonstram o papel favorável desempenhado pelas NETs não só na progressão tumoral (JUNG *et al.*, 2019), quanto na sua capacidade metastática (onde proteinases presentes nas NETs podem degradar a matriz extracelular e permitir a disseminação das células tumorais) e na trombose associada ao câncer (HOMA-MLAK *et al.*, 2016),

Estudos recentes, em modelo animal, sugerem uma importante atuação das NETs na metástase (PARK *et al.*, 2016). De acordo com SNODERLY *et al.*, (2019), as NETs também estão presentes no microambiente tumoral e os principais fatores desencadeadores do processo de NETose em tumores, são a IL-8 e o fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF).

As células tumorais atraem, de forma quimiotática, os neutrófilos através da secreção de IL-8, que se liga aos receptores CXCR1 e CXCR2, expressos pelos neutrófilos. Como resultado, os neutrófilos são atraídos para locais de inflamação (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). Níveis aumentados de IL-8 já foram descritos por apresentarem forte correlação com a progressão do câncer de mama pois, se comparadas às pacientes saudáveis, as mulheres acometidas pela doença

apresentam níveis séricos desta citocina extremamente elevados (KOZŁOWSKI *et al.*, 2003).

Outro fator importante para o desencadeamento da liberação de NETs é a superexpressão de G-CSF no câncer. Em estudo realizado por DEMERS *et al.*, (2012), foram avaliados os níveis de G-CSF no soro de camundongos C57BL/6 portadores de neoplasia mieloproliferativa tipo leucemia mieloide crônica induzida. Observou-se que, em comparação aos camundongos saudáveis, os níveis séricos de G-CSF estavam elevados. Além disso, foi realizada a imunocoloração de neutrófilos isolados, que revelou uma hipercitrulinação da histona H3, o que corrobora sua predisposição para a formação de NETs, concluindo-se que o G-CSF ativa e atrai neutrófilos, estimula o metabolismo oxidativo, produzindo ROS e, de forma subsequente, leva ao processo de NETose.

Em 2016, PARK *et al.* avaliaram a relação entre a formação de NETs e a metástase. Em ensaio realizado com células *knockdown* para a citocina CXCL1, que normalmente é secretada por células de tumores de mama, observou-se a redução de neutrófilos no sítio tumoral, o que sugere que estas células promovam a metástase após seu recrutamento pelas células tumorais. Outro achado desse estudo foi que células de tumor de mama da linhagem 4T1, quando cocultivadas com neutrófilos, apresentam um aumento na sua capacidade invasiva. Para corroborar com esses achados, as células 4T1 foram tratadas com anticorpo anti-GCSF, o que reduziu, de forma significativa, a sua capacidade de induzirem a liberação de NETs. Em tumores humanos, as NETs também apresentam correlação com a progressão tumoral e capacidade metastática. Diferentes tipos de tumores são capazes de aumentar os níveis plasmáticos de NETs nos pacientes quando comparados com pessoas saudáveis (OKLU *et al.*, 2017).

Em estudo recente, YANG *et al.* (2020) avaliaram a presença de NETs em tumores de mama primários e lesões metastáticas de 544 pacientes. Foram utilizados marcadores específicos tanto para a presença de neutrófilos (MPO) quanto para NETose (H3Citl – histona 3 citrulinada). Observou-se que, apesar de rara presença de NETs em tumores primários, estas foram abundantes nas lesões metastáticas (fígado, pulmões, ossos e cérebro), principalmente nas metástases hepáticas. Corroborando

com esses dados, os pacientes com lesões metastáticas no fígado apresentaram níveis plasmáticos de NETs (observados pela presença do complexo MPO-DNA no plasma) significativamente mais altos se comparados os pacientes que apresentavam diferentes sítios metastáticos.

A participação das NETs em processos metastáticos também foi descrita por LEE *et al.* (2019). Os autores observaram a presença de NETs no omento de mulheres com câncer de ovário em estágios iniciais, assim como em camundongos exibindo tumores ovarianos ainda não palpáveis, sugerindo uma resposta precoce dos neutrófilos em resposta à presença do tumor, com formação de NETs nos sítios pré-metastáticos. A presença de neutrófilos e de NETs seria capaz de proporcionar um microambiente favorável para a adesão de células cancerígenas longe do tumor primário (Figura 2).

Além de sua capacidade de favorecer a progressão tumoral e metástase, as NETs apresentam forte correlação com alterações de coagulação em pacientes portadores da doença. De acordo com estudo realizado por JUNG *et al.* (2019), pacientes portadores de câncer pancreatobiliar apresentam marcadores circulantes de NET aumentados (complexo DNA-histona e DNA extracelular) em relação aos indivíduos saudáveis, assim como marcadores de hipercoagulabilidade (micropartículas e ETP – potencial de trombina endógena) também alterados.

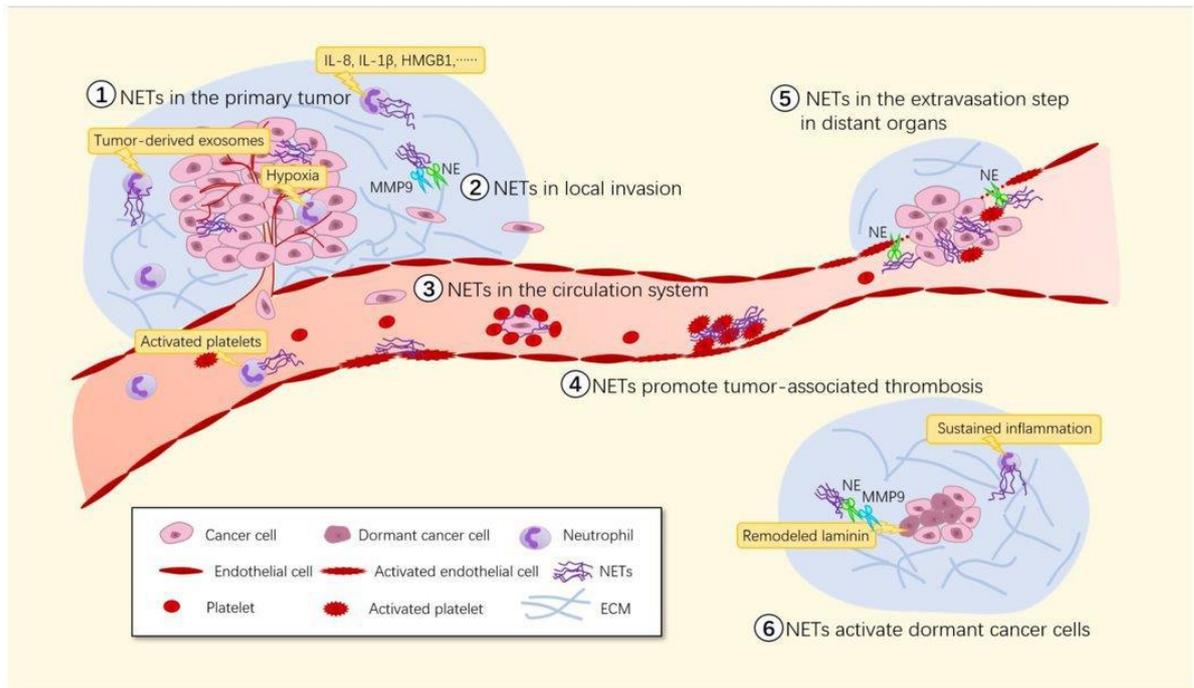


Figura 2: NETs no câncer. As NETs foram descritas representando um papel importante em diferentes momentos da progressão tumoral, tais como: 1) A existência de NETs promove o crescimento do tumor primário por meio do efeito direto dos componentes do NET nas próprias células tumorais e do efeito indireto dos NETs em outros componentes do microambiente tumoral. 2) As proteases em NETs podem degradar a matriz extra-celular. 3) Os NETs podem cobrir as células tumorais, criando uma barreira física contra as células imunes. 4) Podem participar na formação da trombose associada ao câncer 5) As NETs podem facilitar o extravasamento das células tumorais da circulação para o novo sítio metastático. (CHEN *et al*, 2021).

ABDOL RAZAK *et al.* (2017) demonstraram que células de câncer pancreático humanas, da linhagem AsPC-1, mesmo quando cocultivadas com neutrófilos isolados de indivíduos saudáveis, são capazes de estimular uma rápida liberação de NETs e, por consequência à formação destas, é criado um arcabouço para adesão plaquetária e futura formação de trombos. Em pacientes com câncer gástrico também foi observado um aumento expressivo de liberação de NETs pelos neutrófilos isolados destes pacientes, comparados a pacientes saudáveis, assim como sua capacidade de estimular a geração de trombina e fibrina pelo plasma (YANG *et al.*, 2015).

1.10. Transição epitélio mesenquimal (TEM) e câncer

A transição epitélio mesenquimal (TEM) é um programa celular reversível que, transitoriamente, leva as células epiteliais a perderem sua característica morfológica poliédrica adotando uma morfologia mais fusiforme, característica de uma célula mesenquimal (NIETO, 2009; NIETO *et al.*, 2016; THIERY *et al.*, 2009). A TEM desempenha um importante papel em diversos processos fisiológicos tais como na embriogênese, na cicatrização de feridas e fibrose tecidual. Entretanto, não ocorre somente de forma fisiológica, participando de processos patológicos como na progressão do câncer (SHIBUE; WEINBERG, 2017).

Sinais provenientes do microambiente tumoral podem conferir maior agressividade às células tumorais. Um dos efeitos associados aos polimorfonucleares infiltrados no tumor é a ativação da transição epitélio-mesenquimal (TEM) das células malignas (HU *et al.*, 2015; SUAREZ-CARMONA *et al.*, 2017). Este processo modifica o fenótipo da célula epitelial para um fenótipo mesenquimal e, conseqüentemente, suas habilidades funcionais (NIETO *et al.*, 2016).

Durante o processo, fatores transcricionais das famílias Zeb, Snail e Twist são modulados, levando à repressão de fatores característicos de células epiteliais, como por exemplo a proteína de junção celular, E-caderina (NIETO *et al.*, 2016). Consecutivamente, genes mesenquimais passam a ser expressos, como a N-caderina. Além disso, o citoesqueleto também sofre um rearranjo, onde a morfologia celular se torna menos diferenciada, fator também observado com a superexpressão da proteína filamentosa de citoesqueleto vimentina. O formato celular torna-se fusiforme, com a perda da polarização apical-basal, depositada frouxamente sobre a matriz extracelular. O aumento de MMPs, cuja atividade enzimática envolve a digestão da matriz extracelular facilitando a invasão celular nos tecidos, também é observado em células mesenquimais (YEUNG; YANG, 2017) (Figura 3).

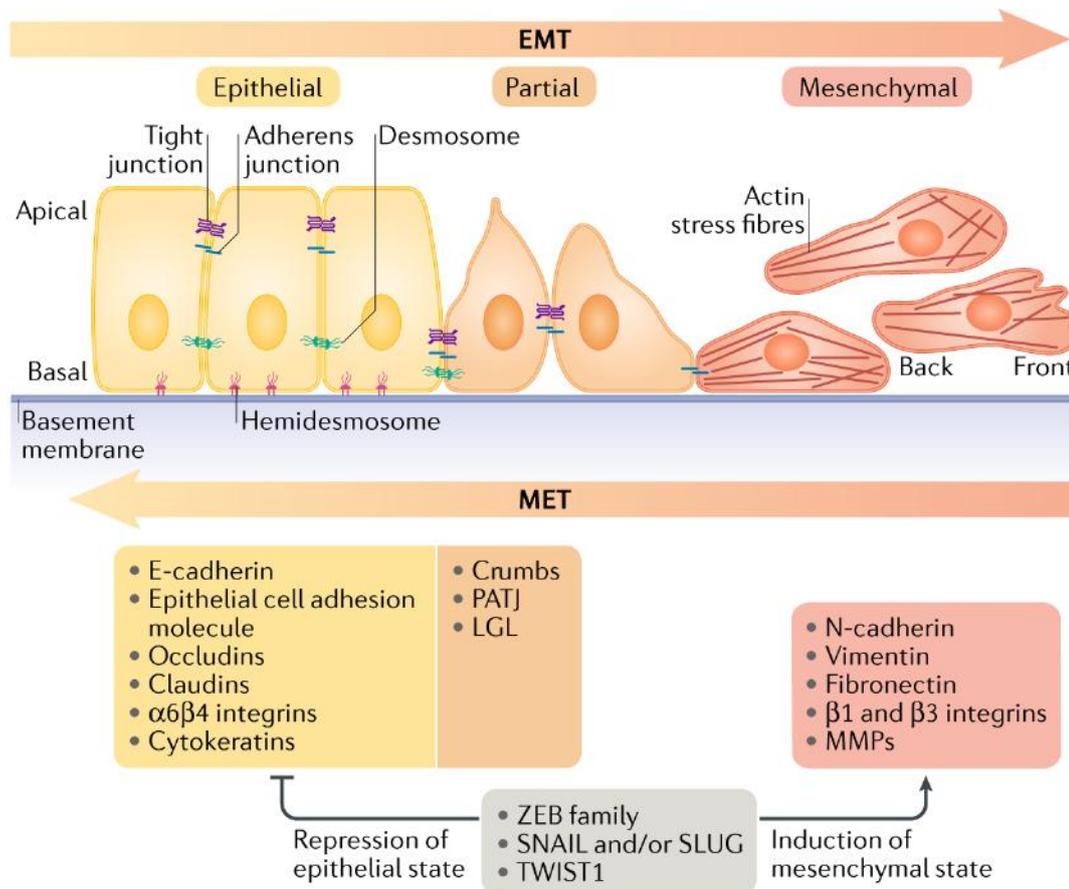


Figura 3: Representação esquemática do programa de transição epitélio mesenquimal. A indução da TEM pode acontecer a partir de diferentes estímulos. Esse programa envolve a expressão dos fatores de transcrição indutores de TEM (ZEB, SNAIL e TWIST), inibição da expressão de genes associados ao estado epitelial e ativação da expressão de genes associados ao estado mesenquimal. Essa regulação gera mudanças celulares importantes, como desmontagem de junções celulares, com uma progressiva perda de características epiteliais e ganho de morfologia e características mesenquimais, tornando-se móveis e com capacidades invasivas (DONGRE; WEINBERG, 2019).

Essa plasticidade celular conferida pela TEM possui um papel relevante na agressividade tumoral. Evidências tem apontado para o programa de TEM como uma possível causa para a capacidade de invasão celular adquirida pelas células tumorais, facilitando sua motilidade, seu extravasamento do tumor primário e sua disseminação na circulação, alcançando um novo sítio de estabelecimento, suportando assim, a metástase (MITTAL, 2018).

A TEM também está envolvida com a aquisição do perfil de células-tronco tumorais (CSC). De acordo com a literatura, uma pequena subpopulação infiltrada no

tumor possui características de células indiferenciadas, com alta habilidade oncogênica, resistência à morte celular e alta capacidade regenerativa (WEIDENFELD; BARKAN, 2018). A presença dessas células apresenta um desafio no tratamento clínico, devido à resistência à quimioterapia e radioterapia, recorrência do tumor e metástase (LÜTTICH *et al.*, 2021).

No câncer de mama, marcadores associados às CSC foram estabelecidos para identificação dessa subpopulação, como a glicoproteína de superfície CD44, o transdutor de sinal CD24 e a enzima aldeído desidrogenase 1 - ALDH1 (DA CRUZ PAULA; LOPES, 2017; WALCHER; *et al.*, 2020). Em tumores de mama triplo negativo, os tecidos tumorais apresentam alta expressão de ALDH1 e CD44 e ausência de expressão de CD24 (PARK *et al.*, 2019), semelhante ao perfil de linhagens celulares experimentais, como a MDA-MB-231. Em contrapartida, linhagens luminais, MCF-7 por exemplo, apresentam um perfil de expressão CD24⁺/CD44⁻ (FILLMORE; KUPERWASSER, 2008).

1.11. Trombose e câncer

A trombose é a formação de um coágulo dentro de um vaso sanguíneo, podendo ocluir total ou parcialmente a circulação. Como consequência dessa obstrução, há uma restrição ao fornecimento de nutrientes e oxigênio em tecidos e órgãos. Grandes coágulos oclusivos (trombos) podem se quebrar e formar trombos secundários em locais distais; esse processo de trombose seguido por embolia é denominado tromboembolismo venoso (TEV) (MACKMAN, 2008). O TEV pode ocorrer por diferentes fatores, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Por ano, 2 a cada 1.000 pessoas apresentam um evento trombótico, e essa incidência aumenta ainda mais quando se avalia somente indivíduos com mais de 55 anos, nesse grupo os números chegam a 1 evento por 100 pessoas no mesmo período (NAESS *et al.*, 2007).

Virchow formulou, no século XVIII, sua famosa tríade, na qual, os três fatores principais para explicar a patogênese do TEV incluem: 1) dano à parede interna do vaso sanguíneo, 2) estase do fluxo sanguíneo e 3) a presença de um estado

hipercoagulável por alterações da composição do sangue. O risco aumentado de TEV em pacientes com câncer é resultado do tumor e de fatores relacionados ao paciente. A ruptura de um ou mais componentes da tríade de Virchow, pelos fatores associados à malignidade, aumenta chance de um evento trombótico nesses pacientes. Assim, a tríade de Virchow serve como estrutura para construir uma compreensão da hipercoagulabilidade sanguínea no câncer (LEIVA *et al.*, 2020)

A relação entre câncer e trombose é conhecida desde 1865, quando Armand Trousseau descreveu pela primeira vez uma associação clínica entre trombose e um câncer ainda não diagnosticado (FALANGA *et al.*, 2013). A trombose associada ao câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com malignidade. O tromboembolismo é a 2ª causa de morte em pacientes com câncer, sendo a complicação trombótica mais comum o tromboembolismo venoso. Além dos fatores de risco individuais relacionados ao paciente, os fatores de risco relacionados ao tumor, como tipo de tumor, estágio e grau do tumor, e os tratamentos anticâncer administrados também contribuem para o aumento do risco de TEV (NG; CARRIER, 2019).

As alterações hemostáticas podem ser originadas por diferentes fatores, mas as vias biológicas provavelmente desempenham um importante papel na patogênese relacionada ao câncer. As células tumorais podem ativar o sistema de coagulação por meio da expressão de proteínas pró-coagulantes, exposição de lipídeos pró-coagulantes, liberação de citocinas inflamatórias e microvesículas, dentre outros, mas o TF é o pró-coagulante tumoral mais bem caracterizado (FALANGA *et al.*, 2009). O TF é superexpresso em diferentes neoplasias, e esse aumento na expressão de TF tumoral está associado a mau prognóstico em muitos tipos de câncer, incluindo câncer de mama, próstata, colorretal e pancreático (HISADA; MACKMAN, 2019).

1.12. Fator tecidual

O fator tecidual (TF) é uma glicoproteína transmembranar de 47 kDa que desempenha importante papel na homeostase, funcionando como o ativador primário da via extrínseca da cascata de coagulação. O TF apresenta alta afinidade pelos fatores FVII e FVIIa e funciona como um cofator, estabilizando o FVIIa na membrana

plasmática, o que permite a interação ideal com seus substratos, o FIX e o FX (RAO; PENDURTHI, 2012). É expresso constitutivamente nos espaços subendoteliais e na adventícia, tendo um importante papel como um dos inicializadores da cascata de coagulação, mas também é abundantemente expresso em órgãos altamente vascularizados, como cérebro, pulmões, placenta, coração e rim (ØSTERUD; BJØRKLID, 2006).

Didaticamente, a cascata de coagulação pode ser ativada por duas diferentes vias. Uma delas é denominada via extrínseca, quando a partir de uma lesão no endotélio ocorre a exposição do TF à corrente sanguínea. Essa proteína vai atuar como um cofator para o fator VII no plasma, ativando-o em fator VIIa. Posteriormente, TF se liga ao fator VIIa, formando um heterodímero capaz de clivar e ativar o fator X em fator Xa. O segundo caminho de ativação é a chamada via intrínseca ou via de contato, quando o fator XI é ativado pelo fator XII a partir da interação com moléculas de carga negativa, como por exemplo o polifosfato ou o colágeno. Após uma cascata de eventos, a via intrínseca também culminará na clivagem e ativação do fator X, seguindo a partir de então uma sequência de eventos comuns a ambas as vias e finalizando com a formação de uma rede de fibrina e a formação do chamado 'coágulo' (JIN; GOPINATH, 2016).

Além de suas funções extracelulares, o complexo TF/VIIa também é capaz de promover eventos de sinalização intracelular. O complexo binário TF/FVIIa é capaz de clivar um receptor acoplado à proteína G denominado Receptor Ativado por Protease (PAR), especificamente o receptor PAR2. Além disso, o complexo TF/VIIa pode interagir com o FXa, possibilitando a formação de um complexo terciário que é capaz de levar à ativação de PAR-1 e PAR-2. Os receptores PAR transmitem sinais intracelulares relacionados a uma gama de fenômenos fisiológicos e patológicos, incluindo o câncer (HAMILTON; TREJO, 2017) (Figura 4). Neste contexto, essa via de sinalização tem sido relacionada a diferentes etapas da progressão tumoral, incluindo a metástase. O bloqueio farmacológico de TF, incluindo o uso de anticorpos capazes de bloquear seu papel pró-coagulante ou na sinalização celular tem sido proposto como um importante alvo terapêutico (TEPLYAKOV *et al.*, 2018).

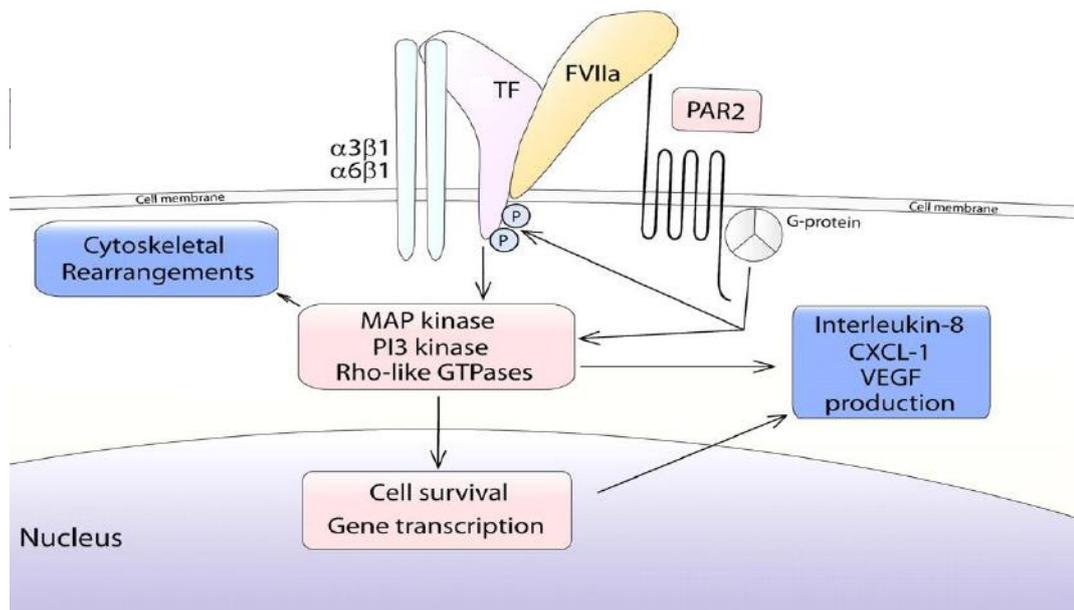


Figura 4: Sinalização induzida pelo complexo TF/FVIIa regula fatores relacionados à angiogênese, sobrevivência e migração celular. O complexo TF / FVIIa, via PAR2, induz a ativação dos principais membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), PI3 quinase (PI3K) e Rho GTPases, necessários para importantes eventos celulares como sobrevivência e mobilidade (VAN DEN BERG *et al.*, 2012)

Evidências mostram que a expressão do TF é regulada positivamente durante a TEM, fornecendo às células tumorais propriedades coagulantes aumentadas, que facilitam as etapas iniciais de sua colonização metastática. Ao reprimir os fatores transcripcionais relacionados à TEM, como Zeb1 e Snail, a atividade coagulante mediada por TF se mostrou reduzida na linhagem MDA-MB-231 (BOURCY *et al.*, 2016).

Um estudo conduzido por nosso grupo (MARTINS-CARDOSO *et al.* 2020), demonstrou que as NETs promovem um perfil metastático em células de carcinoma mamário através da ativação de TEM. Diante desses achados, é válido pensar que as NETs poderiam também modular a expressão de TF, através da interação com o programa de TEM, aumentando a atividade de coagulação das células tumorais e, possivelmente, a sua agressividade. Este foi o objeto de investigação deste estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de NETs isoladas em modular o fenótipo pró-coagulante de células de câncer de mama humano.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se as NETs regulam a expressão de TF em células de câncer de mama humano;
- Avaliar o fenótipo pró-coagulante de células de câncer de mama humano modulado pelas NETs;
- Avaliar se a sinalização induzida por TF modula a expressão de CD44 e de citocinas pró-inflamatórias;
- Analisar se existe uma correlação entre a expressão do gene F3/TF com genes de assinatura neutrofílica ou genes associados à TEM, utilizando dados de transcriptoma de pacientes com câncer de mama depositados no TCGA;
- Avaliar possíveis vias de modulação da expressão de TF por NETs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células

As linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 (SOULE *et al.*, 1973) e T-47D (KEYDAR *et al.*, 1979) representam a condição A luminal (ER⁺, PR⁺ e HER2⁻). Eles são dependentes de hormônios e detêm várias características essenciais específicas do epitélio mamário, sendo consideradas linhagens de baixa agressividade (Holliday and Speirs, 2011). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM alta glicose (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Thermo Fisher Scientific) suplementado com 2,4 g/L de HEPES (Sigma), 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 100.000 U/L de penicilina, 100 mg/L de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific), 10 % de soro fetal bovino - SFB (Cultilab) e mantidas mantidas a 37 °C com 5 % de CO₂. Para manutenção, as células eram repicadas após atingirem 80 % de confluência e para dissociação foi utilizado 0,25 % tripsina/EDTA, seguido de centrifugação a 1500 rpm por 5 min.

3.2. Isolamento de neutrófilos

As amostras de sangue periférico foram coletadas de doadores saudáveis, com 100 mM citrato de sódio na proporção 1:10 (v/v). O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do Hospital Clementino Fraga Filho/UFRJ sob número de registro 82933518.0.0000.525 para captação dos doadores e coleta das amostras. Todo o procedimento foi realizado com instrumentos e soluções estéreis, para diminuir o risco de possíveis contaminantes como endotoxinas bacterianas ou LPS.

O sangue venoso total obtido foi cuidadosamente transferido para tubos cônicos contendo Ficoll Histopaque (Sigma Aldrich) na proporção de 2:1 (v/v). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 400 g por 30 minutos à temperatura ambiente, para que um gradiente de densidade fosse formado e camadas contendo diferentes tipos celulares fossem formadas. Primeiramente, as células mononucleares do sangue periférico foram removidas e desprezadas com o auxílio de uma pipeta e, em seguida, todo o plasma sanguíneo restante também foi retirado.

A camada contendo os neutrófilos foi transferida para um tubo cônico, uma solução ACK (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) foi adicionada até completar 50 mL para remoção dos eritrócitos por lise hipotônica e, por no mínimo 5 minutos, foi suavemente homogeneizada. Em seguida, os tubos contendo neutrófilos foram centrifugados a 400 g, por 10 minutos, a 4 °C. O processo de lise citado acima foi repetido e novamente o tubo foi centrifugado. O precipitado contendo os neutrófilos foi lavado em PBS, centrifugado a 400 g, por 10 minutos, a 4 °C e cuidadosamente ressuspenso em meio RPMI 1640 (*Thermo Fisher Scientific*) sem adição de soro fetal bovino. Os neutrófilos foram contados em câmara de Neubauer e a suspensão foi ajustada para 1 x 10⁷ neutrófilos/mL. O grau de pureza (> 90%) e viabilidade (> 90%) dos neutrófilos obtidos foram mensurados através da coloração com azul de metileno e azul de Trypan, respectivamente (NAJMEH *et al.*, 2015).

3.3. Geração e isolamento de NETs

Os neutrófilos isolados (1 x 10⁷ células/mL) foram transferidos para placa de petri estéril e incubados com 500 nM de PMA (Sigma Aldrich), por 3 horas, a 37 °C e 5 % CO₂. Em seguida, o meio foi cuidadosamente removido para preservar a camada formada no fundo da placa. Em seguida, o conteúdo restante na placa foi ressuspenso em PBS estéril gelado e centrifugado a 400 g, por 10 minutos, a 4 °C para remover os detritos celulares. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugados novamente a 18.000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O precipitado obtido foi ressuspenso em PBS estéril (entre 50 µL e 100 µL, de acordo com o volume do pellet obtido). Para quantificar as NETs isoladas, foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop Lite (*Thermo Fisher Scientific*). Foi utilizado 1 µL da amostra obtida para determinação da concentração de DNA por absorvância a 260 nm (NAJMEH *et al.*, 2015). As NETs geradas foram utilizadas em seguida ou armazenadas a 4 °C por, no máximo, 24 h .

3.4. Extração de RNA e síntese de cDNA

As linhagens celulares foram cultivadas (5×10^5 células por poço) em placas de 6 poços por 24 h, a 37 °C e 5% CO₂, em 1 mL de meio DMEM alta glicose contendo 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, o meio foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e incubadas com 1 mL de meio DMEM sem soro, por 8 a 10 h, a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com 500 ng/mL de NETs por 16 h, a 37 °C em 5% CO₂. Em alguns casos, após o período de *starving*, as células foram tratadas com inibidores comerciais 1 h antes da adição de NETs: TF9-10H10 (50 µg/mL, anticorpo anti-TF mAb, Sigma-Aldrich, USA) PD98059 (50 µM, inibidor de MEK, Sigma-Aldrich, USA), SP600125 (50 µM, inibidor de iJNK, Sigma-Aldrich, USA), PD153035 (0,1 µM, inibidor intracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), Calbiochem, USA), SB03580 (10 µM, inibidor p38, Sigma-Aldrich, USA), *elastase inhibitor III* (10 µM, inibidor de elastase, Calbiochem, USA) e LY294002 (25 µM, inibidor de PI3K, Sigma-Aldrich, USA). As células foram lavadas duas vezes com PBS e, em seguida, 500 µL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific) foi adicionado a cada poço e transferidas para tubos de 1,5 mL livres de RNA. Foi adicionado 100 µL de clorofórmio (Vetec) nas amostras com TRIZol, homogeneizado e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 g, por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 250 µL de isopropanol (Vetec), foi feita uma incubação por 10 min a temperatura ambiente e novamente as amostras foram centrifugadas a 12000 g, por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e 1 mL de etanol 75 % foi adicionado e os tubos foram centrifugados a 9000 g, por 7 min, a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi deixado aberto, por, pelo menos, 15 min, para secagem total das amostras. O RNA extraído foi ressuspenso em 20 µL de água DEPC (Life Invitrogen) e os tubos foram colocados num termobloco por 10 min a 56 °C. O RNA foi quantificado através de sua absorbância no comprimento de onda de 260 nm em um espectrofotômetro NanoDrop Lite. A qualidade do RNA foi avaliada através da razão entre as absorbâncias de 260/280 nm, para avaliar a contaminação proteica. A qualidade do RNA foi considerada boa quando o valor da razão foi superior a 1,8.

Para minimizar uma possível contaminação do RNA com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase (ThermoFisher). Em um tubo de 0,2 mL, 1 µg de RNA por amostra foi adicionado juntamente com 1 µL de DNase I, 1 µL de Tampão DNase I µL e água DEPC *q.s.p.* 10 µL, seguida por incubação em termociclador (Veriti 96 poços, Applied Biosystems) por 30 min a 37 °C. Após, 1 µL de EDTA (50 mM ThermoFisher) foi adicionado por microtubo e incubado por 10 min a 65 °C. A partir daí, foi adicionado o kit de transcrição reversa seguindo a recomendação do fabricante Applied Biosystems para síntese de cDNA.

3.5. qRT-PCR em tempo real

Para a reação de qRT-PCR, utilizou-se mix de reação com volume final de 10 µL de composto por tampão (20 mM Tris, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂; pH 8,0), SYBR® Green I 1x (Sigma), Reference dye for quantitative PCR1x (Sigma), dNTPs (200 nM cada) e 5 U/µL da enzima JumpStart™ Taq DNA Polymerase (Sigma). Ao mix de reação também foi adicionado cDNA diluído 10 vezes e 400 nM de oligonucleotídeos. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real Time PCR (Applied Biosystems) e analisadas no programa StepOne (Applied Biosystems). Para normalização da expressão gênica, utilizou-se o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como gene endógeno e aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C}$.

Tabela 3: Informação sobre os primers usados nos experimentos de qPCR

Gene	Foward	Reverse
GAPDH	5'- TGCACCACCAACTGCTTAGG -3'	5'- GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3'
F3	5'- CAGGCACTACAAATACTGTGG -3'	5'- TGTAGACTTGATTGACGGGTT -3'
CD44	5'- GGAGCAGCACTTCAGGAGGTTAC -3'	5'- GGAATGTGTCTTGGTCTCTGGTAGC -3'
CXCL8	5'- CTGGACCCCAAGGAAAAGT -3'	5'- GAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC -3'
IL6	5'- TACCCAGGAGAAGATTCC -3'	5'- TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT -3'

3.6. Citometria de fluxo

Foram plaqueadas 1×10^6 células em garrafas de cultura de 25 cm^2 com meio DMEM alta glicose contendo 10 % de soro fetal bovino e incubadas por 24 h, a 37°C e 5 % CO_2 . Após esse período as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e incubadas por mais 8 a 10 h com meio DMEM alta glicose sem soro. O meio foi trocado e as células tratadas com 500 ng/mL de NETs por 16 h. As células então foram cuidadosamente lavadas com PBS estéril, dissociadas com 0,25 % tripsina/EDTA, contadas na câmara de Neubauer e fixadas em PBS contendo PFA 4 %. Em seguida foram lavadas e ressuspensas em HT buffer (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 12 mM NaHCO_3 , 0,4 mM Na_2HPO_4 , 5,5 mM glicose, 0,35 % BSA, pH 7,4), incubadas com o anticorpo anti-TF conjugado a PE (HTF-1, BD Pharmingen) por 30 min, a temperatura ambiente, e fixadas novamente em PBS contendo PFA 4 %. Um citômetro de fluxo (BD FACSCalibur) foi usado para adquirir 10.000 eventos, e os dados foram posteriormente analisados usando o software FlowJo (BD Biosciences).

3.7. Ensaio de coagulação *in vitro*

Foram plaqueadas 1×10^6 células em garrafas de cultura de 25 cm^2 com meio DMEM alta glicose contendo 10 % de soro fetal bovino e incubadas por 24 h, a 37°C , em 5 % CO_2 . Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e incubadas por mais 8 a 10 h com meio DMEM alta glicose sem soro. O meio foi trocado e as células tratadas com 500 ng/mL de NETs por 16 h. As células então foram cuidadosamente lavadas com PBS estéril, dissociadas com 0,25 % tripsina/EDTA, contadas na câmara de Neubauer e ressuspensas em PBS. A atividade pró-coagulante das células tratadas com NETs foi avaliada por meio do ensaio de recalcificação utilizando plasma pobre em plaquetas (PPP). 50 μL de células em PBS, em diferentes concentrações, foram incubados com 50 μL de PPP humano contendo citrato de sódio 3,8 % diluído 1:9 (v/v). Após incubação de 1 min a 37°C , 100 μL de 25 mM CaCl_2 foram adicionados, e os tempos de coagulação foram monitorados em um Coagulômetro KC-4 (Amelung Ltd, Diagnostic Grifols).

3.8. Análises de expressão gênica por bioinformática

Para realizar a análise de expressão de genes relacionados a neutrófilos e TF utilizou-se dados de RNAseq de 1100 pacientes com câncer de mama depositados no repositório The Cancer Genome Atlas - TCGA (TOMCZAK *et al.*, 2015). Para análise de correlação entre os genes de assinatura neutrofílica, fator tissular e os genes pró-tumorais, utilizou-se a plataforma cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>), cujos gráficos e os coeficientes de Spearman, juntamente com o valor estatístico, são fornecidos pela plataforma (CERAMI *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2013). Para refinar a análise de co-expressão gênica, utilizou-se a ferramenta GEPIA 2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) a fim de gerar análises de correlação entre os genes alvo e um *subset* de genes de assinatura neutrofílica (*DEFA4*, *DEFA1B*, *MMP8*, *CEACAM6*, *CEACAM8*, *LTF*, *MPO* e *ARG1*). A partir da análise destes dados, gerou-se as tabelas das correlações gênicas apresentadas adiante.

3.9. Análise estatística

O software de análise utilizado foi o GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os dados representados nos gráficos informam a média de pelo menos três experimentos independentes \pm desvio padrão. Nos ensaios de qRT-PCR quantitativo, citometria de fluxo e ensaio de migração, o teste *t* não pareado foi aplicado para determinar a diferença estatística entre células MCF-7 tratadas ou não com NETs. No ensaio de RT-PCR quantitativo utilizou-se o teste ANOVA Tukey. As correlações dos valores de RNA-seq (FPKM) obtidos pelo TCGA foram analisadas estatisticamente pelo método do Teste de Spearman não paramétrico. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. NETs induzem a expressão do gene F3 (TF) em linhagem de câncer de mama

Nosso grupo demonstrou recentemente que o tratamento com NETs induz alterações morfológicas características do processo de TEM na linhagem MCF-7 (MARTINS-CARDOSO *et al.*, 2020). Também se observou um aumento na expressão de transcritos como ZEB1 (*ZEB1*) e SNAIL (*SNAI1*), do marcador mesenquimal fibronectina, e uma diminuição do marcador epitelial E-caderina. Diante dessas alterações induzidas pelo tratamento com NETs, avaliou-se a regulação da expressão de TF em duas linhagens de câncer de mama não metastáticas. A partir de análises quantitativas por qPCR, foi observado um aumento significativo da expressão de TF na linhagem MCF-7 após 16 h de tratamento com NETs. Os níveis de mRNA de *TF* foram cerca de duas vezes maiores nas células MCF-7 tratadas com NETs do que nas células não tratadas, como visto na figura 5a. No entanto, a regulação da expressão gênica de TF não foi observada na linhagem T-47D mediante a incubação com NETs (Figura 5b).

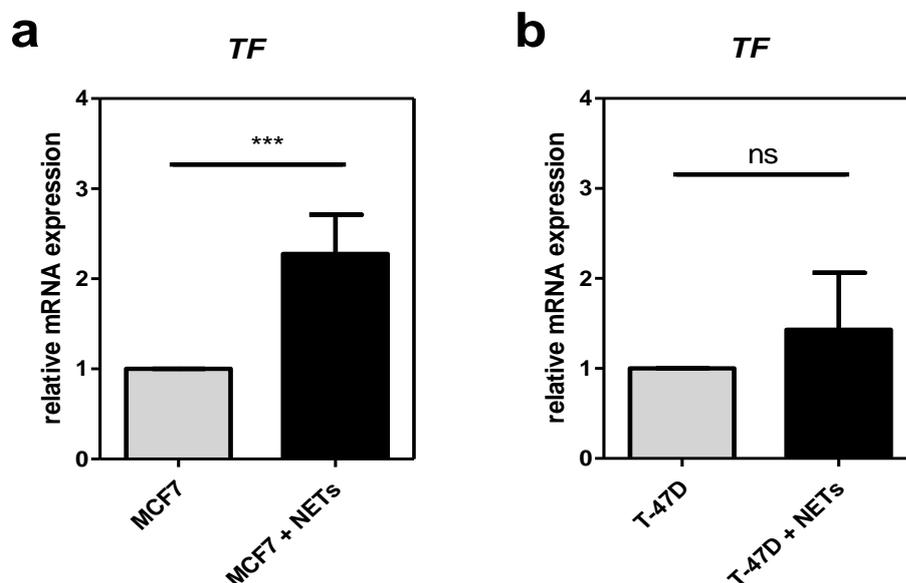


Figura 5. Avaliação da expressão de TF em linhagens de câncer de mama tratadas com NETs. As células foram cultivadas por 16 h na presença de NETs (500 ng/mL). Os níveis de expressão de mRNAs TF foram avaliados por qRT-PCR e *GAPDH* foi usado como gene de referência. (a) linhagem MCF-7 e (b) linhagem T-47D. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste *t* não pareado. *n.s.*, sem significância e *** $p < 0,001$

4.2. NETs induzem a expressão da proteína TF na linhagem MCF-7.

A relação entre o aumento da expressão do TF e uma maior agressividade do tumor já é bem estabelecida. Essa correlação entre pior prognóstico ou reincidência do câncer com maiores níveis do TF também já foi descrita em diversos tipos de carcinoma, incluindo o câncer de mama (RUF *et al.*, 2010). Para confirmar o aumento da expressão proteica de TF nas linhagens MCF-7 e T-47D tratadas com NETs, realizamos ensaios de citometria de fluxo após incubação com anticorpo anti-TF. Corroborando com os resultados obtidos na análise por PCR em tempo real, observamos um aumento significativo na expressão de TF nas células MCF-7 tratada com NETs, se comparado ao controle (Figura 6a). A mesma tendência de aumento de RNAm, observada anteriormente, foi verificada na análise de citometria de fluxo com a linhagem T-47D (Figura 6b), mas esta não foi estatisticamente relevante. Diante dos resultados obtidos até então, os experimentos foram prosseguidos somente com a linhagem MCF-7.

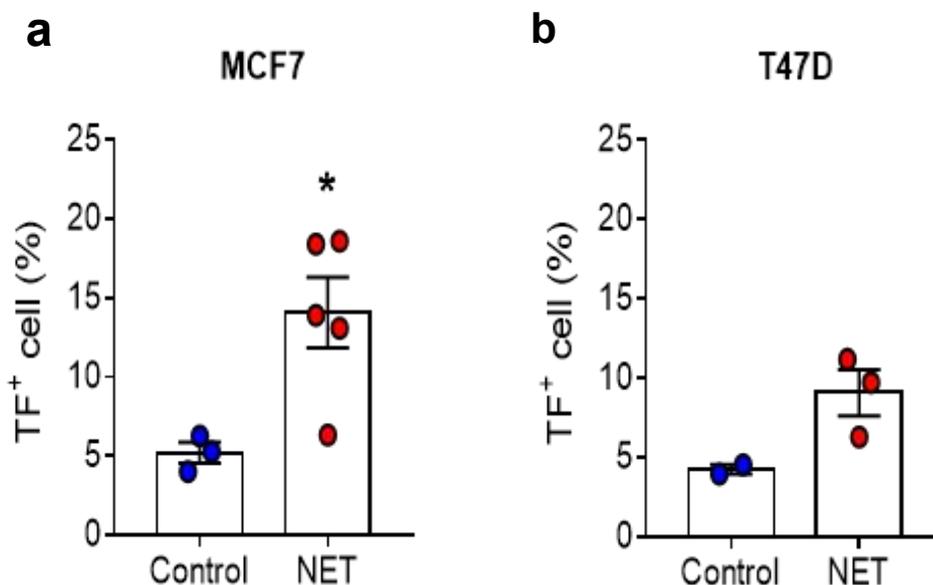


Figura 6: Análise por citometria de fluxo da expressão de TF nas linhagens MCF-7 e T-47D tratadas com NETs. As células foram cultivadas por 16 h com NETs (500 ng/mL), fixadas e incubadas com anticorpo anti-TF conjugado a PE (a) Percentual de células da linhagem MCF-7 tratadas com NETs TF⁺; (b) Percentual de células da linhagem T-47D tratadas com NETs TF⁺. Teste *t* não pareado foi aplicado para análise estatística. A significância foi assumida para * $p < 0,05$.

4.3. MCF-7 tratada com NETs apresenta um fenótipo pró-coagulante

Já é bem descrito que algumas linhagens tumorais expressam TF e que isso contribui para um efeito de coagulação do plasma *in vitro* (KIRSZBERG *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2006). Diante disso, avaliamos se a linhagem MCF-7 tratada com NETs adquire um fenótipo pró-coagulante.

Para determinar essa propriedade, um ensaio de coagulação do plasma foi realizado. Ao adicionar as células MCF-7 tratadas com NETs observou-se uma diminuição no tempo de formação da rede de fibrina, se comparado com as células não tratadas. Essa diferença no tempo de coagulação entre os grupos se mostrou dependente da quantidade de células adicionadas, uma vez que a suspensão contendo 10^5 células/mL (Figura 7a) apresentou maior atividade pró-coagulante do que a suspensão com 10^4 células/mL (Figura 7b). Em acordo com a maior expressão de TF, as células tratadas com as NETs apresentaram também uma maior atividade pró-coagulante.

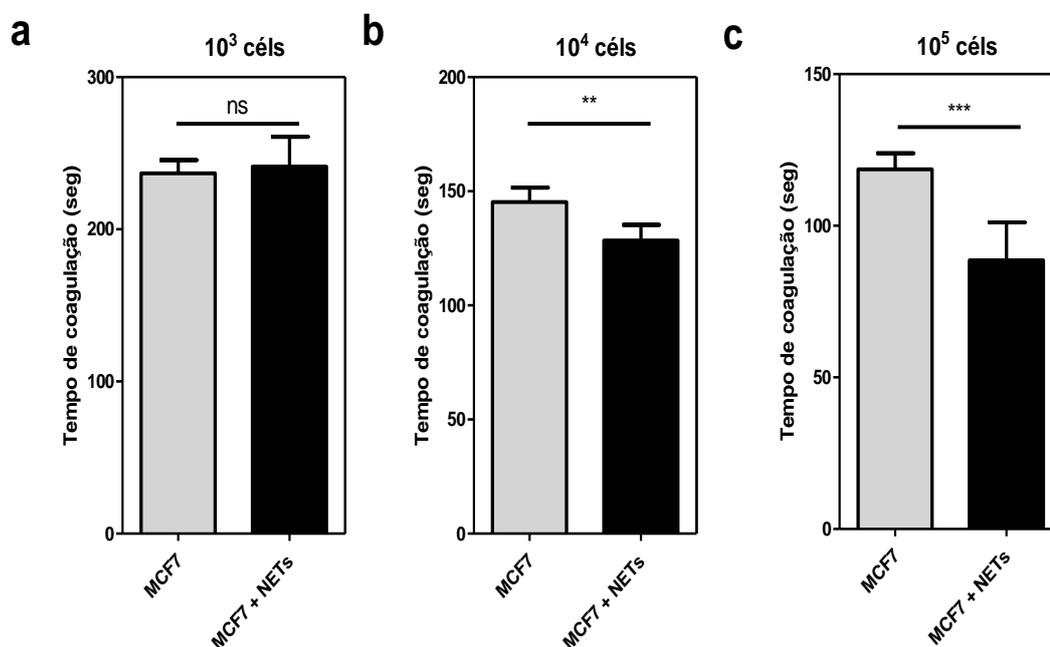


Figura 7. Células MCF-7 tratadas com NETs aceleram a coagulação do plasma humano. O plasma pobre em plaquetas foi incubado com suspensão de células MCF-7 tratadas ou não com NETs em três diferentes concentrações: (a) 10^3 células, (b) 10^4 células e (c) 10^5 células e a reação foi iniciada com CaCl_2 . A análise estatística foi realizada usando o teste *t* não pareado com base nos resultados de três experimentos independentes. *n.s.*, sem significância ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

4.4. A inibição da sinalização induzida por TF altera o efeito de NETs na linhagem MCF-7

Além do efeito pró-coagulante, o TF pode promover uma série de fenômenos pró-tumorais por meio de sinalização celular mediada ou não pelo receptor PAR2 (ZELAYA *et al.*, 2018). Para avaliar o papel da sinalização induzida pelo TF no programa de TEM promovido pelas NETs, utilizamos o anticorpo monoclonal 10H10. O 10H10 bloqueia especificamente a sinalização celular mediada pelo complexo binário TF:FVIIa, sem inibir significativamente a sua atividade pró-coagulante (AHAMED *et al.*, 2006). Diante disso, avaliou-se o impacto da inibição de TF na expressão de CD44 (um importante marcador de célula tronco tumoral) (Figura 8a), CXCL8 (Figura 8b) e IL6 (citocinas pro-inflamatórias relacionadas à TEM) (Figura 8c). Com as análises obtidas por qRT-PCR, observou-se um aumento significativo na expressão de CD44 e da citocina CXCL8 após o tratamento da linhagem MCF-7 com NETs. No entanto, quando utilizado o anticorpo anti-TF, antes do tratamento das células com NETs, observou-se uma inibição da expressão de CD44 e CXCL8 para níveis quase basais. Mesmo sem apresentar poder estatístico, é possível observar uma tendência à inibição da expressão de IL6 quando utilizado o anti-TF 10H10 junto ao tratamento com as NETs.

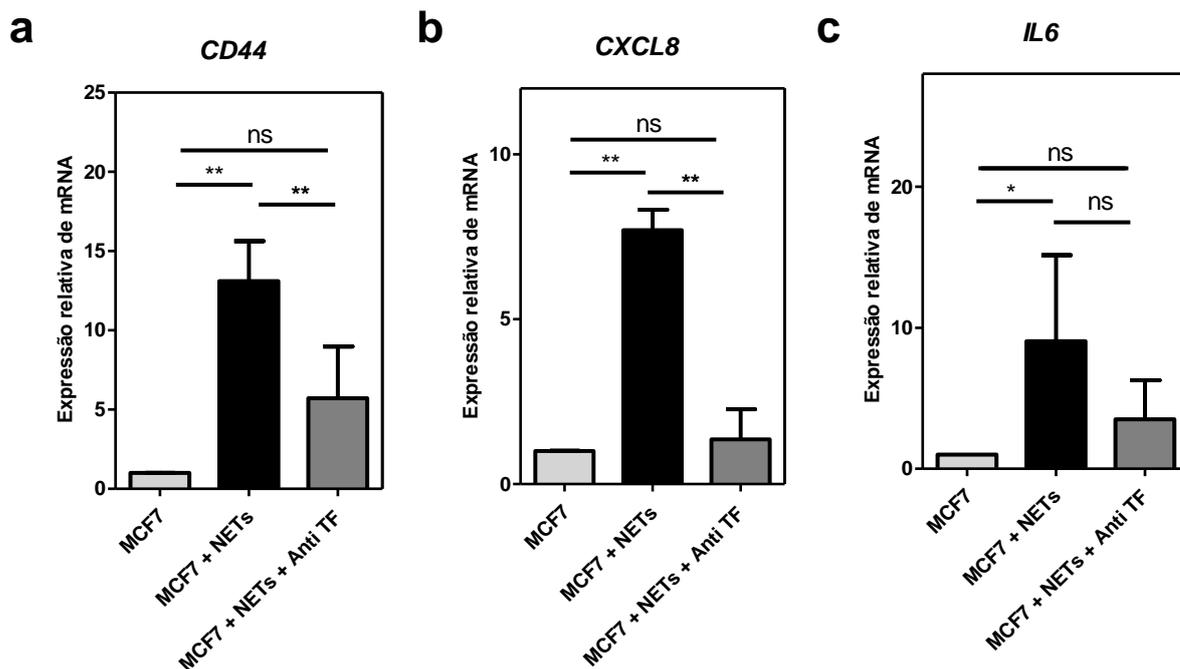


Figura 8: Inibição da sinalização induzida por TF na linhagem MCF-7 tratada com NETs.

As células foram pré-incubadas com anticorpo anti-TF 10H10, 60 minutos antes do tratamento com as NETs. Em seguida, as células foram tratadas com 500 ng/mL de NETs por 16 h. Os níveis de expressão dos mRNAs do oncogene CD44 (a) e de genes de citocinas inflamatórias CXCL8 (b) e IL6 (c) foram avaliados por qRT-PCR e *GAPDH* foi usado como gene de referência. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 4 experimentos independentes; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

4.5. Análise *in silico* da correlação entre os marcadores gênicos de neutrófilos, TF e genes relacionados à TEM

Para correlacionar os nossos achados *in vitro* com amostras clínicas, análises *in silico* foram feitas utilizando dados de transcriptoma de pacientes com câncer de mama, depositados no repositório The Cancer Genome Atlas – TCGA (www.cancer.gov). Para essas análises, utilizou-se um grupo de genes relacionados aos neutrófilos, aqui denominado de assinatura neutrofílica. Essa assinatura foi identificada a partir de um estudo com pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico com nefrite ativa, que mostrou que há uma correlação entre os níveis de RNA desses genes relacionados aos neutrófilos e a proporção de neutrófilos no sangue periférico (WITHER *et al.*, 2018). O grupo de 8 genes que utilizamos para essa assinatura foi DEFA4, DEFA1B, MMP8, CEACAM6, CEACAM8, LTF, MPO e ARG1.

Os dados das análises de expressão gênica foram gerados a partir da plataforma Gepia2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>), uma vez que ela nos permite reunir todos os genes relacionados a neutrófilos em uma única análise simultânea e correlacionar com o gene-alvo (F3). Essa análise foi feita a partir de 1085 amostras de câncer de mama humano do TCGA e os valores de RNA-seq foram analisados pelo teste estatístico de Spearman. Observamos uma correlação positiva ($R=0,28$, $p < 0,0001$) entre a expressão dos genes de assinatura neutrofílica e a expressão do gene F3 em pacientes com câncer de mama (Figura 9). Portanto, nossos resultados sugerem que os neutrófilos, através da liberação de NETs, são capazes de modular positivamente a expressão de TF no câncer mama.

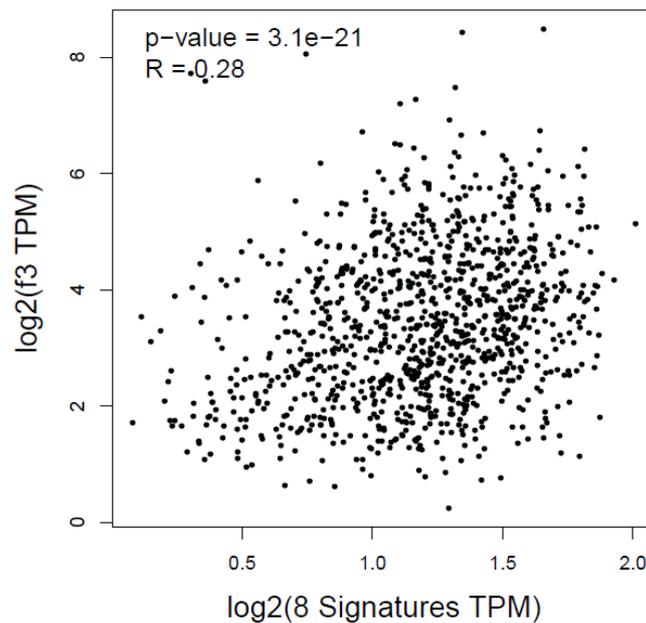


Figura 9. Análise da correlação entre os genes relacionados a neutrófilos e o gene que codifica o TF (F3) em amostras de pacientes com câncer de mama. Dado gerado a partir da plataforma Gepia 2 usando 1.085 amostras de câncer de mama humano do TCGA, utilizando os dados de transcriptômica (RNA-seq) depositados. O teste estatístico utilizado foi a correlação de Spearman; $r = 0,28$, $p < 0,0001$.

Recentemente, nosso grupo já havia demonstrado uma análise correlacionando cada gene de assinatura neutrofílica com alguns genes relacionados à TEM como CD44, CD24, SNAI1, ZEB1, CDH1 (E-caderina), CDH2 (N-caderina), CTNNB1 (β -catenina), em amostras de RNA-seq de pacientes com câncer de mama, observando uma correlação positiva entre os genes de assinatura de neutrófilos com os genes Snail (*SNAI1*) e β -catenina (*CTNNB1*) e uma correlação negativa com a E-caderina (*CDH1*). Diante disso, analisamos a correlação do gene TF (F3) com alguns genes relacionados ao processo de TEM (Tabela 4). Com essa análise, foi possível verificar uma correlação positiva entre a expressão gênica de TF e de genes relacionados à TEM, como o CD44, ZEB1, Fibronectina, N-caderina e β -catenina ALDH1. Além disso, observamos uma correlação negativa entre a expressão de TF e a expressão gênica de E-caderina.

Tabela 4: Análise através do Gepia2 de correlação entre genes da assinatura neutrofílica, genes relacionados com TEM e gene F3 em amostras de pacientes com câncer de mama depositadas no TCGA. As correlações dos valores de RNA-seq foram analisadas estatisticamente pelo método do Teste de Spearman não paramétrico. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p \leq 0,05$.

r = coeficiente de correlação	CD44 (CD44)	CD24 (CD24)	Snail (SNAI1)	ZEB1 (ZEB1)	E-caderina (CDH1)	Fibronectina (FN1)	N-caderina (CDH2)	β -catenina (CTNNB1)	Aldh1 (ALDH1)	TF (F3)
TF (F3)	r = 0,21	r = 0,0031	r = 0,0016	r = 0,44	r = -0,11	r = 0,2	r = 0,17	r = 0,32	r = 0,35	
Genes de Assinatura Neutrofílica	r = 0,015	r = -0,024	r = 0,086	r = 0,2	r = 0,019	r = 0,11	r = 0,019	r = 0,22	r = 0,19	r = 0,21

Correlação Positiva
 Correlação Negativa
 Sem correlação

4.6. Análise das vias envolvidas no aumento da expressão de TF por NETs

Por se tratar de uma estrutura de DNA decorada com diversas proteínas (RADA, 2019), as NETs têm sido implicadas em diferentes vias de sinalização celular (NIE *et al.*, 2019). Buscando compreender os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão de TF induzida pelas NETs, avaliamos a participação de algumas vias de sinalização intracelular com a utilização de inibidores farmacológicos.

Inicialmente, nós avaliamos a via de sinalização das MAPK. Observou-se que a inibição de MEK por PD98059 reverteu eficientemente a expressão gênica de TF promovida pelas NETs (Figura 10a). O mesmo perfil inibitório de TF não foi observado ao inibir EGFR por PD153035 e PI3K por LY294002 (Figura 10b e 10c, respectivamente).

O tratamento de MCF-7 com NETs na presença de SP600125, inibidor comercial de JNK, também atenuou o aumento da transcrição de TF modulada pelas NETs (figura 10d). Este efeito regulatório de expressão de TF não foi observado em ensaios realizados na presença de SB03580, inibidor da via de p38 (figura 10e).

Por fim, avaliamos o papel de um dos componentes das NETs, a NE, uma das proteínas com atividade enzimática presentes nas NETs (figura 10f). Com base nas análises realizadas, o efeito de expressão de TF gerado pelas NETs foi atenuado em

ensaios realizados na presença de um inibidor comercial de elastase. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que as NETs modulam a expressão de TF na linhagem MCF-7 através de diferentes vias de sinalização, sugerindo que múltiplos componentes interagem com as células tumorais.

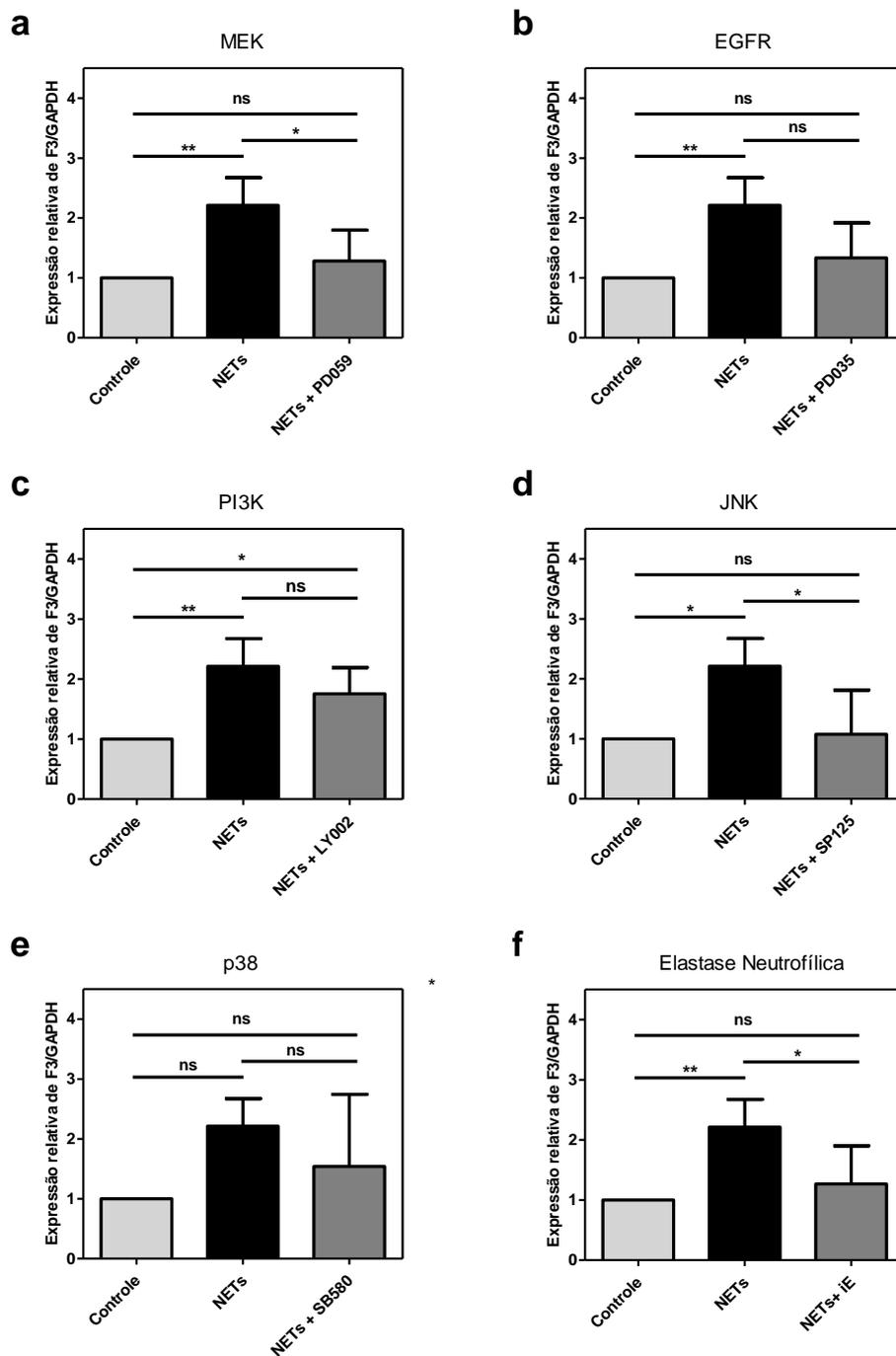


Figura 10: Análise da modulação da expressão de TF por vias de transdução de sinal e a participação da NE. As células MCF-7 foram pré-incubadas com inibidores comerciais 60 min antes do tratamento com (a) 50 μ M de inibidor MEK (PD98059), (b) 0,1 μ M de inibidor de EGFR (PD153035), (c) 25 μ M de inibidor de PI3K (LY294002), (d) 50 μ M de Inibidor de iJNK (SP600125), (e) 10 μ M de inibidor p38(SB03580) e (f) 10 μ M de inibidor de elastase (*elastase inhibitor III*). Em seguida, as células foram tratadas com 500 ng/mL de NETs por 16 h. Os níveis de expressão de mRNA de F3/TF foram avaliados. Para análise estatística, o teste Tukey ANOVA foi realizado com base nos resultados de três experimentos independentes. *n.s.*, sem significância * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

5. DISCUSSÃO

Recentemente, tornou-se claro que o microambiente tumoral tem papel importante no desenvolvimento do câncer, visto que ele próprio é uma das principais fontes de fatores pró-tumorais. Dos tipos celulares ali presentes, os leucócitos parecem contribuir para diversas etapas da progressão tumoral. Dentre os leucócitos presentes no microambiente tumoral, os neutrófilos têm recebido grande destaque nos últimos anos (MASUCCI *et al.*, 2019). No microambiente tumoral, a formação de NETs desempenha importante papel pró-tumoral durante a progressão da doença. Pacientes com câncer pancreático, câncer colorretal, câncer de pulmão e câncer de bexiga apresentaram um aumento no nível de NETs no plasma em comparação com controles saudáveis, sugerindo que as NETs podem ser consideradas um potencial marcador prognóstico (WU *et al.*, 2020).

A capacidade das células tumorais em promover a NETose e a relação dos neutrófilos associados ao tumor com a formação de NETs são cada vez mais descritas na literatura. No entanto, a complexa composição das NETs, com fatores pró-tumorais, DNA e proteases como catepsina G, NE e MMP-9, podem justificar o seu potencial tumorigênico (MASUCCI *et al.*, 2020). Nosso grupo demonstrou uma importante correlação entre as NETs e TEM em células de câncer de mama. Observamos que as NETs foram capazes de induzir a expressão dos fatores transcricionais e de citocinas pró-inflamatórias, além de modular marcadores da TEM e de células-tronco tumoral, apontando para um fenótipo mais agressivo nas células de carcinoma mamário MCF-7 (MARTINS-CARDOSO *et al.*, 2020). Estudos posteriores corroboraram nossos achados, observando fenômeno similar em câncer gástrico (Zhu *et al.*, 2021) e pancreático (Jin *et al.*, 2021).

Em nosso trabalho, avaliamos a regulação da expressão de TF nas linhagens celulares MCF-7 e T-47D, a partir da TEM induzida pelas NETs (Figura 5). Nesse modelo de indução, observamos um aumento maior que duas vezes na expressão de TF somente na linhagem MCF-7. Bourcy *et al.*, em 2016, compararam o nível de TF em duas linhagens de células tumorais de mama pouco agressivas (MCF-7 e T-47D) com duas invasivas e TEM positivas (MDA-MB-231 e Hs578T). A análise mostrou que a alta expressão de TF só foi observada nas linhagens TEM positivas, corroborando

com nossos achados. Um estudo anterior já havia demonstrado que a indução de um fenótipo semelhante à TEM, a partir do tratamento com EGF ou através do bloqueio da E-caderina *in vitro*, foi capaz de induzir a expressão de TF em células de carcinoma epidermoide humano, A431 (GARNIER *et al.*, 2012). Já, em 2017, um grupo do Reino Unido mostrou que células T-47D resistentes ao anoikis (população enriquecida com CSC a partir de condições de cultura não aderente) apresentaram expressão aumentada de TF em comparação com células cultivadas em cultura aderente. Esse mesmo padrão na expressão de TF não foi observado nas células MCF-7 (SHAKER *et al.*, 2017).

Como a região extracelular do TF exposto na superfície celular é determinante para a coagulação, examinamos a expressão do TF por citometria de fluxo em nossos sistemas celulares. O mesmo aumento identificado na expressão de mRNA na linhagem MCF-7 foi observado a seguir nos níveis proteicos de TF (figura 6a). No entanto, o mesmo perfil regulatório não foi observado na linhagem T-47D (Figura 6b), onde observamos uma tendência de aumento de mRNA e de proteína na análise de citometria de fluxo, mas essa não foi estatisticamente relevante. Acreditamos que diferenças moleculares entre as linhagens estudadas possam explicar essa diferença na resposta induzida entre elas. Mesmo já sendo bem descrito que um dos fatores indutores de CSC é a ativação do programa de TEM (WEIDENFELD; BARKAN, 2018), a via que leva à expressão de TF ainda é desconhecida.

A superexpressão de TF em associação a um outro modelo de TEM induzida por fatores de crescimento (EGF e TGF β) foi observada em outras linhagens de câncer de mama humano. Reforçando este eixo TEM-TF, também foi relatada a modulação da expressão de TF por dois fatores de transcrição TEM bem conhecidos, Zeb1 e Snail (BOURCY *et al.*, 2016). Uma significativa indução desses mesmos fatores transcricionais promotores da TEM, Zeb1 e Snail, gerada pelas NETs, também foi observada pelo nosso grupo na linhagem MCF-7 (MARTINS-CARDOSO *et al.*, 2020).

O TF produzido pelas células tumorais pode ser considerado como um dos principais fatores de inicialização da cascata de coagulação em pacientes com câncer. O TF expresso por essas células pode ativar o fator VII, formando um complexo formado pelo fator VII e TF. Esse complexo é capaz de ativar o fator X, que ativado

se liga ao fator II para gerar trombina e, conseqüentemente, estimular a amplificação da cascata da coagulação (MUKAI; OKA, 2018). Da mesma forma, algumas linhagens tumorais são conhecidas por expressarem TF e isso contribui para um efeito de coagulação do plasma *in vitro* (KIRSZBERG *et al.*, 2009). Já é bem descrito que a linhagem celular de câncer de mama humano MDA-MB-231, conhecida pela sua agressividade e potencial metastático, expressa grandes quantidades de TF (MCEACHRON; MACKMAN, 2009). Nosso grupo já havia mostrado que o silenciamento de TF nessa linhagem produz uma diminuição drástica da sua atividade pró-coagulante, com a perda da capacidade da célula MDA-MB-231 de acelerar o tempo de coagulação (RONDON *et al.*, 2018). Demonstramos que, em consonância com a maior expressão de TF induzida pelas NETs, as células MCF-7 apresentaram uma maior atividade pró-coagulante e essa atividade se mostrou dependente da quantidade de células adicionadas (Figura 7).

Além de sua função na hemostasia, evidências acumuladas têm sugerido que o TF participa da regulação do crescimento tumoral, angiogênese e metástase. A expressão do TF nas células tumorais parece estar positivamente correlacionada com o estágio e a agressividade dos cânceres de próstata, pulmão, mama e colorretal (ZHAO *et al.*, 2009). Dentro do microambiente tumoral, o complexo de TF-VIIa também é diretamente responsável pela clivagem de PAR2. Em células tumorais, a sinalização de TF-VIIa induz um repertório diversificado de reguladores angiogênicos e citocinas imunomoduladoras (VERSTEEG *et al.*, 2008a). O complexo binário TF-FVIIa tem um papel na indução pró-angiogênica de IL-8 em um modelo de melanoma *in vitro*. O domínio citoplasmático do TF foi necessário para a indução pró-angiogênica de IL-8, consistente com a evidência *in vivo* para uma cooperação de PAR2 e sinalização do domínio citoplasmático do TF na sinalização celular promotora de tumor (ROTHMEIER *et al.*, 2017).

Martins-Cardoso observou que as células tratadas com NETs, expressam citocinas pró-inflamatórias também associadas à ativação de TEM. Na tentativa de analisar a associação da influência de TF sobre potenciais ativadores de TEM, utilizamos o anticorpo Mab-10H10, descrito por inibir potentemente a sinalização de TF-VIIa-PAR2 de células cancerosas (VERSTEEG, *et al.*, 2008b). Esse bloqueio da sinalização de TF com Mab-10H10 levou a uma inibição da expressão de CXCL8 para

níveis quase basais (Figura 8b). No entanto, o bloqueio da sinalização de TF não impactou a regulação da expressão de IL-6 pelas NETs, na linhagem MCF-7, o que pode sugerir uma regulação independente da sinalização por TF.

Outro ponto também observado é o enriquecimento de uma população de CSC apresentando superexpressão de CD44⁺ após tratamento com as NETs. Populações de CSCs em câncer de mama com um fenótipo CD44⁺/CD24⁻ têm sido associadas à maior tolerabilidade à quimioterapia, terapia hormonal e radioterapia (ROTHMEIER *et al.*, 2018), além de maior potencial metastático (LI *et al.*, 2018). Evidências tem apontado o TF como um potencial alvo terapêutico na superfície das CSCs. A co-expressão de CD44 e TF em subpopulações com maior agressividade tumoral também tem sido observada na literatura (HU *et al.*, 2017). Em nosso estudo, o bloqueio da sinalização de TF com Mab-10H10 levou à redução da expressão de CD44 aumentada pelas NETs (Figura 8a).

Utilizando modelo murino, tem-se observado que as células tumorais de mama MDA-MB-231 e 4T1 são capazes de recrutar neutrófilos para o microambiente tumoral através de uma maior expressão de G-CSF (KOWANETZ *et al.*, 2010). Neste modelo, o aumento no número de neutrófilos infiltrados no tumor aponta para maior formação de NETs no microambiente tumoral, contribuindo para a progressão do tumor e para o processo de metástase (PARK *et al.*, 2016). Diante disso, utilizamos uma assinatura gênica de neutrófilos numa análise *in silico* para inferir a presença de neutrófilos e, conseqüentemente NETs no microambiente tumoral.

Os genes de assinatura neutrofílica foram determinados a partir de RNA de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico isolado do sangue periférico total, gerando um perfil transcriptômico. Ao comparar os transcritos entre pacientes com e sem nefrite lúpica, determinou-se quais eram os transcritos predominantes superexpressos entre os grupos relacionados a neutrófilos (WITHER *et al.*, 2018).

Neste trabalho, dados de transcriptoma de pacientes com câncer de mama depositados no TCGA foram utilizados para avaliar a relevância clínica desse modelo. Inicialmente, utilizamos a plataforma Gepia 2, por ela permitir uma análise simultânea da transcrição/expressão dos genes de assinatura neutrofílica com o gene *F3* em 1085 amostras de pacientes com câncer de mama. Nessa primeira análise,

conseguimos observar uma correlação positiva entre a expressão de genes relacionados a neutrófilos e a expressão de TF em pacientes com câncer de mama (Figura 9), o que pode sugerir a influência dos neutrófilos/NETs sobre o TF.

Martins-Cardoso *et al.* (2020) correlacionaram positivamente a expressão de genes de assinatura neutrofílica e fatores pró-tumorais regulados *in vitro* após o tratamento com NETs, incluindo fatores pró-tumorais e fatores relacionados a TEM, sugerindo a contribuição dos neutrófilos no processo de TEM (MARTINS-CARDOSO *et al.*, 2020). Com base nisso, analisamos individualmente a correlação entre genes relacionados com TEM e o gene F3 em amostras de pacientes com câncer de mama depositadas no TCGA, através da plataforma do cBioPortal. Os resultados mostraram que a expressão de TF também mostrou correlação positiva com genes relacionados a TEM (Figura 10). Nossas análises são corroboradas por estudos mostrando que células induzidas por TEM, mas silenciadas para TF ou ZEB1, foram menos persistentes nos pulmões de camundongos, e células induzidas a expressarem Snail foram mais persistentes nos pulmões de camundongos (BOURCY *et al.*, 2016). Estes resultados sugerem a participação da via de TF induzido por TEM nos processos metastáticos iniciais.

As NETs são reconhecidas pelas células tumorais através de receptores de membrana que promovem a ativação de diferentes vias intracelulares de sinalização, as quais controlam processos celulares fundamentais. Essas vias incluem as MAP quinases, que são capazes de regular a proliferação, diferenciação e migração celular. Estudos apontam o reconhecimento das NETs pelos receptores do tipo toll-like 4 e 9 (TLR4/TLR9), ativando a via de transdução de MAPK, p38 e JNK. (TOHME *et al.*, 2016). Outro componente das NETs, o HMGB1, uma proteína de ligação ao DNA altamente conservada, também é capaz de ativar vias de sinalização dependentes de TLR9 nas células tumorais (CHEN *et al.*, 2021). Utilizando uma abordagem farmacológica, observamos que a regulação de TF pelas NETs na linhagem MCF-7 ocorre, pelo menos em parte, através das vias de MEK/ERK e JNK (Figura 11). Por outro lado, a via de sinalização mediada por p38 não apresentou o mesmo perfil regulatório de TF.

Alguns mecanismos são propostos para explicar a atividade pró-tumorigênica da elastase neutrofílica (NE), como o estímulo direto das vias proliferativas por

transativação extracelular de receptores de membrana, como EGFR (MIHARA *et al.*, 2013; RAMACHANDRAN *et al.*, 2011) e o TLR4 induzindo a sinalização da MAPK e efeitos *downstream* (ALBRENGUES *et al.*, 2018). A elastase neutrofílica pode transativar o EGFR através da clivagem e liberação de uma variedade de ligantes ligados à membrana, incluindo fator de crescimento transformador alfa (TGF α) e ligantes do tipo EGF. Adicionalmente, essa protease pode ativar a via PI3K-Akt através da internalização e degradação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) em células de câncer de pulmão (LERMAN; HAMMES, 2018). As NETs também podem interagir fisicamente com as células tumorais circulantes por meio de interações mediadas pela integrina β 1. A NE e a MMP-9 cortam sequencialmente a laminina, um componente importante da matriz extracelular, revelando um epítipo por meio da ativação da integrina e sinalização da via mediada por ERK (CHEN *et al.*, 2021). Não foi possível observar uma participação na regulação de TF pela via de PI3K e pela EGFR. Entretanto, a inibição da atividade enzimática da NE causou uma importante inibição na expressão de TF induzida pelas NETs. Futuras análises serão realizadas para determinar um possível receptor de interação da célula tumoral e da elastase contida nas NETs.

Em resumo, este trabalho sugere que as NETs apresentam um importante efeito na regulação da expressão de TF, em modelo *in vitro* de câncer de mama. O aumento na expressão de TF desempenha um papel chave na trombose associada ao câncer, progressão tumoral e metástase. O TF vem se mostrando como um potencial biomarcador e importante alvo para desenvolvimento de possíveis terapias antineoplásicas e quadros de trombose associada à doença. Neste contexto, abordagens capazes de bloquear o eixo NETs/TF poderiam impactar de forma significativa a progressão tumoral.

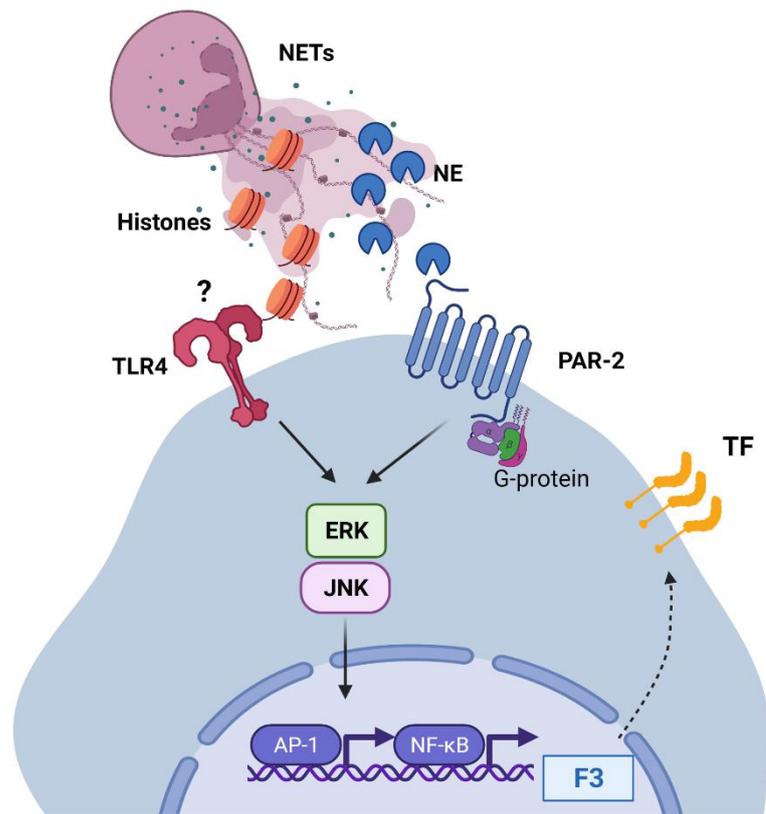


Figura 11: Modelo proposto da indução da expressão de TF induzido pelas NETs em células de câncer de mama humano. No modelo hipotetizado pelo nosso grupo, as NETs induzem a expressão de TF a partir de componentes presentes na própria rede. A partir da interação com histonas e NE presentes nas NETs, TLR4 e PAR-2 são capazes de ativar alguns membros das vias de MAPK como ERK e JNK, culminando na ativação dos fatores transcripcionais AP-1 e NFκB e, conseqüentemente, aumentando a expressão de TF nas células de câncer de mama.

6. CONCLUSÃO

- As NETs foram capazes de induzir a expressão de TF na linhagem de câncer de mama MCF-7; o mesmo perfil de indução não foi observado na linhagem T-47D.
- O aumento da expressão de TF induziu a um fenótipo pró-coagulante na linhagem MCF-7.
- A sinalização induzida por TF mostrou regular a expressão de marcadores de células tronco tumorais (CD44) e da citocina pró-inflamatória IL-8.
- A análise de dados de pacientes com câncer de mama, utilizando a base TCGA, mostrou uma correlação positiva entre genes de assinatura neutrofílica e TF e, também, entre TF e genes relacionados a TEM.
- A elastase neutrofílica, um importante componente das NETs, pode regular positivamente a expressão de TF.
- A indução da expressão de TF pelas NETs, na linhagem MCF-7, se mostrou dependente das vias de sinalização de MAPK e JNK.

7. PESPECTIVAS

- Avaliar a participação do complexo ternário TF-FVIIa-FXa e as consequentes reações envolvidas na coagulação induzida pelas NETs utilizando o anticorpo TF-5G9 como inibidor competitivo do FX;
- Observar a interação da ativação de TEM na modulação da expressão de TF em células tratadas com NETs através da dupla marcação de CD44 e TF;
- Investigar a participação de PAR2 e TLR4 induzida pelas NETs na regulação de TF;
- Observar a interação NETs, TEM e TF em amostras de biopsia de pacientes portadores de câncer.

8. REFERÊNCIAS

ABDOL RAZAK N, ELASKALANI O, METHAROM P. Pancreatic Cancer-Induced Neutrophil Extracellular Traps: A Potential Contributor to Cancer-Associated Thrombosis. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 24;18(3):487.

AHAMED J, VERSTEEG HH, KERVER M, CHEN VM, MUELLER BM, HOGG PJ, RUF W. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 19;103(38):13932-7.

ALBRENGUES J, SHIELDS MA, NG D, PARK CG, AMBRICO A, POINDEXTER ME, UPADHYAY P, UYEMINAMI DL, POMMIER A, KÜTTNER V, BRUŽAS E, MAIORINO L, BAUTISTA C, CARMONA EM, GIMOTTY PA, FEARON DT, CHANG K, LYONS SK, PINKERTON KE, TROTMAN LC, GOLDBERG MS, YEH JT, EGEBLAD M. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science.* 2018 Sep 28;361(6409).

AMULIC B, CAZALET C, HAYES GL, METZLER KD, ZYCHLINSKY A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:459-89.

AVGERINOS KI, SPYROU N, MANTZOROS CS, DALAMAGA M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism.* 2019 Mar;92:121-135.

BEN-SMITH A, DOVE SK, MARTIN A, WAKELAM MJ, SAVAGE CO. Antineutrophil cytoplasm autoantibodies from patients with systemic vasculitis activate neutrophils through distinct signaling cascades: comparison with conventional Fcγ receptor ligation. *Blood.* 2001 Sep 1;98(5):1448-55.

BIANCHI M, HAKKIM A, BRINKMANN V, SILER U, SEGER RA, ZYCHLINSKY A, REICHENBACH J. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood.* 2009 Sep 24;114(13):2619-22.

BONAVENTURA A, LIBERALE L, CARBONE F, VECCHIÉ A, DIAZ-CAÑESTRO C, CAMICI GG, MONTECUCCO F, DALLEGRI F. The Pathophysiological Role of Neutrophil Extracellular Traps in Inflammatory Diseases. *Thromb Haemost.* 2018 Jan;118(1):6-27.

BORREGAARD N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010 Nov 24;33(5):657-70.

BOURCY M, SUAREZ-CARMONA M, LAMBERT J, FRANCAERT ME, SCHROEDER H, DELIERNEUX C, SKRYPEK N, THOMPSON EW, JÉRUSALEM G, BERX G, THIRY M, BLACHER S, HOLLIER BG, NOËL A, OURY C, POLETTE M, GILLES C. Tissue Factor Induced by Epithelial-Mesenchymal Transition Triggers a Procoagulant State That Drives Metastasis of Circulating Tumor Cells. *Cancer Res.* 2016 Jul 15;76(14):4270-82.

BRANZK N, LUBOJEMSKA A, HARDISON SE, WANG Q, GUTIERREZ MG, BROWN GD, PAPAYANNOPOULOS V. Neutrophils sense microbe size and selectively release

neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.* 2014 Nov;15(11):1017-25.

BRANZK N, PAPAYANNOPOULOS V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol.* 2013 Jul;35(4):513-30.

BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LA, JEMAL A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424.

BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS DS, WEINRAUCH Y, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.

BRINKMANN V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J Innate Immun.* 2018;10(5-6):414-421.

CEDERVALL J, HAMIDI A, OLSSON AK. Platelets, NETs and cancer. *Thromb Res.* 2018 Apr;164 Suppl 1:S148-S152.

CERAMI E, GAO J, DOGRUSOZ U, GROSS BE, SUMER SO, AKSOY BA, JACOBSEN A, BYRNE CJ, HEUER ML, LARSSON E, ANTIPIN Y, REVA B, GOLDBERG AP, SANDER C, SCHULTZ N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012 May;2(5):401-4.

CHEN Q, ZHANG L, LI X, ZHUO W. Neutrophil Extracellular Traps in Tumor Metastasis: Pathological Functions and Clinical Applications. *Cancers (Basel).* 2021 Jun 6;13(11):2832.

CLARK SR, MA AC, TAVENER SA, MCDONALD B, GOODARZI Z, KELLY MM, PATEL KD, CHAKRABARTI S, MCAVOY E, SINCLAIR GD, KEYS EM, ALLEN-VERCOE E, DEVINNEY R, DOIG CJ, GREEN FH, KUBES P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007 Apr;13(4):463-9.

CRISTINZIANO L, MODESTINO L, ANTONELLI A, MARONE G, SIMON HU, VARRICCHI G, GALDIERO MR. Neutrophil extracellular traps in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2021 Jul 16:S1044-579X(21)00206-6.

DA CRUZ PAULA A, LOPES C. Implications of Different Cancer Stem Cell Phenotypes in Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2017 May;37(5):2173-2183

DA-SILVA JLE, FINOTTI LFT. Armadilhas extracelulares dos neutrófilos: descrição e envolvimento em processos autoimunes. *Arq Asma Alerg Imunol.* 2019 Mar;3(1):18-24.

DE OLIVEIRA S, REYES-ALDASORO CC, CANDEL S, RENSHAW SA, MULERO V, CALADO A. Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J Immunol.* 2013 Apr 15;190(8):4349-59.

DEMERS M, KRAUSE DS, SCHATZBERG D, MARTINOD K, VOORHEES JR, FUCHS TA, SCADDEN DT, WAGNER DD. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 7;109(32):13076-81.

DONGRE A, WEINBERG RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Feb;20(2):69-84.

ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516.

FALANGA A, MARCHETTI M, VIGNOLI A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. *J Thromb Haemost*. 2013 Feb;11(2):223-33.

FALANGA A, PANOVA-NOEVA M, RUSSO L. Procoagulant mechanisms in tumour cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009 Mar;22(1):49-60.

FARRERA C, FADEEL B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol*. 2013 Sep 1;191(5):2647-56

FERNANDES RS, KIRSZBERG C, RUMJANEK VM, MONTEIRO RQ. On the molecular mechanisms for the highly procoagulant pattern of C6 glioma cells. *J Thromb Haemost*. 2006 Jul;4(7):1546-52.

FILLMORE CM, KUPERWASSER C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2008;10(2):R25.

FUCHS TA, ABED U, GOOSMANN C, HURWITZ R, SCHULZE I, WAHN V, WEINRAUCH Y, BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007 Jan 15;176(2):231-41

GAO J, AKSOY BA, DOGRUSOZ U, DRESDNER G, GROSS B, SUMER SO, SUN Y, JACOBSEN A, SINHA R, LARSSON E, CERAMI E, SANDER C, SCHULTZ N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013 Apr 2;6(269):pl1.

GARCIA-ROMO GS, CAIELLI S, VEGA B, CONNOLLY J, ALLANTAZ F, XU Z, PUNARO M, BAISCH J, GUIDUCCI C, COFFMAN RL, BARRAT FJ, BANCHEREAU J, PASCUAL V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011 Mar 9;3(73):73ra20.

GARNER H, DE VISSER KE. Immune crosstalk in cancer progression and metastatic spread: a complex conversation. *Nat Rev Immunol*. 2020 Aug;20(8):483-497

GARNIER D, MAGNUS N, LEE TH, BENTLEY V, MEEHAN B, MILSOM C, MONTERMINI L, KISLINGER T, RAK J. Cancer cells induced to express mesenchymal phenotype release exosome-like extracellular vesicles carrying tissue factor. *J Biol Chem*. 2012 Dec 21;287(52):43565-72.

GUIMARÃES-COSTA AB, NASCIMENTO MT, WARDINI AB, PINTO-DA-SILVA LH, SARAIVA EM. ETOSIS: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res.* 2012;2012:929743.

HAKKIM A, FUCHS TA, MARTINEZ NE, HESS S, PRINZ H, ZYCHLINSKY A, WALDMANN H. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol.* 2011 Feb;7(2):75-7.

HAMILTON JR, TREJO J. Challenges and Opportunities in Protease-Activated Receptor Drug Development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2017 Jan 6;57:349-373.

HAMPSON P, HAZELDINE J, LORD JM. Neutrophil apoptosis and its induction as a potential treatment for chronic inflammatory disease. *Curr Opin Hematol.* 2013 Jan;20(1):10-5.

HANAHAN D, COUSSENS LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012 Mar 20;21(3):309-22

HARBECK N, PENAULT-LLORCA F, CORTES J, GNANT M, HOUSSAMI N, POORTMANS P, RUDDY K, TSANG J, CARDOSO F. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2019 Sep 23;5(1):66.

HISADA Y, MACKMAN N. Tissue Factor and Cancer: Regulation, Tumor Growth, and Metastasis. *Semin Thromb Hemost.* 2019 Jun;45(4):385-395.

HOLLIDAY DL, SPEIRS V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011 Aug 12;13(4):215.

HOMA-MLAK I, MAJDAN A, MLAK R, MAŁECKA-MASSALSKA T. Metastatic potential of NET in neoplastic disease. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2016 Aug 31;70(0):887-95.

HU P, SHEN M, ZHANG P, ZHENG C, PANG Z, ZHU L, DU J. Intratumoral neutrophil granulocytes contribute to epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Tumour Biol.* 2015 Sep;36(10):7789-96.

HU Z, XU J, CHENG J, MCMICHAEL E, YU L, CARSON WE 3rd. Targeting tissue factor as a novel therapeutic oncotarget for eradication of cancer stem cells isolated from tumor cell lines, tumor xenografts and patients of breast, lung and ovarian cancer. *Oncotarget.* 2017 Jan 3;8(1):1481-1494.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019a.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019b.

JIN NZ, GOPINATH SCB. Potential blood clotting factors and anticoagulants. *Biomed Pharmacother.* 2016 Dec;84:356-365.

JIN W, YIN H, LI H, YU XJ, XU HX, LIU L. Neutrophil extracellular DNA traps promote pancreatic cancer cells migration and invasion by activating EGFR/ERK pathway. *J Cell Mol Med*. 2021 Jun;25(12):5443-5456.

JUNG HS, GU J, KIM JE, NAM Y, SONG JW, KIM HK. Cancer cell-induced neutrophil extracellular traps promote both hypercoagulability and cancer progression. *PLoS One*. 2019 Apr 29;14(4):e0216055.

KAPLAN MJ, RADIC M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol*. 2012 Sep 15;189(6):2689-95.

KENNY EF, HERZIG A, KRÜGER R, MUTH A, MONDAL S, THOMPSON PR, BRINKMANN V, BERNUTH HV, ZYCHLINSKY A. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*. 2017 Jun 2;6:e24437

KEYDAR I, CHEN L, KARBY S, WEISS FR, DELAREA J, RADU M, CHAITCIK S, BRENNER HJ. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer*. 1979 May;15(5):659-70.

KIRSZBERG C, LIMA LG, DA SILVA DE OLIVEIRA A, PICKERING W, GRAY E, BARROWCLIFFE TW, RUMJANEK VM, MONTEIRO RQ. Simultaneous tissue factor expression and phosphatidylserine exposure account for the highly procoagulant pattern of melanoma cell lines. *Melanoma Res*. 2009 Oct;19(5):301-8.

KOLACZKOWSKA E, JENNE CN, SUREWAARD BG, THANABALASURIAR A, LEE WY, SANZ MJ, MOWEN K, OPDENAKKER G, KUBES P. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun*. 2015 Mar 26;6:6673.

KOWANETZ M, WU X, LEE J, TAN M, HAGENBEEK T, QU X, YU L, ROSS J, KORSISAARI N, CAO T, BOU-RESLAN H, KALLOP D, WEIMER R, LUDLAM MJ, KAMINKER JS, MODRUSAN Z, VAN BRUGGEN N, PEALE FV, CARANO R, MENG YG, FERRARA N. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 14;107(50):21248-55.

KOZŁOWSKI L, ZAKRZEWSKA I, TOKAJUK P, WOJTUKIEWICZ MZ. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2003;48:82-4.

LEE W, KO SY, MOHAMED MS, KENNY HA, LENGYEL E, NAORA H. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum. *J Exp Med*. 2019 Jan 7;216(1):176-194.

LEIVA O, NEWCOMB R, CONNORS JM, AL-SAMKARI H. Cancer and thrombosis: new insights to an old problem. *J Med Vasc*. 2020 Nov;45(6S):6S8-6S16.

LERMAN I, HAMMES SR. Neutrophil elastase in the tumor microenvironment. *Steroids*. 2018 May;133:96-101.

- LI J, CHEN Z, SU K, ZENG J. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Jul 1;8(7):8500-5.
- LI P, LI M, LINDBERG MR, KENNETT MJ, XIONG N, WANG Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2010 Aug 30;207(9):1853-62.
- LI T, MELLO-THOMS C, BRENNAN PC. Descriptive epidemiology of breast cancer in China: incidence, mortality, survival and prevalence. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Oct;159(3):395-406.
- LI W, MA H, ZHANG J, ZHU L, WANG C, YANG Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep*. 2017 Oct 23;7(1):13856.
- LÜTTICH L, BESSO MJ, HEIDEN S, KOI L, BAUMANN M, KRAUSE M, DUBROVSKA A, LINGE A, KURTH I, PEITZSCH C. Tyrosine Kinase c-MET as Therapeutic Target for Radiosensitization of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 14;13(8):1865.
- MACKMAN N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 2008 Feb 21;451(7181):914-8.
- MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A, BALKWILL F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44.
- MARTINS-CARDOSO K, ALMEIDA VH, BAGRI KM, ROSSI MID, MERMELSTEIN CS, KÖNIG S, MONTEIRO RQ. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Promote Pro-Metastatic Phenotype in Human Breast Cancer Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 11;12(6):1542.
- MASUCCI MT, MINOPOLI M, CARRIERO MV. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front Oncol*. 2019 Nov 15;9:1146.
- MASUCCI MT, MINOPOLI M, DEL VECCHIO S, CARRIERO MV. The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Front Immunol*. 2020 Sep 16;11:1749.
- MAYADAS TN, CULLERE X, LOWELL CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:181-218.
- MCEACHRON T, MACKMAN N. Tumors, ticks and tissue factor. *J Thromb Haemost*. 2009 Nov;7(11):1852-4.
- METZLER KD, GOOSMANN C, LUBOJEMSKA A, ZYCHLINSKY A, PAPAYANNOPOULOS V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep*. 2014 Aug 7;8(3):883-96.

MIHARA K, RAMACHANDRAN R, RENAUX B, SAIFEDDINE M, HOLLENBERG MD. Neutrophil elastase and proteinase-3 trigger G protein-biased signaling through proteinase-activated receptor-1 (PAR1). *J Biol Chem*. 2013 Nov 15;288(46):32979-90.

MITROULIS I, KAMBAS K, CHRYSANTHOPOULOU A, SKENDROS P, APOSTOLIDOU E, KOURTZELIS I, DROSOS GI, BOUMPAS DT, RITIS K. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One*. 2011;6(12):e29318.

MITTAL V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol*. 2018 Jan 24;13:395-412.

MONTAGNANA M, LIPPI G. Cancer diagnostics: current concepts and future perspectives. *Ann Transl Med*. 2017 Jul;5(13):268.

MOSCHONAS IC, TSELEPIS AD. The pathway of neutrophil extracellular traps towards atherosclerosis and thrombosis. *Atherosclerosis*. 2019 Sep;288:9-16.

MUKAI M, OKA T. Mechanism and management of cancer-associated thrombosis. *J Cardiol*. 2018 Aug;72(2):89-93.

MULLER WA. Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol*. 2013 Jan;50(1):7-22.

NAESS IA, CHRISTIANSEN SC, ROMUNDSTAD P, CANNEGIETER SC, ROSENDAAL FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost*. 2007 Apr;5(4):692-9.

NAJMEH S, COOLS-LARTIGUE J, GIANNIAS B, SPICER J, FERRI LE. Simplified Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Isolation and Handling. *J Vis Exp*. 2015 Apr 16;(98):52687.

NAUSEEF WM, BORREGAARD N. Neutrophils at work. *Nat Immunol*. 2014 Jul;15(7):602-11.

NG S, CARRIER M. Prevention and treatment of cancer-associated thrombosis. *Curr Oncol*. 2020 Oct;27(5):275-278.

NIE M, YANG L, BI X, WANG Y, SUN P, YANG H, LIU P, LI Z, XIA Y, JIANG W. Neutrophil Extracellular Traps Induced by IL8 Promote Diffuse Large B-cell Lymphoma Progression via the TLR9 Signaling. *Clin Cancer Res*. 2019 Mar 15;25(6):1867-1879.

NIETO MA, HUANG RY, JACKSON RA, THIERY JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016 Jun 30;166(1):21-45.

NIETO MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *Int J Dev Biol*. 2009;53(8-10):1541-7.

OKLU R, SHETH RA, WONG KHK, JAHROMI AH, ALBADAWI H. Neutrophil extracellular traps are increased in cancer patients but does not associate with venous thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2017 Dec;7(Suppl 3):S140-S149.

ØSTERUD B, BJØRKLID E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost.* 2006 Feb;32(1):11-23.

PAPAYANNOPOULOS V, METZLER KD, HAKKIM A, ZYCHLINSKY A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010 Nov 1;191(3):677-91.

PAPAYANNOPOULOS V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018 Feb;18(2):134-147.

PARK J, WYSOCKI RW, AMOOZGAR Z, MAIORINO L, FEIN MR, JORNS J, SCHOTT AF, KINUGASA-KATAYAMA Y, LEE Y, WON NH, NAKASONE ES, HEARN SA, KÜTTNER V, QIU J, ALMEIDA AS, PERURENA N, KESSENBROCK K, GOLDBERG MS, EGEBLAD M. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med.* 2016 Oct 19;8(361):361ra138

PARK SY, CHOI JH, NAM JS. Targeting Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 Jul 9;11(7):965.

PILSCZEK FH, SALINA D, POON KK, FAHEY C, YIPP BG, SIBLEY CD, ROBBINS SM, GREEN FH, SURETTE MG, SUGAI M, BOWDEN MG, HUSSAIN M, ZHANG K, KUBES P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010 Dec 15;185(12):7413-25.

PIÑEROS M, PARKIN DM, WARD K, CHOKUNONGA E, ERVIK M, FARRUGIA H, GOSPODAROWICZ M, O'SULLIVAN B, SOERJOMATARAM I, SWAMINATHAN R, ZNAOR A, BRAY F, BRIERLEY J. Essential TNM: a registry tool to reduce gaps in cancer staging information. *Lancet Oncol.* 2019 Feb;20(2):e103-e111.

QIU SL, ZHANG H, TANG QY, BAI J, HE ZY, ZHANG JQ, LI MH, DENG JM, LIU GN, ZHONG XN. Neutrophil extracellular traps induced by cigarette smoke activate plasmacytoid dendritic cells. *Thorax.* 2017 Dec;72(12):1084-1093.

RADA B. Neutrophil Extracellular Traps. *Methods Mol Biol.* 2019;1982:517-528.

RAFTERY MJ, LALWANI P, KRAUTKRÄMER E, PETERS T, SCHARFFETTER-KOCHANEK K, KRÜGER R, HOFMANN J, SEEGER K, KRÜGER DH, SCHÖNRICH G. β 2 integrin mediates hantavirus-induced release of neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2014 Jun 30;211(7):1485-97.

RAMACHANDRAN R, MIHARA K, CHUNG H, RENAUX B, LAU CS, MURUVE DA, DEFEA KA, BOUVIER M, HOLLENBERG MD. Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2). *J Biol Chem.* 2011 Jul 15;286(28):24638-48.

RAO LV, PENDURTHI UR. Regulation of tissue factor coagulant activity on cell surfaces. *J Thromb Haemost.* 2012 Nov;10(11):2242-53.

RAVINDRAN M, KHAN MA, PALANIYAR N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules.* 2019 Aug 14;9(8):365.

REMIJSEN Q, VANDEN BERGHE T, WIRAWAN E, ASSELBERGH B, PARTHOENS E, DE RYCKE R, NOPPEN S, DELFORGE M, WILLEMS J, VANDENABEELE P. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 2011 Feb;21(2):290-304.

ROCHA JD, NASCIMENTO MT, DECOTE-RICARDO D, CÔRTE-REAL S, MORROT A, HEISE N, NUNES MP, PREVIATO JO, MENDONÇA-PREVIATO L, DOSREIS GA, SARAIVA EM, FREIRE-DE-LIMA CG. Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* modulate production of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophils. *Sci Rep.* 2015 Jan 26;5:8008.

RONDON AMR, DE ALMEIDA VH, GOMES T, VERÇOZA BR, CARVALHO RS, KÖNIG S, RODRIGUES JCF, MERMELSTEIN CDS, VERSTEEG HH, MONTEIRO RQ. Tissue factor mediates microvesicles shedding from MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jul 7;502(1):137-144.

ROTHMEIER AS, LIU E, CHAKRABARTY S, DISSE J, MUELLER BM, ØSTERGAARD H, RUF W. Identification of the integrin-binding site on coagulation factor VIIa required for proangiogenic PAR2 signaling. *Blood.* 2018 Feb 8;131(6):674-685.

RUF W, YOKOTA N, SCHAFFNER F. Tissue factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res.* 2010 Apr;125 Suppl 2(0 2):S36-8.

SENGUPTA S, SUBRAMANIAN BC, PARENT CA. Getting TANned: How the tumor microenvironment drives neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol.* 2019 Mar;105(3):449-462.

SHAKER H, HARRISON H, CLARKE R, LANDBERG G, BUNDRED NJ, VERSTEEG HH, KIRWAN CC. Tissue Factor promotes breast cancer stem cell activity in vitro. *Oncotarget.* 2017 Apr 18;8(16):25915-25927.

SHAUL ME, FRIDLENDER ZG. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019 Oct;16(10):601-620.

SHIBUE T, WEINBERG RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Oct;14(10):611-629.

SNODERLY HT, BOONE BA, BENNEWITZ MF. Neutrophil extracellular traps in breast cancer and beyond: current perspectives on NET stimuli, thrombosis and metastasis, and clinical utility for diagnosis and treatment. *Breast Cancer Res.* 2019 Dec 18;21(1):145.

SOULE HD, VAZGUEZ J, LONG A, ALBERT S, BRENNAN M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973 Nov;51(5):1409-16.

SOUSA-ROCHA D, THOMAZ-TOBIAS M, DINIZ LF, SOUZA PS, PINGE-FILHO P, TOLEDO KA. *Trypanosoma cruzi* and Its Soluble Antigens Induce NET Release by Stimulating Toll-Like Receptors. *PLoS One.* 2015 Oct 2;10(10):e0139569.

SUAREZ-CARMONA M, LESAGE J, CATALDO D, GILLES C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol*. 2017 Jul;11(7):805-823.

SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249.

TENG TS, JI AL, JI XY, LI YZ. Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *J Immunol Res*. 2017;2017:9671604.

TEPLYAKOV A, OBMOLOVA G, MALIA TJ, RAGHUNATHAN G, MARTINEZ C, FRANSSON J, EDWARDS W, CONNOR J, HUSOVSKY M, BECK H, CHI E, FENTON S, ZHOU H, ALMAGRO JC, GILLILAND GL. Structural insights into humanization of anti-tissue factor antibody 10H10. *MAbs*. 2018 Feb/Mar;10(2):269-277.

THIERY JP, ACLOQUE H, HUANG RY, NIETO MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):871-90.

TOMCZAK K, CZERWIŃSKA P, WIZNEROWICZ M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2015;19(1A):A68-77.

TOHME S, YAZDANI HO, AL-KHAFAJI AB, CHIDI AP, LOUGHRAN P, MOWEN K, WANG Y, SIMMONS RL, HUANG H, TSUNG A. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res*. 2016 Mar 15;76(6):1367-80.

TORRE LA, SIEGEL RL, WARD EM, JEMAL A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016 Jan;25(1):16-27.

URBAN CF, REICHARD U, BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*. 2006 Apr;8(4):668-76.

VAN DEN BERG YW, OSANTO S, REITSMA PH, VERSTEEG HH. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood*. 2012 Jan 26;119(4):924-32.

VERSTEEG HH, SCHAFFNER F, KERVER M, ELLIES LG, ANDRADE-GORDON P, MUELLER BM, RUF W. Protease-activated receptor (PAR) 2, but not PAR1, signaling promotes the development of mammary adenocarcinoma in polyoma middle T mice. *Cancer Res*. 2008 Sep 1;68(17):7219-27.

VERSTEEG HH, SCHAFFNER F, KERVER M, PETERSEN HH, AHAMED J, FELDING-HABERMANN B, TAKADA Y, MUELLER BM, RUF W. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):190-9.

VIEIRA, DSC, DUFLOTH, RM, SCHMITT, FCL., ZEFERINO, LC. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. Rev Bras de Ginecol e Obst. 2008 Oct 30(1), 42-47.

VOROBJEVA NV, PINEGIN BV. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. Biochemistry (Mosc). 2014 Dec;79(12):1286-96.

WALCHER L, KISTENMACHER AK, SUO H, KITTE R, DLUCZEK S, STRAUß A, BLAUDSZUN AR, YEVSJA T, FRICKE S, KOSSATZ-BOEHLERT U. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. Front Immunol. 2020 Aug 7;11:1280.

WANG Y, LI M, STADLER S, CORRELL S, LI P, WANG D, HAYAMA R, LEONELLI L, HAN H, GRIGORYEV SA, ALLIS CD, COONROD SA. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. J Cell Biol. 2009 Jan 26;184(2):205-13

WEIDENFELD K, BARKAN D. EMT and Stemness in Tumor Dormancy and Outgrowth: Are They Intertwined Processes? Front Oncol. 2018 Sep 12;8:381

WITHER JE, PROKOPEC SD, NOAMANI B, CHANG NH, BONILLA D, TOUMA Z, AVILA-CASADO C, REICH HN, SCHOLEY J, FORTIN PR, BOUTROS PC, LANDOLT-MARTICORENA C. Identification of a neutrophil-related gene expression signature that is enriched in adult systemic lupus erythematosus patients with active nephritis: Clinical/pathologic associations and etiologic mechanisms. PLoS One. 2018 May 9;13(5):e0196117.

WU M, MA M, TAN Z, ZHENG H, LIU X. Neutrophil: A New Player in Metastatic Cancers. Front Immunol. 2020 Sep 24;11:565165.

YANG C, SUN W, CUI W, LI X, YAO J, JIA X, LI C, WU H, HU Z, ZOU X. Procoagulant role of neutrophil extracellular traps in patients with gastric cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Nov 1;8(11):14075-86.

YANG L, LIN PC. Mechanisms that drive inflammatory tumor microenvironment, tumor heterogeneity, and metastatic progression. Semin Cancer Biol. 2017 Dec;47:185-195.

YANG L, LIU Q, ZHANG X, LIU X, ZHOU B, CHEN J, HUANG D, LI J, LI H, CHEN F, LIU J, XING Y, CHEN X, SU S, SONG E. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. Nature. 2020 Jul;583(7814):133-138.

YEO SK, GUAN JL. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? Trends Cancer. 2017 Nov;3(11):753-760.

YEUNG KT, YANG J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. Mol Oncol. 2017 Jan;11(1):28-39.

YIPP BG, KUBES P. NETosis: how vital is it? Blood. 2013 Oct 17;122(16):2784-94.

YIPP BG, PETRI B, SALINA D, JENNE CN, SCOTT BN, ZBYTNUIK LD, PITTMAN K, ASADUZZAMAN M, WU K, MEIJNDERT HC, MALAWISTA SE, DE BOISFLEURY

CHEVANCE A, ZHANG K, CONLY J, KUBES P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012 Sep;18(9):1386-93.

YOUSEFI S, GOLD JA, ANDINA N, LEE JJ, KELLY AM, KOZLOWSKI E, SCHMID I, STRAUMANN A, REICHENBACH J, GLEICH GJ, SIMON HU. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*. 2008 Sep;14(9):949-53.

YOUSEFI S, MIHALACHE C, KOZLOWSKI E, SCHMID I, SIMON HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2009 Nov;16(11):1438-44

YUAN Y, JIANG YC, SUN CK, CHEN QM. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). *Oncol Rep*. 2016 May;35(5):2499-515.

ZELAYA H, ROTHMEIER AS, RUF W. Tissue factor at the crossroad of coagulation and cell signaling. *J Thromb Haemost*. 2018 Oct;16(10):1941-1952.

ZHAO J, AGUILAR G, PALENCIA S, NEWTON E, ABO A. rNAPc2 inhibits colorectal cancer in mice through tissue factor. *Clin Cancer Res*. 2009 Jan 1;15(1):208-16.

ZHU T, ZOU X, YANG C, LI L, WANG B, LI R, LI H, XU Z, HUANG D, WU Q. Neutrophil extracellular traps promote gastric cancer metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Int J Mol Med*. 2021 Jul;48(1):127.

CURRICULUM VITAE

- Nome: **Aquiles Mação Júnior**
- Nascimento: **31/08/1982**
- Naturalidade: **Brasileira**

Formação Acadêmica

- Graduação: Ciências Biológicas, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2002 a 2007.
- Especialização: Análises Clínicas, Faculdades Integradas de Jacarepaguá, 2011 a 2012
- Mestrado: Química Biológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro e 2018 a 2021.

Experiência Profissional

1. Tecnologista Pleno em Análises Clínicas, Instituto Nacional do Câncer, 2011 aos dias atuais.