



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
CURSO DE FARMÁCIA

Helena Souza Zancanaro

**Proteína p53 mutante em câncer de mama triplo-negativo: impacto no perfil  
inflamatório tumoral e de macrófagos em modelos celulares *in vitro***

Florianópolis

2024

Helena Souza Zancanaro

**Proteína p53 mutante em câncer de mama triplo-negativo: impacto no perfil  
inflamatório tumoral e de macrófagos em modelos celulares *in vitro***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Farmácia.

Orientador(a): Prof. Alfeu Zanotto-Filho  
Coorientador(a): Dra. Nauana Somensi

Florianópolis

2024

Zancanaro, Helena Souza

Proteína p53 mutante em câncer de mama triplo-negativo: impacto no perfil inflamatório tumoral e de macrófagos em modelos celulares in vitro / Helena Souza Zancanaro ; orientador, Alfeu Zanotto-Filho, coorientador, Nuana Somensi, 2024.

45 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. p53 mutante. 3. macrófago associado a tumor. 4. câncer de mama triplo-negativo. I. Zanotto-Filho, Alfeu . II. Somensi, Nuana. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Helena Souza Zancanaro

**Proteína p53 mutante em câncer de mama triplo-negativo: impacto no perfil  
inflamatório tumoral e de macrófagos em modelos celulares *in vitro***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Farmacêutico e  
aprovado em sua forma final pelo Curso de Bacharel em Farmácia

Florianópolis, 09 de dezembro de 2024.



Coordenação do Curso

**Banca examinadora**



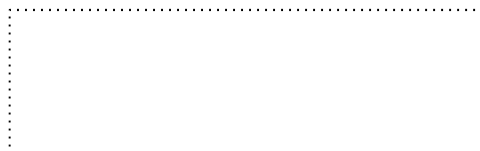
Prof. Alfeu Zanotto-Filho

Orientador



Prof.(a) Fabíola Branco Filippin Monteiro

UFSC - ACL



Dr.(a) Raquel Nascimento das Neves

UFSC - MIP

Florianópolis, 2024

Dedico esse trabalho à Dona Nilva. Qualquer dia, qualquer hora, a gente se encontra  
seja onde for pra falar de amor. Obrigada vó.

## **AGRADECIMENTOS**

Meu grande agradecimento ao Professor Alfeu Zanotto-Filho por ter me aceitado como aluna de Iniciação Científica em 2021, mesmo sabendo que eu nunca havia tido contato com a Ciência. Durante esses anos no Labcancer pude aprender muito com ele e meus colegas. Agradeço principalmente por sempre ter me incentivado e acreditado em mim. Além disso, sua orientação sempre me desafiou a compreender o "porquê" das coisas e a pensar de forma crítica.

Agradeço aos meus pais que me apoiaram em todos os momentos, independentemente das minhas decisões e me deram conforto emocional sempre que precisei. Sou grata a minha mãe que, mesmo em meio a momentos estressantes e de nervosismo, nunca deixou de estar do meu lado e ao meu pai que mesmo com um jeito diferente de demonstrar, sempre teve orgulho do meu trabalho e esteve ao meu lado celebrando minhas conquistas. Agradeço aos meus padrinhos e a minha família por também sempre estarem por perto, interessados com o andamento da minha pesquisa e me apoiando com lindas palavras. Aos meus avós que já partiram, saibam que são o motivo de eu estar vivendo isso. Um agradecimento especial à minha avó Terezinha Nilva, a pessoa com o coração mais lindo que já conheci, e que sempre sonhou em me ver formada. Você foi combustível a todo momento.

Também essenciais no processo de montar esse trabalho, são os meus colegas de laboratório que não mediram esforços para auxiliar durante os experimentos, mas também sendo apoio emocional. Vocês são os famosos amigos da faculdade que irei levar para a vida. Obrigada Bárbara por atender meus telefonemas e ter a paciência de me escutar e ajudar sempre, você foi essencial nesse processo. Obrigada Nauana por coorientar e auxiliar, mesmo em um momento tão especial da sua vida.

Por fim, agradeço a todos que conheci e fiquei mais próxima durante esse percurso, e aos amigos de longa data que sempre escutaram meus choros, às vezes mesmo sem entender bem o que eu estava falando, mas que também me acompanharam em momentos tão especiais durante esses anos de graduação.

## RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres em todo o mundo, sendo o câncer de mama triplo-negativo (TNBC) um dos subtipos mais agressivos e de pior prognóstico. Diversas vias regulatórias e mutações têm sido investigadas em TNBC, a fim de se encontrar um alvo farmacológico mais específico. Dentre as mutações associadas ao TNBC, destaca-se a do gene supressor de tumor TP53, presente em cerca de 80% dos casos, sugerindo um papel importante na patogênese desses cânceres. Ademais, o TNBC tem alta presença de macrófagos associados a tumor (TAMs) no microambiente tumoral, os quais podem expressar um fenótipo tipo-M1 (pró-inflamatório) ou tipo-M2 (anti-inflamatório) e são importantes em processos tumorigênicos. Assim, avaliamos a influência da p53 mutante na expressão gênica de transcritos relacionados a inflamação, na secreção da interleucina 8 (IL-8) e na modulação do perfil fenotípico de macrófagos. Utilizamos a linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 (p53<sup>R280K</sup>) e monócitos U937 diferenciados a macrófagos utilizando o PMA a 100 nM por 48 h. Para indução dos fenótipos M1 e M2 foram utilizados, respectivamente, IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) + LPS (100 ng/mL) e IL-4 (20 ng/mL). A análise feita nos macrófagos envolveu RT-qPCR (CXCL10, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  como marcadores M1, e CCL22, IL-10 e TGF- $\beta$ 1 para M2), enquanto as metodologias usadas na linhagem tumoral MDA-MB231 abrangeram RT-qPCR (CXCL2, CXCL3, IL-6, IL-8 e PD-L1/CD274) e ELISA (IL-8) para avaliação de genes e proteínas relacionados à inflamação e Western Blot para confirmação da depleção de p53. Constatou-se que o modelo de diferenciação de monócito à macrófago foi eficiente a partir das análises morfológicas e de expressão gênica, assim como a indução do perfil M1, pelo aumento de transcritos pró-inflamatórios. A indução do fenótipo M2 foi inferida pelo perfil morfológico e ausência de indução dos genes inflamatórios, entretanto, os marcadores M2 selecionados não apresentaram diferença em relação ao grupo diferenciado apenas com PMA. Observou-se que a depleção da p53 mutante reduziu a secreção de IL-8 e a expressão de PD-L1. Contudo, a análise de expressão gênica dos marcadores M1/M2 nos macrófagos U937 expostos ao meio condicionado de MDA-MB-231, não mostrou evidência de polarização M1/M2, independente da depleção ou não de p53 mutante, no protocolo estudado. O estudo contribui validando um modelo de diferenciação de U937 a macrófago e de indução de fenótipo M1 e M2, embora este último requer refinamento dos marcadores gênicos. Auxilia ainda na compreensão do papel da p53 mutante na modulação do microambiente tumoral, destacando sua influência na expressão de PD-L1 e IL-8, e dá suporte a futuros ajustes no modelo de diferenciação monócito-macrófago induzido pelo secretoma de células tumorais.

**Palavras-chave:** mutação em p53; macrófagos associados a tumor; câncer de mama triplo negativo.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent neoplasm among women worldwide, with triple-negative breast cancer (TNBC) being one of the most aggressive subtypes and having the poorest prognosis. Several regulatory pathways and mutations have been investigated in TNBC to identify more specific pharmacological targets. Among the mutations associated with TNBC, the tumor suppressor gene TP53 mutation stands out, present in approximately 80% of cases, suggesting an important role in the pathogenesis of these cancers. Moreover, TNBC exhibits a high presence of tumor-associated macrophages (TAMs) in the tumor microenvironment, which can express either an M1 (pro-inflammatory) or M2 (anti-inflammatory) phenotype and play a crucial role in tumorigenic processes. In this study, we evaluated the influence of mutant p53 on the gene expression of inflammation-related transcripts, interleukin-8 (IL-8) secretion, and modulation of macrophage phenotypic profiles. We used the MDA-MB-231 breast cancer cell line (p53<sup>R280K</sup>) and U937 monocytes differentiated into macrophages using 100 nM PMA for 48 h. To induce the M1 and M2 phenotypes, we treated U937 cells with IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) + LPS (100 ng/mL), and IL-4 (20 ng/mL), respectively. The analysis performed on macrophages involved RT-qPCR for CXCL10, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  as M1 markers, and CCL22, IL-10, and TGF- $\beta$ 1 as markers for M2. The methods used in MDA-MB231 cells included RT-qPCR for CXCL2, CXCL3, IL-6, IL-8, and PD-L1 expression, and ELISA for IL-8 quantification in the conditioned medium, and Western Blot to assess the efficiency of p53 depletion in siRNA assays. The results showed that the monocyte-to-macrophage differentiation model was effective based on cell morphology and gene expression assessments, as well as the induction of the M1 profile, as evidenced by increased pro-inflammatory transcripts' expression. The IL4-polarized cells showed macrophage-like cell morphology, with no altered expression of the M1 or M2 markers tested herein, thereby indicating that further refinement of the M2 phenotype is needed. In MDA-MB231 cells, mutant p53 depletion reduced IL-8 protein levels in the secretome, and decreased PD-L1 gene expression. However, the gene expression analysis of M1/M2 markers in U937 macrophages exposed to the conditioned medium from MDA-MB-231 cells showed no evidence of M1/M2 polarization, regardless of mutant p53 depletion. In summary, this study establishes a monocyte-to-macrophage differentiation model, with subsequent M1 and M2 polarization in U937 cells. It also aids in understanding the role of mutant p53 in modulating the tumor microenvironment, highlighting its influence on PD-L1 and IL-8 expression. In perspective, the experiments performed herein also set the ground for future studies on the impact of oncogenes and tumor suppressors upon cancer cells secretome-induced M1/M2 macrophages in the tumor microenvironment.

**Keywords:** mutant p53; tumor-associated macrophages; triple-negative breast cancer.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1 – Hallmarks do Câncer .....</b>                                                                                                             | <b>14</b> |
| <b>Figura 2 – Esquema geral da metodologia .....</b>                                                                                                    | <b>24</b> |
| <b>Figura 3 – Diferenciação de monócitos U937 a macrófagos após diferentes exposições ao PMA .....</b>                                                  | <b>28</b> |
| <b>Figura 4 – Expressão gênica em células U937 controle e tratadas com PMA .....</b>                                                                    | <b>29</b> |
| <b>Figura 5 – Avaliação morfológica e molecular da indução dos fenótipos do tipo M1 e M2 .....</b>                                                      | <b>30</b> |
| <b>Figura 6 – Avaliação morfológica e de expressão gênica de macrófagos expostos ao meio condicionado de MDA-MB-231 com e sem depleção de p53 .....</b> | <b>32</b> |
| <b>Figura 7 – Validação do silenciamento de p53 e análise da expressão gênica e da secreção de IL-8 no secretoma de células MDA-MB-231 .....</b>        | <b>33</b> |

## **LISTA DE TABELAS**

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1 – Primers utilizados para RT-qPCR.....</b> | <b>26</b> |
|--------------------------------------------------------|-----------|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|         |                                                         |
|---------|---------------------------------------------------------|
| ATCC    | <i>American Type Culture Collection</i>                 |
| ATB     | Antibiótico                                             |
| BRCA1/2 | <i>Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein 1/2</i>  |
| CSF-1   | <i>Colony Stimulating Factor 1</i>                      |
| CTL     | Controle                                                |
| CXCL2   | <i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i>                     |
| DMEM    | <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>               |
| ELISA   | <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>               |
| ER      | <i>Estrogen Receptor</i>                                |
| GOF     | <i>Gain-of-function</i>                                 |
| HER2    | <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>         |
| IARC    | <i>International Agency for Research on Cancer</i>      |
| IFNs    | <i>Interferons</i>                                      |
| IL      | Interleucina                                            |
| INCA    | Instituto Nacional do Câncer                            |
| LPS     | Lipopolissacarídeo                                      |
| MC      | Meio Condicionado                                       |
| MDM2    | <i>Murine Double Minute</i>                             |
| MMS     | <i>Methyl Methanesulfonate</i>                          |
| NIH     | <i>Nacional Institutes of Health</i>                    |
| NK      | <i>Natural Killers</i>                                  |
| PD-L1   | <i>Programmed cell Death Ligand 1</i>                   |
| PR      | <i>Progesteron Receptor</i>                             |
| RPMI    | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>                  |
| RT-qPCR | <i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i> |
| SCR     | <i>Scramble</i>                                         |
| siRNA   | <i>small-interfering RNA</i>                            |

|               |                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------|
| SCR           | <i>Scramble</i>                                      |
| SFB           | Soro fetal bovino                                    |
| TAI           | <i>Tumor-Associated Inflammation</i>                 |
| TAM           | <i>Tumor-Associated Macrophages</i>                  |
| TCGA          | <i>The Cancer Genome Atlas</i>                       |
| TGF- $\beta$  | <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> |
| TME           | <i>Tumor Microenviroment</i>                         |
| TNBC          | <i>Triple Negative Breast Cancer</i>                 |
| TNF- $\alpha$ | <i>Tumour-Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>    |
| VEGF-A        | <i>Vascular endothelial growth factor A</i>          |

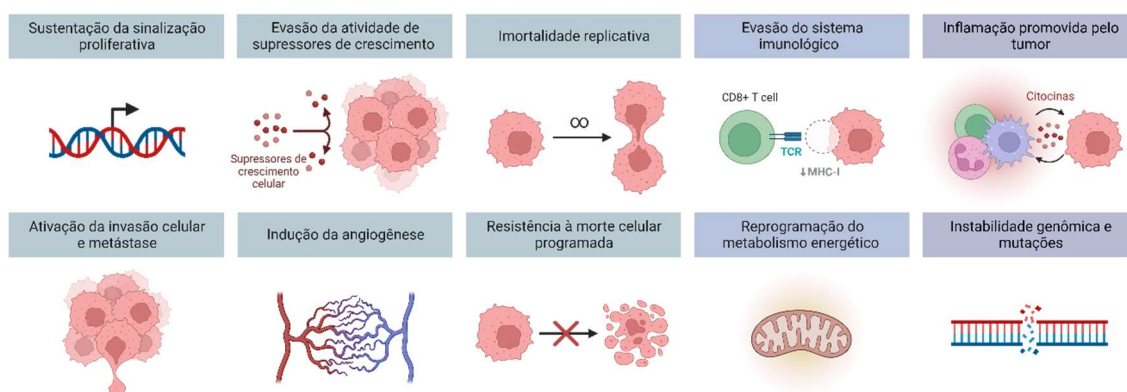
## SUMÁRIO

|           |                                                                                                                               |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>  | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                       | <b>14</b> |
| 1.1       | Câncer.....                                                                                                                   | 14        |
| 1.2       | Inflamação associada a tumor e microambiente tumoral .....                                                                    | 15        |
| 1.3       | Câncer de mama triplo negatvo .....                                                                                           | 17        |
| 1.4       | Mutação em p53 .....                                                                                                          | 18        |
| <b>2</b>  | <b>JUSTIFICATIVA .....</b>                                                                                                    | <b>21</b> |
| <b>3</b>  | <b>HIPÓTESE.....</b>                                                                                                          | <b>22</b> |
| <b>4</b>  | <b>OBJETIVO.....</b>                                                                                                          | <b>22</b> |
| 4.1       | Objetivo geral .....                                                                                                          | 22        |
| 4.2       | Objetivos específicos .....                                                                                                   | 22        |
| <b>5</b>  | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                                                              | <b>23</b> |
| 5.1       | Cultura celular .....                                                                                                         | 23        |
| 5.2       | Preparo do meio condicionado (MC) .....                                                                                       | 24        |
| 5.3       | Diferenciação de monócitos e produção de TAMs .....                                                                           | 24        |
| 5.4       | Silenciamento com siRNA .....                                                                                                 | 24        |
| 5.5       | Ensaio de sulforrodamina B (SRB) .....                                                                                        | 25        |
| 5.6       | Western Blot .....                                                                                                            | 25        |
| 5.7       | RT-qPCR .....                                                                                                                 | 25        |
| 5.8       | ELISA .....                                                                                                                   | 27        |
| 5.9       | Análise estatística .....                                                                                                     | 27        |
| <b>6</b>  | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                                                       | <b>28</b> |
| 6.1       | Validação de metodologia para diferenciação de monócitos a macrófagos .....                                                   | 28        |
| 6.2       | Validação de indução de fenótipo M1 e M2 em macrófagos M0.....                                                                | 30        |
| 6.3       | Avaliação de expressão gênica em macrófagos após exposição ao meio condicionado de MDA-MB-231 com e sem depleção de p53 ..... | 31        |
| 6.4       | Avaliação de expressão gênica e da presença de IL-8 no secretoma de MDA-MB-231 antes e após depleção de p53 .....             | 32        |
| <b>7</b>  | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                        | <b>33</b> |
| <b>8</b>  | <b>LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....</b>                                                                                              | <b>38</b> |
| <b>9</b>  | <b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>                                                                                             | <b>38</b> |
| <b>10</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                         | <b>39</b> |
| <b>11</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS .....</b>                                                                                        | <b>40</b> |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), uma em cinco pessoas no mundo terão câncer durante sua vida e, por ser a segunda principal causa de morte globalmente, tem sido foco de pesquisa de longa data (Yin *et al.*, 2021). O câncer é uma doença heterogênea e complexa que tem em comum o crescimento desordenado de células, podendo iniciar em diferentes partes do corpo humano e invadir tecidos adjacentes ou órgãos a distância, processo nomeado de metástase (NIH, 2021; INCA, 2022). A fim de fornecer um conjunto comum de parâmetros celulares dos mais diversos tumores, Weinberg e Hanahan propuseram um grupo de capacidades funcionais adquiridas pelas células humanas à medida que avançam de um estado normal para estados de crescimento neoplásico, as quais são cruciais para sua habilidade de formar tumores malignos, conhecidos como “*Hallmarks do Câncer*” (Hanahan, 2022). Essas capacidades, ilustradas na Figura 1, envolvem modificações que promovem a proliferação celular, que alteram a interação das células tumorais com outras células e secreções presentes no microambiente tumoral e que favorecem a progressão do câncer para outros órgãos. Esses parâmetros são subdivididos em capacidades funcionais adquiridas pelo câncer e em características “promotoras”, que são anormalidades no estado neoplásico, as quais contribuem para a aquisição dessas alterações funcionais. Dentre este último conjunto de características, estão a instabilidade genômica e mutações, a inflamação promovida pelo tumor, e a capacidade de evasão imunológica (Hanahan; Monje, 2023).



**Figura 1. Hallmarks do câncer.** Ilustração: Raquel Nascimento das Neves criada na plataforma BioRender, 2023. Adaptado de Hanahan, 2022.

## 1.2 Inflamação associada ao tumor e microambiente tumoral

A presença de leucócitos em tumores, observada no século 19 por Rudolf Virchow, proveu o primeiro indício de uma correlação entre inflamação e câncer (Grivennikov; Greten; Karin, 2010). Hoje conhecemos essa característica como Inflamação Associada a Tumor (TAI, do inglês: *Tumor-Associated Inflammation*), sendo uma importante característica na constituição do microambiente tumoral (TME, do inglês: *Tumor Microenvironment*), termo que envolve a totalidade do câncer com as diferentes células imunes, células endoteliais, fibroblastos associados ao câncer, pericitos, e outros tipos celulares que variam dentro os tecidos (Grivennikov, 2010; Visser; Joyce, 2023). O TME é formado não apenas por células tumorais e estromais, mas possui uma constituição complexa, mediada por moléculas secretadas pelos diferentes tipos celulares do microambiente, como citocinas e quimiocinas, sendo determinante na sobrevivência e progressão tumoral (Hinshaw; Shevde, 2019).

A TAI é caracterizada por uma interação alterada entre as células do sistema imunológico adaptativo e inato, sendo comparada, por alguns autores, a uma “ferida que não se resolve” e que, sob influência de estímulos inflamatórios prolongados, torna-se crônica e danosa (Dvorak, 2015; Visser; Joyce, 2023). O grau de inflamação de um tumor pode ser representado pelo conteúdo de células imunes presentes tanto no parênquima, quanto na margem invasiva do tumor (Chen; Mellman, 2017). Dependendo do grau de inflamação, um tumor pode ser classificado como inflamado, também referido como “hot tumor”, ou não inflamado, conhecido como “cold tumor”. O tumor inflamado estabelece um ambiente favorável à ativação e expansão de linfócitos T citotóxicos, em que se tem acúmulo de citocinas pró-inflamatórias como IFNs (interferons), IL-12 (Interleucina 12), IL-23, IL-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ , do inglês: *Tumour-Necrosis Factor -  $\alpha$* ) e granzimas. Por outro lado, o TME do tumor não inflamado apresenta citocinas associadas com imunossupressão, como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ , do inglês: *Transforming Growth Factor  $\beta$* ) e IL-10, e maior quantidade de células T regulatórias (Treg), estas últimas tipicamente exercendo um papel pró-tumoral suprimindo células efectoras antitumorais (Chen; Mellman, 2017).

Dentre os elementos determinantes no contexto de inflamação no microambiente tumoral, tem-se os macrófagos associados a tumor (TAMs, do inglês: *Tumor-Associated-Macrophages*). Os macrófagos derivados de monócitos são ativados e mobilizados para o

microambiente tumoral por mediadores incluindo fator estimulador de colônia 1 (CSF-1, do inglês: *Colony Stimulating Factor 1*), ligante de quimiocina 2/MCP-1 (CCL2), do inglês: *C-C Motif Chemokine Ligand 2*), fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A, do inglês: *Vascular endothelial growth factor A*) e TNF- $\alpha$  (Visser; Joyce, 2023). Os TAM podem às vezes representar 30-50% da fração celular no microambiente tumoral, e sua presença está geralmente associada a um pior prognóstico e pior resposta terapêutica (Zou *et al.*, 2023). Os TAMs são importantes em diversos processos tumorigênicos, regulando diretamente o destino e comportamento de células tumorais por meio de sua proliferação, sobrevivência e capacidade invasiva, podendo criar um microambiente tumoral imunossupressivo, ativando angiogênese e remodelando a matriz extracelular (Visser; Joyce, 2023).

Os macrófagos podem se diferenciar nos fenótipos M1 e M2. O subtipo M1 é mais relacionado a processos inflamatórios, ativados por IFN $\gamma$  e produtos microbianos, os quais produzem citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23, CXCL10. A polarização M2 é induzida por proteínas com ação anti-inflamatória, como IL-4, IL-10 e IL-13, estando mais presente em tumores com perfil não inflamatório e produzindo moléculas como IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF e Arginase (Grivennikov, 2010). Entretanto, a classificação em M1 ou M2 deriva muito de experimentos de polarização *in vitro*, no qual se utiliza estímulos específicos para polarização, tais como IFN $\gamma$  combinado com LPS (lipopolissacarídeo) para fenótipo M1, e IL-4, IL-10 ou IL-13 para M2. (Purcu *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023). Por outro lado, os TAM parecem ser um fenótipo único, e diferente do M1 e M2 clássico obtido em sistemas *in vitro* de cultivo celular. Em sua maioria, os TAMs são relacionados ao fenótipo de macrófago M2, os quais estimulam angiogênese, remodelação tecidual e imunossupressão, culminando no aumento da proliferação, metástase e resistência terapêutica das células cancerosas. Apesar disso, ambos os fenótipos podem ser encontrados no estroma tumoral, o fenótipo tipo-M1 mais próximo dos vasos sanguíneos e parte com maior oxigênio enquanto o tipo-M2 em regiões de hipóxia (Zou *et al.*, 2023). Essas células também possuem a característica de plasticidade, ou seja, o macrófago expressando um fenótipo pode ser modulado e mudar sua polarização conforme as secreções do tumor e inclusive conforme o estágio tumoral. Sendo assim, normalmente em fases iniciais, são encontrados mais macrófagos M1, enquanto em estágio avançados é visto em geral maior polarização para M2 (Boutillier; Elswa, 2021; Zou *et al.*, 2023).

Dentre as influências dos TAMs no microambiente tumoral, está a evasão tumoral do

sistema imunológico, a qual foi estabelecida por experimentos *in vivo* que demonstram maior infiltração de linfócitos T CD8+ quando TAMs são depletados (Zhaoting *et al.*, 2022). Em geral seus mecanismos envolvem expressão de níveis elevados de ligantes de *checkpoints* imunológicos, como PD-L1 (*Programmed cell Death Ligand 1*), presentes na superfície celular, que se ligam a receptores PD-1 de células T efetoras (ex: CD8+), enviando sinais que causam exaustão destes linfócitos antitumorais. Dessa forma, as células tumorais exploram esse mecanismo ao expressar PD-L1, impedindo seu reconhecimento pelas células do sistema imunológico. Ainda, a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, é bem conhecida por suprimir a atividade de células T, células dendríticas e células NK (Do inglês: *Natural Killers*).

Outra via de evasão do sistema imunológico envolve o recrutamento de linfócitos Treg para o TME, os quais também auxiliam na imunossupressão (Xiao; Yu, 2021). Sua importância é tamanha, que estão sendo desenvolvidas terapias auxiliares visando bloquear o recrutamento de macrófagos ou eliminar os TAMs pré-existentes no microambiente tumoral, com intensão de aumentar a eficácia de tratamentos com bloqueadores de checkpoints imunológicos, como o Pembrolizumabe (Zou *et al.*, 2023). Assim, compreender como os TAMs são regulados, como regulam o TME e seu perfil de polarização faz-se importante para entendimento dos mecanismos da doença, desenvolvimento de novas terapias e aprimoramento dos tratamentos em uso, especialmente em cânceres em que sua presença é abundante e em que não se tem grande eficácia terapêutica, como em câncer de mama triplo- negativo (TNBC, do inglês: *Triple Negative Breast Cancer*).

### 1.3 Câncer de mama triplo negativo

O câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres em todo o mundo, com cerca de 2,3 milhões de novos casos estimados em 2020, representando também a principal causa de mortalidade por câncer nesse grupo (IARC, 2020). No Brasil estima-se que ocorrerão aproximadamente 704 mil novos casos de câncer entre 2023 e 2025, sendo que o câncer de mama é o segundo tipo mais comum nessa projeção, totalizando 74 mil casos. Em mulheres, a taxa de incidência desse tipo tumoral é de 20,3% sendo que os óbitos por câncer de mama representam 16,1% do total de óbitos por câncer e ocupam o primeiro lugar no país, (INCA, 2023).

Os cânceres de mama podem ser classificados de diversas formas, sendo a classificação

histológica, por imununo-histoquímica, da expressão de receptores hormonais, como o Receptor de Estrogênio (ER, do inglês: *Estrogen Receptor*), Receptor de Progesterona (PR, do inglês: *Progesteron Receptor*), e Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 + (HER2+, do inglês: *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), combinados com o marcador proliferativo Ki67, o mais utilizado para guiar terapias e prognóstico em cada caso. Assim, os tumores primários da mama podem ser subdivididos em: i) Luminal A (ER+ e/ou PR+, HER2-, ki67<14%); ii) Luminal B (ER+ e/ou PR+, HER2- ou HER2+, ki67 > 14%), iii) HER2 (ER-, PR-, HER2+, ki67-independente); e TNBC (ER-, PR-, HER2-, ki67-independente), este último um subtipo que não expressa nenhum dos receptores. Os tumores TNBC representam 15-20% dos casos de câncer de mama e são considerados o subtipo com pior prognóstico, por ser o mais agressivo e pela falta de alvos terapêuticos efetivos (Hua; White; Zhou, 2022).

Aproximadamente 45% dos pacientes com TNBC desenvolvem metástase (Zhu *et al.*, 2023) e, apesar dos avanços nas terapias, os pacientes com TNBC, principalmente os com doença metastática, possuem baixa taxa de sobrevida e cura (So *et al.*, 2022). Diante da complexidade desses tumores e da ausência de biomarcadores validados, a Ciência busca novas estratégias terapêuticas e identificação de genes que possam desempenhar papéis importantes para o direcionamento terapêutico, no prognóstico da doença e na predição da resposta terapêutica (Neves, 2023).

Dentro disso, diversas vias regulatórias têm sido investigadas e mutações identificadas em TNBC, tais como no supressor tumoral p53, na via da Akt (com as mutações dos genes PIK3CA/PTEN) e na via das proteínas de reparo de DNA BRCA1/2 (do inglês: *Breast Cancer gene 1/2*). Entre essas, destaca-se a mutação de p53, dada a sua frequência em tumores triplo-negativos/basal-like, sugerindo um papel importante dela na patogênese desses cânceres. O Atlas Genômico do Câncer (TCGA, do inglês *The Cancer Genome Atlas*) descreve que cerca de 80% dos casos de TNBCs apresentam mutações no gene supressor de tumor p53 (TP53), ao passo que subtipos menos agressivos como o Luminal A e Luminal B apresentam apenas 12% e 29%, respectivamente, de alterações neste gene (The Cancer Genome Atlas Network, 2012).

#### 1.4 Mutação em p53

A Proteína p53, produto do gene TP53, e denominada assim pelo seu padrão de corrida eletroforética com detecção em aproximadamente 53 kilodaltons (kD), desempenha um papel crucial na regulação do ciclo celular e na supressão do crescimento tumoral (Soussi; May,

1996). É composta por cinco domínios funcionais distintos que desempenham papéis importantes em sua atividade reguladora. Em conjunto, esses domínios, conferem à proteína p53, referida comumente como “guardiã do genoma”, a capacidade de regular a expressão gênica e de manter a integridade genômica (Kastenhuber; Lowe, 2017). Em condições fisiológicas, a proteína p53 é mantida em níveis baixos, sendo degradada por reguladores negativos, incluindo MDM2 (do inglês: *Murine Double Minute*), o qual interage com a p53 e atua como um ligante de ubiquitina E3, marcando a p53 para a degradação pelo proteassoma (Parrales; Iwakuma, 2015). Quando tem-se exposição a estresses genotóxicos, essa proteína sofre modificações pós-traducionais especialmente a fosforilação pelas vias ATM:CHK2 e ATR:CHK1, estabilizando, diminuindo a interação com MDM2 e, assim, bloqueando sua degradação. Isso eleva os níveis de p53 na célula e desencadeia uma série de respostas celulares.

Uma das principais atividades da p53 é promover a parada do ciclo celular nos pontos de verificação das fases G1 e G2 (Kastenhuber; Lowe, 2017). Por atuar primariamente como fator de transcrição, a p53 promove a transcrição de genes envolvidos em processos celulares que suprimem o crescimento tumoral, como a inibidora de ciclinas p21, sendo fundamental para prevenir a progressão do ciclo celular em células com dano em DNA. Isso permite que as células tenham tempo para reparar danos no DNA antes de continuar o processo de divisão celular, evitando a propagação e acumulação de danos e mutações (Liu; Zhang; Feng, 2014). Além disso, se o dano causado ao DNA não for reparado, p53 pode induzir mecanismos de morte celular programada, como senescência ou apoptose, induzindo a transcrição de genes como PUMA, Bax e Noxa. A proteína Bax, em particular, promove a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial, induzindo apoptose pela via mitocondrial. Esse mecanismo faz-se importante uma vez que remove células danificadas ou com potencial de transformação maligna, contribuindo para a supressão tumoral (Aubrey *et al.*, 2018). A p53 também desempenha outras funções antitumorais, incluindo a regulação do metabolismo celular, defesa antioxidante e ativação de microRNAs (miRNAs), auxiliando na integridade genômica e na supressão do crescimento de células tumorais (Pitolli *et al.*, 2019).

Desse modo, a função biológica clássica de p53 suprime a formação tumores (Beckerman; Prives, 2010). Como resultado da mutação, a p53 mutante, além de perder suas funções fisiológicas, não é efetivamente degradada e acumula-se em níveis elevados nas células tumorais, já que sua interação com a proteína MDM2 fica comprometida. Seu acúmulo pode levar a efeitos vantajosos para as células tumorais, como aquisição de funções oncogênicas,

interação com outros fatores de transcrição e modulação de vias de sinalização (Yue *et al.*, 2017). Muitas vezes, as mutações de p53 têm efeitos significativos na conformação e, consequentemente, na função da proteína p53 traduzida, comprometendo por vezes sua capacidade de se ligar ao DNA e regular a transcrição de genes alvo clássicos, levando a uma perda ou alteração na especificidade de ligação da p53 a sequências de DNA (Sabapathy; Lane, 2017). Isso pode acarretar a perda ou redução da atividade supressora de tumor da p53 e contribuir para a progressão tumoral (Stiewe; Haran, 2018).

Além da perda da função do tipo selvagem, as mutações de p53 também podem adquirir funções oncogênicas adicionais, conhecidas como mutações com ganho-de-função (GOF, do inglês: *Gain-of-function*), que promovem a sobrevivência e a progressão das células tumorais, através de respostas celulares que não são associadas às funções normais da p53 do tipo selvagem (Liu; Zhang; Feng, 2014). Os ganhos de função da p53 mutante estão por vezes relacionados à modulação do secretoma celular, uma vez que a proteína mutada tem capacidade de alterar a expressão de genes que a proteína selvagem não regula em condições fisiológicas. Ela pode estimular a transcrição de citocinas, como CXCL5, CXCL8 e CXCL12 (Yeudall *et al.*, 2012) e de outras proteínas, como VEGF (Alvarado-Ortiz *et al.*, 2021), que são importantes em processos envolvidos no câncer, como angiogênese, remodelamento da matriz extra celular e sobrevivência tumoral (Visser; Joyce, 2023).

Assim, as características oncogênicas da proteína p53 mutante podem afetar diversos processos biológicos associados à progressão do câncer, uma vez que têm capacidade de promover a invasão e a metástase tumoral por meio da ativação de vias de sinalização envolvidas no remodelamento da matriz extracelular e na migração celular. Além disso, a proteína p53 mutante pode induzir alterações no metabolismo celular, favorecendo a reprogramação metabólica que fornece aos tumores energia e biomassa necessárias para seu crescimento descontrolado. A proteína p53 mutante também pode interagir com o sistema imunológico de maneiras complexas, inibindo a apresentação de antígenos e promovendo a tolerância imunológica. Essas interações com o sistema imunológico podem contribuir para a evasão tumoral (Alvarado-Ortiz *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que os mecanismos e efeitos do GOF do p53 mutante são complexos e variados, e podem depender do tipo específico de mutação presente. Sabe-se que cerca de 80% das mutações no gene TP53 são do tipo missense, ocorrendo geralmente nos exons 5-8 do gene, os quais codificam o domínio de ligação ao DNA da proteína. As mutações

mais comuns envolvem as posições R175, G245, R248, R249, R273 e R282 e resultam em uma troca de aminoácidos, podendo levar a um ganho de função da proteína durante a tumorigênese, como acontece nas mutações R175H e R273H, as quais são capazes de promover invasão e migração da célula tumoral (Rivlin *et al.*, 2011). As mutações missense são divididas geralmente em duas categorias. Uma envolve mutações que ocorrem em aminoácidos em contato com o DNA, como as mutações R273H e R248Q, as quais resultam na instabilidade da proteína p53 na ligação do DNA. Em específico, a mutação em R280K presente na célula MDA-MB-231 utilizada no estudo também prejudica a ligação ao DNA, fazendo com que a proteína se ligue inespecificamente a regiões que a proteína *wild-type* não interfere normalmente (Yeudall *et al.*, 2012; Vrba *et al.*, 2008). A outra categoria é de mutações conformacionais, as quais ocorrem em aminoácidos importantes na manutenção da estrutura proteica, como as mutações R175H, Y220C, R249S, levando a uma proteína mal enovelada.

Apesar dessas classificações, nem todas as mutações tem efeitos equivalentes, ou seja, trocas de diferentes aminoácidos no mesmo resíduo também podem possuir consequências distintas. Um exemplo disso são as mutações na posição R175, em que a mutação R175C promove apoptose e parada do ciclo celular, enquanto a R175P induz somente a parada do ciclo celular e a mutação R175D faz com que a proteína perca ambas as funções. Dessa forma, embora esses processos sejam centrais para o câncer, os mecanismos moleculares envolvidos e os alvos precisos das mutações em p53 com GOF só recentemente estão sendo elucidados (Chen, Zhang, Su *et al.*, 2022).

## 2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novas terapias para TNBC é essencial, uma vez que este representa cerca de 20% dos casos totais dos cânceres de mama, sendo o subtipo mais agressivo e que ainda depende muito da quimioterapia citotóxica, que em muitos casos não tem efeito curativo (Hua; White; Zhou, 2022). Nele estão presentes diversas mutações relevantes, destacando-se a da proteína p53, que é detectada em cerca de 80% dos tumores (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Em condições normais a p53 age como supressora tumoral, porém sua mutação influencia na sua perda de funcionalidade, além de poder culminar em mutações GOF, estas últimas relacionadas a atividades oncogênicas (Liu; Zhang; Feng, 2014). Nosso grupo observou que quando a p53 mutante é depletada, as linhagens celulares de TNBC ficam mais suscetíveis aos tratamentos com MMS (Methyl Methanesulfonate) e cisplatina, têm diminuição no potencial de invasão e migração, além de que as citocinas pró-inflamatórias no

secretoma tumoral, como IL-8, IL-6 e CXCL2 têm sua expressão reduzida (Yeudall *et al.*, 2012; Neves, 2023). Nesse contexto, a p53 se mostrou capaz de modular o microambiente tumoral do TNBC, que por sua vez é complexo e heterogêneo e chama atenção por ser distinto dos outros subtipos de câncer de mama, apresentando altos níveis de infiltração de linfócitos e de TAMs (So *et al.*, 2022). Assim, uma regulação autônoma da resposta imunológica pela célula tumoral, através de um gene tipicamente mutado em TNBC, pode ser um componente importante que explica a malignidade desse subtipo tumoral.

### **3. HIPÓTESE**

A proteína p53<sup>R280K</sup> é capaz de modular o fenótipo de macrófagos em tumores TNBC, uma vez que o recrutamento e ativação de macrófagos estão associados ao TME e à expressão de moléculas pró e anti-inflamatórias.

### **4. OBJETIVO**

#### **4.1 Geral**

Avaliar o papel da mutação com GOF da proteína p53<sup>R280K</sup> expressa na linhagem celular de câncer de TNBC MDA-MB-231 sobre a polarização M1/M2 de macrófagos derivados da linhagem U937.

#### **4.2 Específicos**

- i. Estabelecer o protocolo para diferenciação de monócitos a macrófagos utilizando o PMA e a indução dos fenótipos M1 e M2 após exposição à IFN-  $\gamma$ /LPS e IL-4, respectivamente;
- ii. Compreender o efeito do secretoma (meio condicionado) da linhagem celular MDA- MB- 231 com e sem depleção de p53 mutante sobre monócitos U937 diferenciados em macrófagos, através da análise de expressão de genes inflamatórios;
- iii. Avaliar a expressão de genes envolvidos na modulação inflamatória em células MDA-MB- 231 antes e após silenciamento de p53.
- iv. Avaliar o conteúdo proteico de IL-8 no secretoma de células MDA-MB-231 em condição basal e após silenciamento de p53;

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Cultura celular

A linhagem celular de câncer de mama MDA-MB231 com mutação em TP53 (R280K) proveniente do ATCC (*American Type Culture Collection*) foi mantida em meio DMEM *High Glucose* (*Dulbecco's modified eagle's medium*) (Sigma-Aldrich; cat #D5796) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cripion Biotecnologia, Brasil) e 1% antibiótico:antimicótico (1:1) (ATB) (*Sigma- Aldrich*) em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37° C. Para a linhagem celular monocítica U937, proveniente do ATCC, foi utilizado o meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Sigma-Aldrich; cat #R6504), nas mesmas condições de antibiótico, soro e crescimento que a linhagem celular citada anteriormente.

### 5.2 Preparo do meio condicionado (MC)

A linhagem celular de TNBC, MDA-MB-231 foi plaqueada em placa de 24 poços e cultivada por 24 h. Depois as células foram transfectadas com siRNA scramble ou com alvo em p53 por 24 h e tiveram o sobrenadante substituído por DMEM fresco por mais 24 h. No dia seguinte, o meio foi transferido para microtubos estéreis, e, para remoção de células mortas, foi centrifugado ( $400 \times g$  por 5 min). Em seguida, o MC foi incubado no cultivo de linhagens celulares de U937 (já inicialmente diferenciadas com PMA) em proporções com RPMI fresco (1:1 RPMI fresco/MC), a fim de reduzir a perda de atividade associada ao congelamento (Pe *et al.*, 2022; Zanotto-Filho, 2018).

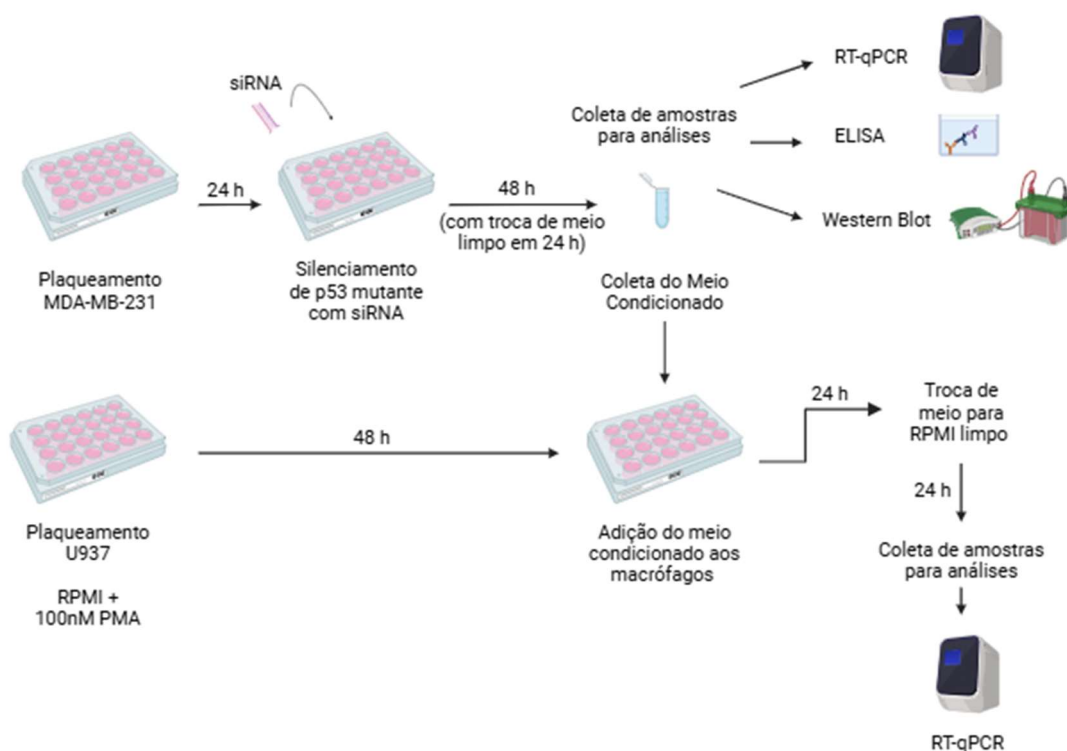
### 5.3 Diferenciação de monócitos e produção de TAMs

Para determinação do protocolo usado na diferenciação dos monócitos em macrófagos M0 (priming), a célula U937 foi estimulada com 10 nM, 50 nM e 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich) no meio RPMI por 24 ou 48 h. Após comparação dos resultados o protocolo com 100 nM por 48 h foi estabelecido como modelo para os seguintes experimentos. Para controle comparativo de polarização, macrófagos com fenótipo M1 foram induzidos com a adição de IFN $\gamma$  e LPS, em RPMI por 24 h, na concentração final, respectivamente, de 20 ng/mL e 100 ng/mL enquanto M2 foram induzidos com a adição de IL-4 nas mesmas condições, na concentração final de 20 ng/mL. A fim de produzir os TAMs, macrófagos derivados de U937 foram tratados com meio condicionado (MC) por 24 h. Este foi

então retirado e substituído por RPMI completo por mais 24 h e, ao final, as células U937 diferenciadas/polarizadas foram coletadas (Purcu *et al.*, 2022; Pe *et al.*, 2022).

#### 5.4 Depleção de p53 mutante por siRNA

O silenciamento foi utilizado para depletar a proteína p53 mutante de células MDA-MB-231. Transfecções com siRNA foram realizadas usando Lipofectamine RNAi MAX Reagent, seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen). O siRNA com alvo em p53 humano (#NC1648672) e o scrambled siRNA (#AM4611) foram adquiridos da Dharmacon e Ambion, respectivamente. As células foram plaqueadas um dia antes e transfectadas com 50 nM siRNA (método forward) por 24 h. A eficiência da depleção da proteína alvo foi confirmada por Western Blot.



**Figura 2 – Esquema geral de metodologia.** No primeiro dia, as células MDA-MB-23 foram plaqueadas utilizando meio DMEM High Glucose 10% SFB e antibióticos (ATB). No dia seguinte foi realizado o silenciamento de p53 mutante por transfecção de siRNA, utilizando-se de meio DMEM High Glucose com 10% SFB e sem ATB. Após 24h do silenciamento, DMEM fresco com SFB e ATB foi adicionado e após um dia as células foram coletadas para Western Blot e RT-qPCR. Além disso, o sobrenadante foi coletado para realização de ELISA de IL-8, e para utilizármos como meio condicionado. O meio condicionado de MDA-MB-231 foi misturado em proporção 1:1 (v/v) com RPMI fresco antes da incubação as células U937. Já as células monocíticas U937 foram plaqueadas em meio RPMI 10% SFB e ATB com PMA (100 nM) para sua diferenciação em macrófagos M0. Após 48 h, o meio foi substituído pelo meio condicionado, por 24 h. O meio condicionado foi trocado por RPMI fresco por mais 24 h e então o meio e as células foram coletados para análises de RT-qPCR. (Ilustração: autoria própria criada na plataforma BioRender (<https://BioRender.com>), 2024).

### 5.5 Ensaio de sulforrodamina B (SRB)

O ensaio de SRB foi utilizado para verificar a influência do silenciamento de p53 mutante na proliferação celular de células MDA-MB-231. Para tal, utilizamos placa de 96 poços, com densidade celular de  $1 \times 10^4$  células/poço, em que as células foram transfectadas com siRNA com alvo em p53 (#NC1648672) ou com siRNA Scrambled (#AM4611), como controle experimental. Após 24 h o meio com depleção de ATB foi trocado por DMEM 10% SFB, 1% ATB e as células foram cultivadas em estufa por 72 h. Depois o meio foi removido e as células foram fixadas com ácido tricloroacético 10% à 4°C por 1 hora. Após fixação, o corante SRB foi adicionado e as células foram incubadas por 30 minutos em ausência de luz. As células foram então lavadas com ácido acético 1%, até a eliminação de todo o corante residual da placa, e secas à temperatura ambiente (overnight). O SRB foi dissolvido em tampão Tris-HCl, e a absorbância em 510 nm foi medida usando Multireader Infinite M200 Tecan. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de proliferação celular comparativamente às células transfectadas com siRNA controle.

### 5.6 Western Blot

O Western Blot foi utilizado para confirmação do silenciamento de p53 em MDA-MB-231. Os lisados de proteínas foram preparados utilizando o tampão de amostra Laemli 2x (TRIS 1,5M pH 6,8, SDS, glicerol e azul de bromofenol), com adição de 10% de 2- mercaptoetanol ao tampão antes de ser misturado com as amostras. As proteínas foram fervidas por 10 minutos a 100°C para desnaturação, separadas por SDS-PAGE de 10% (Mini-Protean, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e transferidas eletricamente para membranas de nitrocelulose utilizando um sistema semiseco (Hoefer TE77, Amersham, Holliston, MA, EUA). As membranas foram coradas com Ponceau S para controle de carga, enxaguadas com água e depois TBS-T, e bloqueadas com leite desnatado em pó a 5% em TBS-T (solução salina tamponada com Tris, 0,1% Tween-20) por 1 hora à temperatura ambiente. Os anticorpos primários que foram utilizados incluem p53 (#9282) e  $\beta$ -Actina (D6A8) (#8457) (Cell Signaling Technology) em diluição de 1:1000 (incubados durante a noite a 4°C com agitação). Os seguintes anticorpos secundários conjugados à HRP foram usados: anti-IgG de coelho (#616520) (Thermo Fischer Scientific) e anti-IgG de camundongo (#70740) (Cell Signaling Technology), em diluição de 1:3000 em TBS-T com 5% de BSA. Eles foram incubados por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação orbital. As bandas de proteína foram capturadas utilizando substrato quimioluminescente LumiGlo (Cell Signaling Technology #7003S) em sistema ChemiDoc MP

(Bio-Rad). O software ImageJ foi utilizado para quantificar as bandas de proteína.

### 5.7 RT-qPCR

O RT-qPCR foi utilizado para avaliar o efeito do silenciamento de p53 na expressão de citocinas e da proteína PD-L1 em MDA-MB-231. Também foi utilizado para avaliar a expressão gênica em macrófagos expostos aos meios condicionados (MC). O RNA total das células foi extraído usando TRIzol (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante e a extração foi confirmada através de gel de agarose e quantificação em Nanodrop. A partir do RNA total foi realizada a síntese de DNA complementar de primeira fita (cDNA) usando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFischer) em termociclador SimpliAmp (ThermoFischer) e 1000ng de RNA. As reações de amplificação e quantificação foram realizadas com a plataforma PCR em Tempo Real HT 7900 (ThermoFischer). Cada reação consistiu em 5 µl de PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFischer), 100 nM de primers forward e reverse (descritos na Tabela 1), água livre de nuclease e 1 µL (1000 ng) de cDNA. As condições de ciclagem foram as seguintes: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min, com um ciclo para verificação da temperatura de melting ao final. Os níveis relativos de transcrição dos genes alvo foram calculados usando como referência o gene constitutivo GAPDH e o método  $\Delta\Delta CT$ . Nas linhagens de câncer foram analisados os genes IL6, IL8, CXCL3, CXCL2 e PD-L1. Para a expressão em macrófagos U937, foram analisados os genes CXCL10, IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$ , representativos do fenótipo de macrófagos M1, e TGF- $\beta$ 1, CCL22 e IL10, representativos do fenótipo de macrófagos M2 (Lima, 2022; Pe et al., 2022;).

**Tabela 1 – Primers utilizados para RT-qPCR**

| Alvo  | Primer Forward (5'-3')      | Primer Reverse (5'-3')     | Maior Ct U937 CTL PMA | Maior Ct MDA-MB-231 SCR | Função                        |
|-------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------|
| GAPDH | GTCTCCTCTGACT<br>TCAACAGCG  | ACCACCCTGTTGC<br>TGTAGCCAA | 23,59                 | 18,84                   | Gene normalizador             |
| IL6   | AGACAGCCACTC<br>ACCTCTTCAG  | TTCTGCCAGTGCC<br>TCTTTGCTG | -                     | 29,36                   | Interleucina pró-inflamatória |
| IL8   | GAGAGTGATTGA<br>GAGTGGACCAC | CACAACCCTCTGC<br>ACCCAGTTT | -                     | 25,92                   | Interleucina pró-inflamatória |

|                |                             |                               |       |       |                                                      |
|----------------|-----------------------------|-------------------------------|-------|-------|------------------------------------------------------|
| CXCL3          | TCCGTGGTCACTG<br>AACTGCG    | AGTTGGTGCTCCC<br>CTTGTTC      | -     | 30,40 | Citocina pró-<br>inflamatória                        |
| CXCL2          | GGCAGAAAGCTT<br>GTCTCAACCC  | CTCCTTCAGGAAC<br>AGCCACCAA    | -     | 28,89 | Citocina pró-<br>inflamatória                        |
| PD-L1          | TGCCGACTACAA<br>GCGAATTACTG | CTGCTTGTCAG<br>TGACTTCGG      | -     | 26,25 | Proteína<br>reguladora de<br>resposta<br>imunológica |
| CXCL10         | GAAAGCAGTTAG<br>CAAGGAAAGGT | GACATATACTCCA<br>TGTAGGGAAGTG | 36,71 | -     | Marcador de<br>macrófago tipo-<br>M1                 |
| IL-1 $\beta$   | CCACAGACCTTCC<br>AGGAGAATG  | GTGCAGTTCAGTG<br>ATCGTACAGG   | 23,03 | -     | Marcador de<br>macrófago tipo-<br>M1                 |
| TNF- $\alpha$  | CTCTTCTGCCTGC<br>TGCACTTTG  | ATGGGCTACAGG<br>CTTGTCACCTC   | 32,66 | -     | Marcador de<br>macrófago tipo-<br>M1                 |
| TGF- $\beta$ 1 | TACCTGAACCCGT<br>GTTGCTCTC  | GTTGCTGAGGTAT<br>CGCCAGGAA    | 25,67 | -     | Marcador de<br>macrófago tipo-<br>M2                 |
| CCL22          | TCCTTGCTGTGGC<br>GCTTCAA    | CTCGGGCAGGAG<br>TCTGAGGT      | 34,14 | -     | Marcador de<br>macrófago tipo-<br>M2                 |
| IL10           | TGCCTTCAGCAGA<br>GTGAAGA    | GCAACCCAGGTA<br>ACCCTTAAA     | 37,74 | -     | Marcador de<br>macrófago tipo-<br>M2                 |

## 5.8 ELISA

A técnica de ELISA foi utilizada para detectar IL-8 nos meios de células tumorais MDA-MB-231. Para isso, utilizou-se o kit comercial Human IL-8 ELISA kit (Invitrogen, #KHC0081) de acordo com as instruções do fabricante. Na etapa de calibração da diluição mais adequada para o analito, de modo que as absorvâncias ficassem na faixa da curva padrão de IL8, os meios de cultura foram diluídos 2x, 20x, 100x e 200x, e a diluição escolhida para os demais experimentos foi de 20x.

## 5.9 Análise estatística

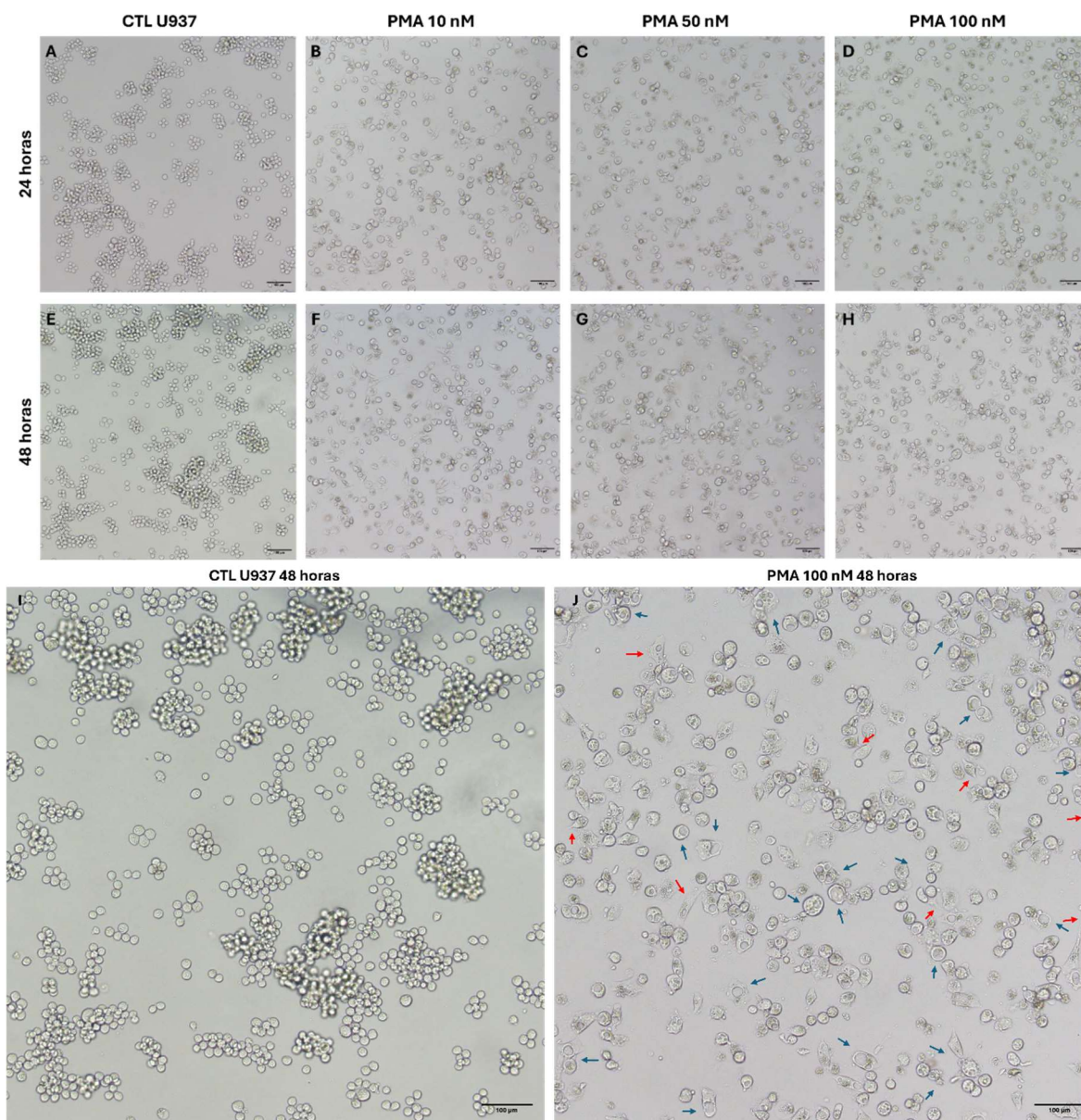
A análise estatística das Figura 4 e 7 foi feita por Teste T de Student, e para os demais experimentos de RT-qPCR, a análise estatística ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey foi utilizada. Na Figura 5 foram comparados os grupos PMA CTL, M1 e M2 e na Figura

6 os grupos PMA CTL, MC SCR siRNA e MC p53 siRNA. Os valores de p dos gráficos foram sinalizados da seguinte forma: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,00001$ .

## 6. RESULTADOS

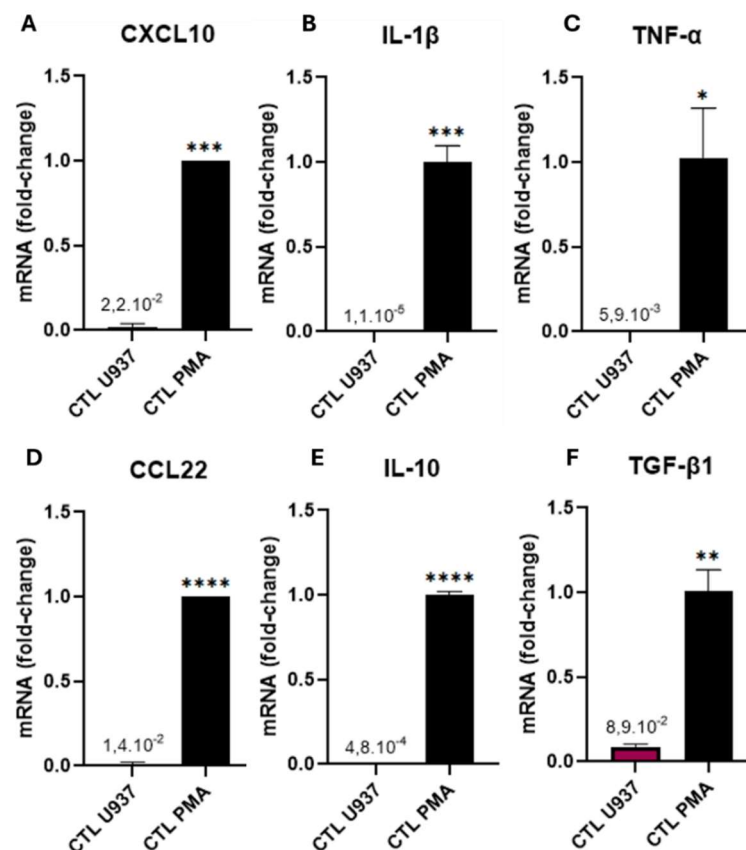
### 6.1 Validação da metodologia para diferenciação de monócitos U937 a macrófagos.

A fim de estabelecer o protocolo para diferenciação de monócitos a macrófagos, diferentes concentrações e períodos de exposição ao PMA foram testados utilizando a linhagem celular U937. Nesse contexto, foram testados os períodos de 24 h de exposição ao composto, com 24 h adicionais em meio RPMI novo, ou 48 h de PMA sem troca de meio de cultivo. Além disso, diferentes concentrações do PMA foram testadas, sendo essas 10 nM, 50 nM e 100 nM.



**Figura 3 - Diferenciação de monócitos U937 a macrófagos após diferentes exposições ao PMA.** As células U937 foram semeadas em uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/mL, exceto no controle ( $1 \times 10^5$  células/mL). Simultaneamente à semeadura, o PMA foi adicionado em diferentes concentrações, e as placas foram mantidas protegidas da luz. As imagens I e J são ampliações das imagens E e H, respectivamente. As setas em vermelho indicam a formação de pseudópodos e as em azuis a vacuolização. As imagens foram capturadas com microscópio invertido IX83, utilizando aumento de 10x. Tamanho da barra de escala: 100  $\mu$ m.

A análise morfológica das células, feita a partir das imagens microscópicas usou como critério a quantidade de células aderidas e as características celulares. As células U937 controle (U937 CTL) apresentam características monocíticas, ou seja, são não aderentes, pequenas e com morfologia arredondada (Figura 3A, ampliada em 3I). Já quando diferenciados a macrófagos, a proliferação celular diminui e as células passam a aderir na superfície de cultivo, apresentam vacuolização, formação de pseudópodes e aumento de volume celular (Figura 3J, setas em azul indicando vacuolizações e setas em vermelho os pseudópodes) em relação às células não diferenciadas. Após essa análise qualitativa, foi visto que a exposição por 48 h à concentração de 100 nM foi a mais eficaz para induzir a diferenciação, conforme demonstrado na Figura 3 H e J. Assim, este protocolo foi utilizado para os experimentos subsequentes.

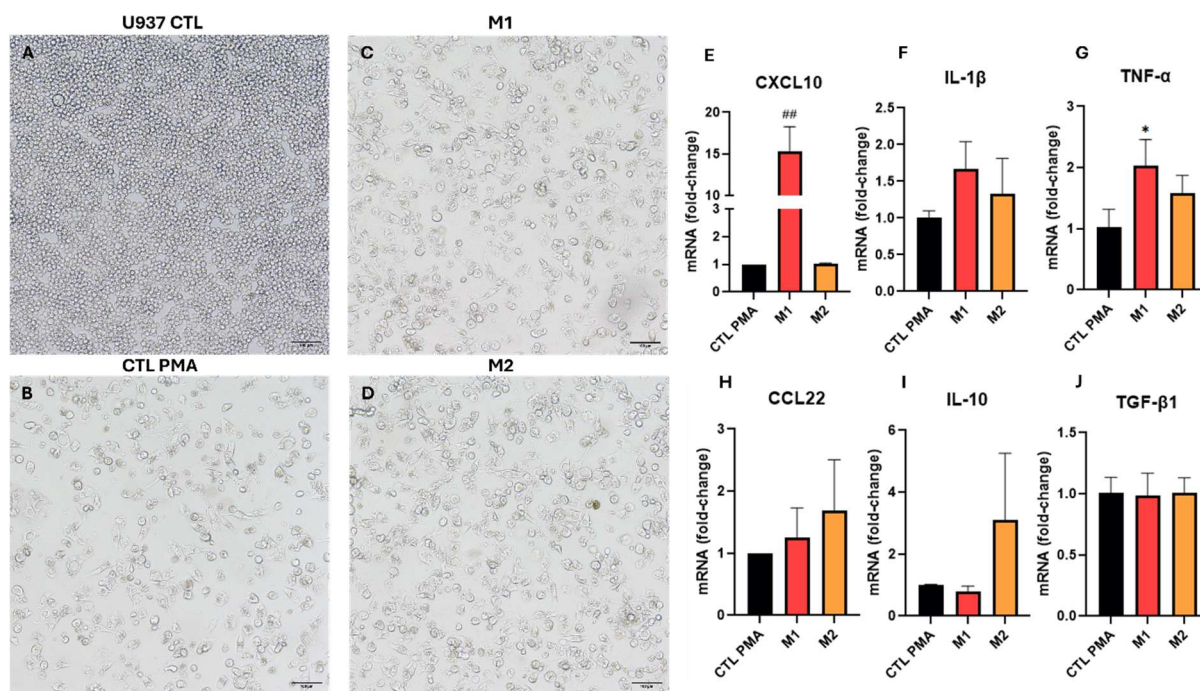


**Figura 4 – Expressão gênica em células U937 controle e tratadas com PMA.** As análises de expressão foram realizadas considerando mRNA (fold-changes):  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  em que  $\Delta Ct = Ct \text{ gene testado} - Ct \text{ GAPDH}$ ;  $\Delta\Delta Ct = dCt(\text{amostra}) - dCt(\text{U937 controle PMA})$ . A análise estatística foi feita por Teste T de Student de via única. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,00001$ . n=1 (CTL U937 IL-10), n=2 (CTL U937 dos demais grupos, CTL PMA de CXCL10 e CCL22), n=3 (CTL PMA IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$ 1).

A diferenciação celular também foi analisada por avaliações moleculares, utilizando RT-qPCR a fim de comparar a expressão gênica das células U937 antes e após o tratamento com PMA. Os genes analisados incluíram CXCL10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL22, IL-10, e TGF- $\beta$ 1, utilizando o gene constitutivo GAPDH como normalizador. Observou-se que as células tratadas com PMA apresentaram um aumento significativo na expressão de todos os genes analisados, em comparação com as células não tratadas, como ilustrado na Figura 4.

## 6.2 Validação da indução dos fenótipos M1 e M2 em macrófagos M0

Em seguida, as células U937 diferenciadas a macrófagos foram submetidas a tratamentos de polarização para avaliação do comportamento morfológico das células U937. Após 48 h de diferenciação com PMA, as células foram expostas a IFN- $\gamma$  e LPS para induzir o fenótipo M1, e IL-4 para induzir o fenótipo M2. Observou-se que o grupo U937 controle apresentou alta proliferação atingindo confluência quase 100% no tempo final (Figura 5A). Já nos demais grupos, foi possível identificar células diferenciadas, com as características de macrófagos, em todos os poços de tratamento (Figura 5B-D). Apesar disso, observamos que durante as trocas de meios, muitas células foram perdendo a adesão, sendo a pipetagem feita de modo muito cuidadoso para não soltar a camada celular.



**Figura 5 -Avaliação morfológica e molecular da indução dos fenótipos do tipo M1 e M2.** As células U937 controle foram semeadas em (A) e também diferenciadas com PMA 100 nM (B). Após 48 h foi realizado o protocolo de polarização dos macrófagos a M1 (LPS 100 ng/mL + IFN- $\gamma$  20 ng/mL) (C) e M2 (IL-4 20 ng/mL) em (D). As imagens foram adquiridas em microscópio invertido IX83, com aumento de 10x; tamanho da barra de escala: 100  $\mu$ m. Análises de RT-qPCR (E-J) dos macrófagos U937 para os genes: CXCL10 (E) IL-1- $\beta$  (F),

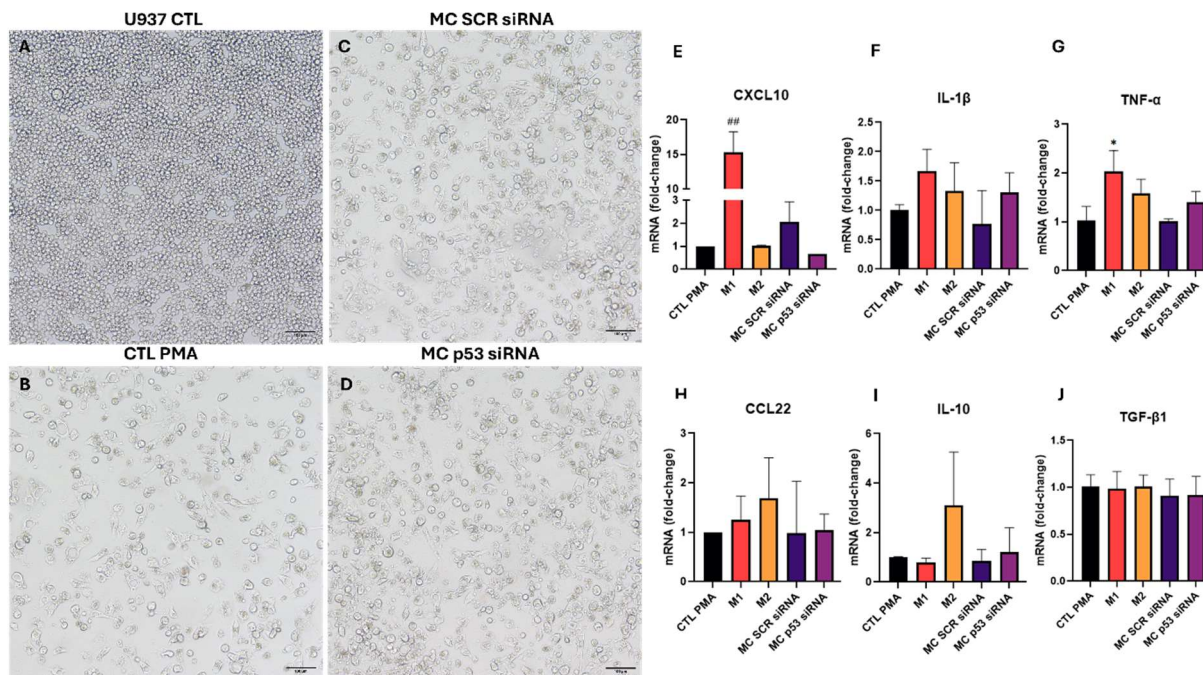
TNF- $\alpha$  (G), CCL22 (H), IL-10 (I), TGF- $\beta$  (J). Análise estatística ANOVA seguida de pós-teste de Tukey, \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . \* em relação ao CTL PMA e # em relação aos dois grupos. n=2 (CTL PMA de CXCL10 e CCL22; M2 CXCL10), n=3 (CTL PMA IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$ 1, M1 e M2 CCL22), n=4 (M1 CXCL10, M1 e M2 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$ 1).

Após serem submetidos aos tratamentos de indução de fenótipo, os macrófagos foram coletados para avaliação de expressão gênica por RT-qPCR de genes característicos de cada fenótipo, a fim de validar a indução de M1 e M2 (Figura 5E-J). Os transcritos de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e CXCL10 foram analisados para o fenótipo tipo M1 enquanto IL-10, TGF- $\beta$ 1 e CCL22 foram utilizados para caracterizar M2. Assim, nossos resultados, representados na Figura 5E a 5G, mostram que os indutores de polarização M1 aumentaram a expressão de TNF- $\alpha$  e CXCL10, os quais apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle/PMA. A IL-1 $\beta$ , por sua vez, apresentou um p-valor de tendência ( $p=0,1129$ ), com um “fold” de aproximadamente 1.5. Em relação ao fenótipo M2, obtivemos um aumento na expressão numérico de IL-10, mas a variação entre as replicatas e o N amostral pequeno não nos permitem rejeitar a hipótese nula. Os genes CCL22 e TGF- $\beta$ 1 não apresentaram diferenças de expressão entre os grupos (Figura 5H a 5J).

### 6.3 Avaliação de expressão gênica de macrófagos após exposição ao meio condicionado de MDA-MB-231 com e sem depleção de p53.

Realizou-se então o experimento para avaliar o efeito do meio condicionado (MC) de células MDA-MB-231, com ou sem silenciamento da proteína p53, na modulação da resposta de macrófagos. Os macrófagos foram tratados com o meio condicionado (proporção 1:1, meio MDA-MB-231:RPMI) por 24 h, seguidos de mais 24 h em meio RPMI fresco. Observou-se que, conforme fazíamos as trocas de meio, algumas células foram perdendo a adesão, levando a uma redução na quantidade total de células ao final do experimento. Paralelamente, foi visto um aumento da presença de *debris* nos poços, especialmente nos grupos tratados com o meio condicionado das células tumorais (Figura 6).

As células foram coletadas para RT-qPCR para avaliação de expressão gênica de CXCL10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$ 1 e CCL22. A expressão dos grupos controle/PMA e dos macrófagos expostos ao meio condicionado (MC) de células MDA-MB-231 com depleção de p53 ou controle (SCR siRNA) foram comparados. A partir dos resultados, não houve mudanças de expressão gênica que possam sugerir que o meio condicionado produzido foi capaz de polarizar as células.



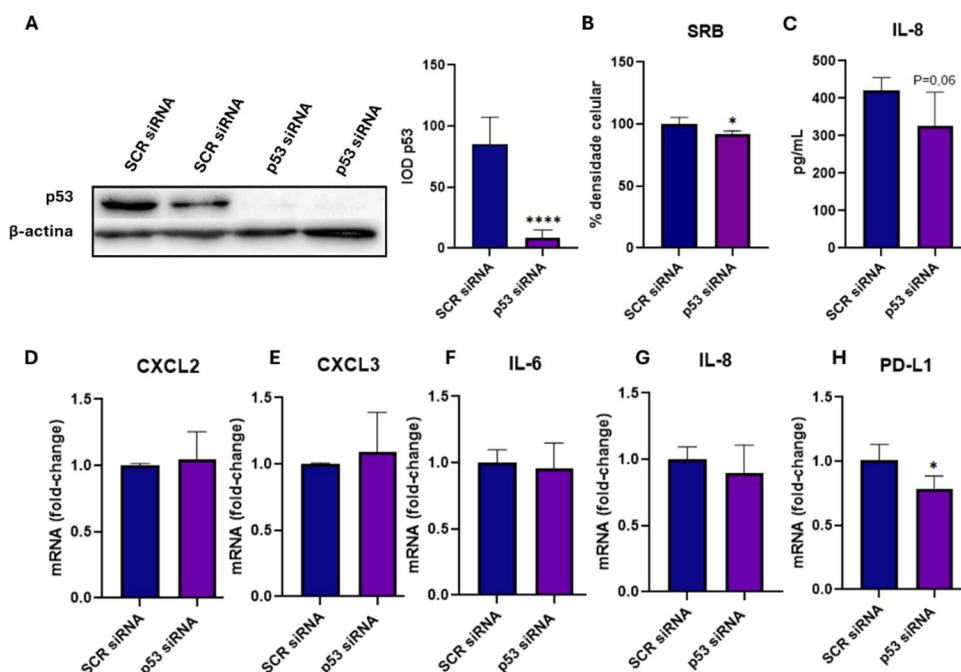
**Figura 6 - Avaliação morfológica e de expressão gênica de macrófagos expostos ao meio condicionado de MDA-MB-231 com e sem depleção de p53.** As células U937 controle foram semeadas em (A) e também diferenciadas com PMA 100 nM (B). Após 48 h os poços foram tratados: MC SCR siRNA (1 Meio MDA-MB-231 siRNA SCR: 1 meio RPMI) e MC p53 siRNA (1 Meio MDA-MB-231 siRNA p53: 1 meio RPMI). As imagens foram tiradas em microscópio invertido IX83, com aumento de 10x, barra de escala: 100  $\mu$ m. Análises de RT-qPCR dos macrófagos U937 para os genes CXCL10 (E), IL1- $\beta$  (F), TNF- $\alpha$  (G), CCL22 (H), IL-10 (I) e TGF- $\beta$  (J). Análise estatística ANOVA seguida de pós-teste de Tukey, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . \* em relação ao CTL PMA, # em relação aos dois grupos comparados. n=1 para os dois grupos de meio condicionado (CXCL10) n=3 para os dois de meio condicionado (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL22, IL-10 e TGF- $\beta$ 1).

#### 6.4 Avaliação de expressão gênica e da presença de IL-8 no secretoma de MDA-MB-231 com e sem depleção de p53.

Após o protocolo de silenciamento transitório utilizando siRNA, a depleção da proteína p53 foi confirmada por Western Blot (Figura 7A). As células e o meio condicionado foram coletados para análises de RT-qPCR, ELISA e composição para o tratamento dos macrófagos. O ensaio de proliferação celular (SRB) foi realizado para avaliar o impacto do silenciamento na densidade celular (Figura 7B), mostrando uma redução significativa ( $p = 0,05$ ), mas com uma diminuição percentual de proliferação inferior a 10%, indicando uma possível irrelevância biológica desse resultado. Por outro lado, esse resultado indica que a p53 mutante não parece ter um envolvimento com a proliferação celular.

Os resultados de RT-qPCR (Figura 7D) demonstraram ausência de diferenças estatísticas na expressão de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias entre as células com p53 mutante e com a proteína silenciada. Entretanto, a expressão de PD-L1, proteína associada à evasão imunológica, foi reduzida de forma significativa com o silenciamento de p53. Além

disso, a análise da secreção de IL-8 por ELISA (Figura 6C) revelou uma tendência de diminuição no secretoma das células com p53 silenciada ( $p = 0,06$ ).



**Figura 7 - Validação do silenciamento de p53 e análise da expressão gênica e da secreção de IL-8 no secretoma de células MDA-MB-231 com e sem depleção de p53.** As células MDA-MB-231 tiveram a p53 mutante silenciada por meio de p53 ou Scramble siRNA (50 nM), após 24 h o meio foi substituído por DMEM 10% SFB 1% ATB limpo. As células e os meios foram coletados após 48 h. (A) Imagem representativa de Western Blot com o gráfico de quantificação de 3 experimentos independentes com  $n=5$ . (B) Proliferação celular por ensaio de SRB ( $n=4$ ). (C) Quantificação de IL-8 secretada utilizando ELISA.  $n=5$ . Quantificações do RT-qPCR utilizando a metodologia de cálculo  $\Delta\Delta Ct$  para os genes CXCL2 (D), CXCL3 (E), IL-6 (F), IL-8 (G), PD-L1 (H). As análises foram feitas por teste T de Student não pareado.  $n=3$  (SCR siRNA)  $n=4$  (p53 siRNA). \*  $p<0,05$ , \*\*\*\*  $p<0,0001$ .

## 7. DISCUSSÃO

O PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) é amplamente utilizado em estudos de indução química da diferenciação celular. Este composto é análogo ao diacilglicerol (DAG) e ativa fortemente a via da proteína quinase C (PKC), alterando a expressão de diversos genes por meio de fatores de transcrição, como o fator nuclear- $\kappa B$  (NF $\kappa B$ ) e a proteína ativadora-1 (AP-1) (Liu, *et al.* 2023; Daigneault, *et al.* 2010). Além disso, tem um papel importante no aumento de expressão dos membros da família  $\beta 2$ -integrina como CD11a, CD11b, CD11c, e CD18, os quais são receptores de adesão, o que explica a aderência celular após a diferenciação (García, *et al.* 1998). Embora amplamente empregado em estudos sobre a biologia e funcionalidade de macrófagos, os protocolos de diferenciação com PMA variam consideravelmente entre os trabalhos (abaixo discutidos), especialmente em relação às concentrações e tempos de exposição utilizados. Assim, consideramos necessário validar o

protocolo de diferenciação com base nos métodos mais amplamente descritos na literatura.

No estudo, testamos as concentrações de 10, 50 e 100 nM e os tempos de exposição de 24 e 48 h, uma vez que são os períodos mais utilizados nos demais estudos (Daigneault, *et al.* 2010). Na literatura, as concentrações mais comumente empregadas para a diferenciação de monócitos em macrófagos variam entre 10, 25, 50, 100 e 200 nM, dependendo da linhagem celular e do tempo de exposição ao composto (Kuno; Srinoun; Penglong, 2020; Lund, *et al.* 2016). Apesar disso, altas concentrações, como 200 nM, podem induzir alterações transcricionais que induzem não somente a diferenciação para macrófago, como também a sua polarização para um fenótipo pró-inflamatório do tipo M1, caracterizado por maior expressão de genes como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Lund, *et al.* 2016). Tendo isso em vista, somente as concentrações abaixo de 200 nM foram utilizadas. Conseguimos observar diferenciação em todas as concentrações, porém há uma maior proporção de células diferenciadas na concentração de 100 nM em exposição a 48 h. Nossos dados estão de acordo com os achados de Prasad *et al.* (2020), o qual descreve que a diferenciação é tipicamente observada após 36-48 h de exposição ao PMA. Além disso, a diferença morfológica após a adição do PMA também foi semelhante aos dados da literatura, uma vez que a célula U937 sem tratamento apresentou estrutura arredondada e refringente em suspensão no meio de cultivo e, após sua diferenciação, aderiu-se à placa e teve sua morfologia alterada, com estrutura intracelular complexa, vacuolizações e formando pseudópodes (Prasad *et al.*, 2020).

Além disso, as análises de RT-qPCR mostram que o tratamento com PMA foi capaz de induzir mudanças substanciais na expressão gênica das células U937, ativando vias relacionadas ao processo inflamatório característico de macrófagos. Nossos achados vão de acordo com o trabalho de Martinez *et al.* (2006), o qual descreve que, durante a diferenciação de monócitos para macrófagos, cerca de 800 transcritos têm sua expressão modificada (2,2%), destacando a superexpressão de IL-1 $\beta$  como central no processo. Assim, os dados da RT-qPCR corroboram com nossos achados morfológicos que indicam a diferenciação dos monócitos a macrófagos. Importante enfatizar que essa primeira etapa de indução com PMA caracteriza-se como “priming”, ou seja, uma iniciação do processo de diferenciação que pode ser ainda polarizada para os fenótipos M1 ou M2 mediante estímulos específicos.

Em seguida procuramos validar nossos modelos de fenótipos do tipo M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) com base em tratamentos comumente utilizados na literatura. Para a indução da polarização ao tipo M1, utilizamos IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) e LPS (100

ng/mL) por 24 h, enquanto o tipo M2 foi induzido com IL-4 (20 ng/mL). A análise de expressão gênica no grupo M1 revelou um aumento significativo de CXCL10 e TNF- $\alpha$ . Observou-se também aumento de IL-1 $\beta$ , embora sem significância estatística. Esses achados estão alinhados aos de Ardighieri *et al.* (2021), que relataram alta indução de CXCL10 no fenótipo M1, em contraste com sua modulação negativa no M2. Da mesma forma, Martinez *et al.* (2006) descreve o aumento de TNF- $\alpha$  em M1 em comparação ao M2, com a proporção de mudança de expressão semelhante (CXCL10 > TNF- $\alpha$ ). Contudo, a magnitude observada foi menor, possivelmente refletindo indução parcial do M1 ou diferenças experimentais relacionadas ao modelo celular ou ao tempo de exposição aos compostos. A repetição desses experimentos nos auxiliará a compreender melhor a indução do fenótipo.

No perfil M2, observamos um aumento mais evidente na expressão de IL-10, embora com considerável variação entre as replicatas. A expressão de CCL22 também apresentou tendência de aumento nesse grupo, enquanto os níveis de TGF- $\beta$ 1 permaneceram semelhantes entre os grupos analisados. Nossos achados vão de acordo com os resultados de Pe *et al.* (2022), já que os valores de diferença de fold-change entre M2 e CTL PMA dos 3 genes analisados pelos autores estão bastante próximos do encontrado em nosso estudo. Além disso, o grupo de Martinez *et al.* (2006) descreve que há uma variância de 90% do perfil transcricional de M0, ou macrófagos não polarizados, quando passam a expressar o fenótipo M1, enquanto a indução de M2 tem somente poucos ajustes, com uma variância de 8% da expressão gênica. Outro fator que pode explicar o porquê de termos encontrado menor diferença de expressão nos genes CCL22 e TGF- $\beta$ 1 é o método de indução utilizado, uma vez que para a indução clássica de M2a é utilizada a combinação de IL-4 + IL-13 (Strizova *et al.*, 2023). Deve-se ainda considerar que esse fenótipo está relacionado a ambientes de hipóxia e os modelos bidimensionais de cultivo (2D) carecem de componentes representativos da matriz extracelular (ECM), sendo um fator limitante para a indução de M2 (Zou *et al.*, 2023; Sapudom *et al.*, 2021). Assim, considerando as dificuldades relacionadas a indução desse fenótipo, podemos concluir que o nosso modelo de M2 foi efetivo.

Os resultados de RT-qPCR sugerem que o meio condicionado de células MDA-MB-231 não alterou a expressão gênica dos macrófagos. Esses resultados diferem dos apresentados por Cassetta *et al.* (2019), que demonstraram níveis aumentados de TNF- $\alpha$  na exposição de macrófagos ao meio condicionado de duas linhagens distintas de TNBC (MDA-MB-231 e MDA-MB-468). De forma parecida, Pe *et al.* (2022) relataram que macrófagos expostos ao

meio condicionado de MDA-MB-231 exibiram um fenótipo misto, com aumento de expressão de TGF- $\beta$ 1, CXCL10 e TNF- $\alpha$ , além de secreção elevada de IL-10 e IL-6, e baixos níveis de IL-4, padrões não corroborados em nosso estudo.

Nossos dados também divergem dos apresentados por Cooks *et al.* (2018), que observaram, no co-cultivo de macrófagos com células contendo mutações em TP53, em comparação com células com p53 depletado, um aumento na expressão de IL-10, CCL2 e VEGF, acompanhado por uma redução na expressão de TNF- $\alpha$ , o que foi posteriormente validado por ELISA, apresentando que essa proteína estaria influenciando em um fenótipo tipo M2 nesses macrófagos. De maneira semelhante Ghosh *et al.* (2021), relatam que após indução de p53 mutante, a expressão de IL-10 em macrófagos foi aumentada, enquanto TNF- $\alpha$  foi reduzida. Outro dado importante é que após silenciamento da proteína p53 em MDA-MB-231, observou-se superexpressão de CXCL10 nos macrófagos, indicando que apesar do trabalho ter relacionado a característica do macrófago a um tipo M2, também existem genes característicos de M1 com expressão aumentada nessas células.

É importante destacar as discrepâncias observadas na literatura em relação ao perfil de expressão gênica de macrófagos modulados pelo meio condicionado de células tumorais contendo p53 mutante. Enquanto alguns trabalhos apontam aumento de proteínas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-8 após exposição do meio condicionado (Cassetta *et al.* (2019), outros sugerem um fenótipo misto, com a regulação de genes associados tanto ao perfil M1 quanto ao M2 (Pe et al., 2022). Há ainda relatos que vinculam a p53 mutante a um perfil predominantemente M2 em macrófagos (Cooks *et al.*, 2018). Além disso, deve-se considerar que as definições clássicas de perfis M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) podem ser insuficientes para capturar a complexidade do comportamento desses macrófagos, uma vez que os subtipos de M2, como M2a, M2b, M2c e M2d, apresentam características distintas, combinando por vezes expressão de moléculas anti-inflamatórias, como IL-10, com marcadores pró-inflamatórios, como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Strizova *et al.*, 2023). Essa heterogeneidade pode refletir a variabilidade dos modelos utilizados.

Nossos experimentos com siRNA mostraram uma depleção bastante significativa proteína p53 mutante, como confirmado por Western Blot. Os resultados demonstraram que o silenciamento da proteína teve efeitos pequenos na densidade celular em ensaio SRB. Embora essa metodologia seja frequentemente interpretada como “proliferação” ou “citotoxicidade”, um ensaio complementar mais específico é necessário. No nosso modelo, a análise das culturas

celulares, em microscopia óptica de rotina, não mostrou evidência de morte celular ou alterações morfológicas significativas nas culturas celulares (dado não mostrado). Esses resultados corroboram estudos como o de Wang *et al.* (2023), que indicam um impacto limitado da depleção de p53 na proliferação celular. No entanto, é sugerido que a p53 mutante tenha ganho de função, agindo como fator de transcrição em vias que a proteína *wild-type* não modula classicamente, como a de IL-8 e IL-6. Dessa forma, a mutação pode auxiliar na modulação do microambiente tumoral.

Após a depleção da proteína p53 mutante em células MDA-MB-231, investigamos a expressão gênica de CXCL2, CXCL3, IL-6 e IL-8, e a secreção de IL8. Embora os dados de RT-qPCR não tenham mostrado diferenças significativas na expressão dessas citocinas entre os grupos, a análise de ELISA revelou uma tendência de diminuição na secreção de IL-8 nas células com p53 silenciada. Os achados de expressão gênica divergem dos descritos por Yeudall *et al.* (2012), que observaram redução nas expressões de IL-8, CXCL2 e outras citocinas pró-inflamatórias após a depleção de p53 mutante. De maneira similar, Vecchi *et al.* (2022) associaram linhagens p53 mutantes a um aumento de IL-6 no meio de cultivo, também não observado nos nossos dados em nível de mRNA. Entretanto, nossos resultados de ELISA estão parcialmente alinhados, confirmando concentrações mais altas de IL-8 no secretoma de células expressando a proteína mutante. Além disso, dados prévios do nosso grupo mostram por meio de ELISA maiores concentrações de IL-6, IL-8 e CXCL2 na presença de p53 mutante (Neves, 2023).

Além de transcritos relacionados à inflamação, também procuramos investigar a correlação da p53 mutante com a proteína PD-L1, a qual está associada à evasão imunológica e tem sido muito estudada como possível alvo terapêutico no tratamento de TNBC (Schmid *et al.*, 2020). Curiosamente nossos resultados indicam que a depleção da p53 mutada reduz níveis de expressão de PD-L1 (Figura 6H). Esse dado corrobora os achados de Xing *et al.* (2022), que evidenciou correlação entre a expressão de p53 mutante e PD-L1 em amostras de TNBC por análises histológicas.

## **8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

Em relação à indução do macrófago M2, não foram vistas diferenças significativas na expressão de genes descritos como marcadores desse fenótipo (CCL22, IL-10 e TGF- $\beta$ 1), sendo essa uma limitação encontrada em outros trabalhos que utilizam o modelo bidimensional de

cultivo (2D), uma vez que os macrófagos M2 são encontrados em áreas bem únicas do microambiente tumoral, como zonas de hipóxia e com depleção de nutrientes.

Tivemos alguns resultados incongruentes com os descritos na literatura relacionados a expressão de MDA-MB-231 e de U937 expostos ao meio condicionado das células tumorais. Os resultados divergentes obtidos em comparação com a literatura destacam desafios metodológicos e experimentais que podem ter impactado nossas análises. Diferenças como, e as condições do experimento, como o tempo de exposição ao meio condicionado (48 h versus as 24 h usadas aqui), podem ter contribuído para os achados discrepantes.

A perda de adesão celular e o acúmulo de *debris* durante as trocas de meio, observados nas figuras 6C e 6D, também representam limitações críticas. Essas falhas resultaram em menor rendimento de mRNA, elevando os valores de Ct e reduzindo os níveis de expressão gênica detectáveis, além de aumentar a variabilidade entre as replicatas. A necessidade de descartar amostras com baixos rendimentos de mRNA ( $<50$  ng/ $\mu$ L) limitou também o tamanho amostral, fazendo com que a quantidade de amostras por grupo ficasse menor, o que reduz a robustez estatística das análises de RT-qPCR. Nas extrações de mRNA das células MDA-MB-231, algumas amostras apresentaram níveis de mRNA relativamente baixos (entre 50 e 100 ng/ $\mu$ L). Além disso, foi observado que algumas amostras tinham uma relação 230/260 nm abaixo do ideal ( $\leq 1.8$ ), indicando possíveis contaminantes, como proteínas ou solventes orgânicos, na preparação do RNA. Esses fatores podem ter interferido na qualidade das reações de transcrição reversa e amplificação, reduzindo a confiabilidade dos resultados obtidos.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Caracterização do fenótipo dos macrófagos: Realizar análises mais aprofundadas do fenótipo dos macrófagos, utilizando técnicas como imunofenotipagem por citometria de fluxo para identificar os macrófagos e seus subtipos. Além disso, incluir IL-13 no protocolo de indução do fenótipo M2 e pensar em modelos de macrófagos 3D, para termos um modelo mais característico que, de fato, é bastante utilizado nos estudos mais robustos sobre o tema.
- Modelo tumoral mais representativo: Incluir outras linhagens de TNBC e com outras mutações em p53, como MDA-MB-468, e linhagens que expressem p53 *wild-type* como MCF7 para compreender melhor a influência da mutação de p53.

- Investigação da relação entre p53 mutante e PD-L1: correlacionar por diferentes metodologias a interação de PD-L1 e p53 mutante.

## **10. CONCLUSÃO**

Concluimos que o protocolo de diferenciação de monócitos U937 para macrófagos com PMA teve melhor desempenho com a concentração de 100 nM em 48 h, promovendo uma diferenciação mais eficiente e consistente. Assim, este protocolo proporciona uma base confiável para estudos futuros sobre a biologia e funcionalidade de macrófagos utilizando a linhagem celular U937. Em relação à indução de fenótipo, nossos resultados sugerem que os estados de polarização M1 e M2 podem ser induzidos nessa linhagem o que, mediante alguns ajustes no protocolo experimental, pode ser uma ferramenta de estudo do impacto de oncogenes e supressores tumorais sobre o perfil de macrófagos associados ao tumor.

Os experimentos com células MDA-MB-231 e macrófagos U937 expostos ao meio condicionado das tumorais não permitiram conclusões sobre a influência da mutação de p53 na expressão mRNA codificante de proteínas pró-inflamatórias nem sobre a polarização de macrófagos. No entanto, foi observada uma redução significativa na expressão de PD-L1 em células tumorais com p53 mutante depletada, indicando possível impacto na evasão imunológica. Dado que a PD-L1 é um alvo terapêutico promissor em diversos tipos de câncer, a modulação da p53 mutante pode ter relevância clínica no contexto de imunoterapias para o TNBC. Além disso, os dados de ELISA mostram maior secreção de IL-8 na presença da p53 mutante. Em resumo, os resultados sugerem que a p53 mutante pode influenciar a modulação do microambiente tumoral, embora sejam necessários ajustes metodológicos e experimentais para validar e aprofundar esses achados.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARADO-ORTIZ, Eduardo; de la CRUZ-LÓPEZ, Karin G.; BECERRIL-RICO, Jared; SARABIA-SÁNCHEZ, Miguel A.; ORTIZ-SÁNCHEZ, Elizabeth, GARCÍA-CARRANCÁ, Alejandro. Mutant p53 Gain-of-Function: Role in Cancer Development, Progression, and Therapeutic Approaches. *Front Cell Dev Biol*, [S.L.], 8:607670, fev. 2021. doi:10.3389/fcell.2020.607670

ARDIGHIERI, Laura; MISSALE, Francesco; BUGATTI, Mattia; GATTA, Luisa Benerini; PEZZALI, Irene; MONTI, Matilde; GOTTARDI, Stefano; ZANOTTI, Laura; BIGNOTTI, Eliana; RAVAGGI, Antonella. Infiltration by CXCL10 Secreting Macrophages Is Associated With Antitumor Immunity and Response to Therapy in Ovarian Cancer Subtypes. *Frontiers In Immunology*, [S.L.], v. 12, n. 690201, 18 jun. 2021. *Frontiers Media SA*. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.690201>.

AUBREY, Brandon J; KELLY, Gemma L; JANIC, Ana; HEROLD, Marco J; STRASSER, Andreas. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death & Differentiation*, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 104-113, 17 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.169>.

BECKERMAN, R.; PRIVES, C. Transcriptional Regulation by P53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, [S.L.], v. 2, n. 8, p. a000935–a000935, 2010. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a000935>.

BOUTILIER, Ava J.; ELSAWA, Sherine F. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 22, n. 13, p. 6995, 29 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22136995>.

CASSETTA, Luca; FRAGKOGIANNI, Stamatina; SIMS, Andrew H.; SWIERCZAK, Agnieszka; FORRESTER, Lesley M.; ZHANG, Hui; SOONG, Daniel Y.H.; COTECHINI, Tiziana; ANUR, Pavana; LIN, Elaine Y.. Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets. *Cancer Cell*, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 588-602, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2019.02.009>.

CHEN, Daniel S.; MELLMAN, Ira. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, [S.L.], v. 541, n. 7637, p. 321-330, jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature21349>.

CHEN, Shanze; SAEED, Abdullah F.u.H.; LIU, Quan; JIANG, Qiong; XU, Haizhao; XIAO, Gary Guishan; RAO, Lang; DUO, Yanhong. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, [S.L.], v. 8, n. 1, 22 maio 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-023-01452-1>.

CHEN, Xiaohua; ZHANG, Taotao; SU, Wei; DOU, Zhihui; ZHAO, Dapeng; JIN, Xiaodong; LEI, Huiwen; WANG, Jing; XIE, Xiaodong; CHENG, Bo. Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. *Cell Death & Disease*, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 44444-44445, 18 nov. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-022-05408-1>.

COOKS, Tomer; PATERAS, Ioannis S.; JENKINS, Lisa M.; PATEL, Keval M.; ROBLES, Ana I.; MORRIS, James; FORSHEW, Tim; APPELLA, Ettore; GORGOLIS, Vassilis G.; HARRIS, Curtis C.. Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246. *Nature Communications*, [S.L.], v. 9, n. 1, 22 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03224-w>.

DAIGNEAULT, Marc; PRESTON, Julie A.; MARRIOTT, Helen M.; WHYTE, Moira K. B.; DOCKRELL, David H.. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *Plos One*, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 8668, 13 jan. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>.

DVORAK, Harold F.. Tumors: wounds that do not heal.:redux. *Cancer Immunology Research*, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-11, 1 jan. 2015. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.cir-14-0209>.

GARCÍA, Angel; SERRANO, Alfonso; ABRIL, Eduardo; JIMENEZ, Pilar; REAL, Luis Miguel; CANTÓN, Julia; GARRIDO, Federico; RUIZ-CABELLO, Francisco. Differential effect on U937 cell differentiation by targeting transcriptional factors implicated in tissue- or stage-specific induced integrin expression. *Experimental Hematology*, Espanha, v. 1999, n. 27, p. 353-364, jul. 1998.

GHOSH, Monisankar; SAHA, Suchandrima; BETTKE, Julie; NAGAR, Rachana; PARRALES, Alejandro; IWAKUMA, Tomoo; VELDEN, Adrianus W.M. van Der; MARTINEZ, Luis A.. Mutant p53 suppresses innate immune signaling to promote tumorigenesis. *Cancer Cell*, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 494-508, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2021.01.003>.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, [S.L.], v. 140, n. 6, p. 883-899, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>.

HANAHAH, Douglas. Hallmarks of Cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 31-46, 1 jan. 2022. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>.

HANAHAH, Douglas; MONJE, Michelle. Cancer hallmarks intersect with neuroscience in the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 573-580, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.012>.

HINSHAW, Dominique C.; SHEVDE, Lalita A.. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research*, [S.L.], v. 79, n. 18, p. 4557-4566, 13 set. 2019. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-3962>.

HUA, Zhan; WHITE, Jason; ZHOU, Jianjun. Cancer stem cells in TNBC. *Seminars In Cancer Biology*, [S.L.], v. 82, p. 26-34, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.06.015>

Instituto Nacional do Câncer. DADOS E NÚMEROS SOBRE CÂNCER DE MAMA: Relatório anual 2023. Rio de Janeiro, INCA, 2023. Disponível em: [https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/relatorio\\_dados-e-numeros-ca-mama-2023.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/relatorio_dados-e-numeros-ca-mama-2023.pdf) Acesso em: 01 maio 2024

Instituto Nacional do Câncer. O que é câncer? Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 30 abr. 2024.

International Agency for Research on Cancer. Breast cancer. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/cancer-type/breast-cancer/#:~:text=In%202020%2C%20breast%20cancer%20was,cancer%20type%2C%20after%20lung%20cancer..> Acesso em: 01 maio 2024.

International Agency for Research on Cancer. Cancer Topics. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/cancer-topics/#cancer-type>. Acesso em: 30 abr. 2024.

KASTENHUBER, Edward R.; LOWE, Scott W.. Putting p53 in Context. *Cell*, [S.L.], v. 170, n. 6, p. 1062-1078, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>.

KUNO, Suhaibee; SRINOUN, Kanitta; PENGLONG, Tipparat. The effects of Phorbol 12-myristate 13-acetate concentration on the expression of miR-155 and miR-125b and their macrophage function-related genes in the U937 cell line. *The Journal Of Toxicological Sciences*, [S.L.], v. 45, n. 12, p. 751-761, 2020. Japanese Society of Toxicology. <http://dx.doi.org/10.2131/jts.45.751>.

LIMA, Karoline Almeida. Expressão de PDL1 em Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas com Mutações na Via KEAP1/NRF2. 2022. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

LIU, Juan; ZHANG, Cen; FENG, Zhaohui. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 170-179, 1 mar. 2014. China Science Publishing & Media Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1093/abbs/gmt144>.

LIU, Tiezhu; HUANG, Tao; LI, Jiajia; LI, Aqian; LI, Chuan; HUANG, Xiaoxia; LI, Dexin; WANG, Shiwen; LIANG, Mifang. Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *Plos One*, [S.L.], v. 18, n. 7, p. 0286056, 17 jul. 2023. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0286056>.

LUND, Maria E.; TO, Joyce; O'BRIEN, Bronwyn A.; DONNELLY, Sheila. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal Of Immunological Methods*, [S.L.], v. 430, p. 64-70, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2016.01.012>.

MARTINEZ, Fernando O.; GORDON, Siamon; LOCATI, Massimo; MANTOVANI, Alberto. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: new molecules and patterns of gene expression. *The Journal Of Immunology*, [S.L.], v. 177, n. 10, p. 7303-7311, 15 nov. 2006. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303>.

National Cancer Institute. What Is Cancer? Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 30 abr. 2024.

NEVES, Raquel Nascimento das. Sinalização de p53 mutante e Interleucina-8: Caracterização funcional e influência na patogênese do câncer de mama triplo-negativo. 2023. 101 f. Tese (Doutorado) - Programa de pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa

Catarina, Florianópolis, 2023.

PARRALES, Alejandro; IWAKUMA, Tomoo. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Front. Oncol.*, [S.L.], 5:288, dec. 2015. doi: 10.3389/fonc.2015.00288

PE, Kristine C. S.; SAETUNG, Rattana; YODSURANG, Varalee; CHAOTHAM, Chatchai; SUPPIPAT, Koramit; CHANVORACHOTE, Pithi; TAWINWUNG, Supannikar. Triple-negative breast cancer influences a mixed M1/M2 macrophage phenotype associated with tumor aggressiveness. *PLoS ONE*, [S.L.], 17(8): e0273044 2022.  
<https://doi.org/10.1371/journal.Pone.0273044>

PITOLLI, Consuelo; WANG, Ying; CANDI, Eleonora; SHI, Yufang; MELINO, Gerry; AMELIO, Ivano. P53-Mediated Tumor Suppression: dna-damage response and alternative mechanisms. *Cancers*, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 1983, 9 dez. 2019. MDPI AG.  
<http://dx.doi.org/10.3390/cancers11121983>.

PRASAD, Ankush; SEDLÁŘOVÁ, Michaela; BALUKOVA, Anastasiia; OVSII, Alina; RÁC, Marek; KřUPKA, Michal; KASAI, Shigenobu; POSPÍLIL, Pavel. Reactive Oxygen Species Imaging in U937 Cells. *Frontiers In Physiology*, [S.L.], v. 11, n. 552569, 15 out. 2020. Frontiers Media SA.  
<http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.552569>.

PURCU, Duygu Unuvar; KORKMAZ, Asli; GUNALP, Sinem; HELVACI, Derya Goksu; ERDAL, Yonca; DOGAN, Yavuz; SUNER, Asli; WINGENDER, Gerhard; SAG, Duygu. Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. *Plos One*, [S.L.], v. 17, n. 3, e0265196, 14 mar. 2022. Public Library of Science (PLOS).  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0265196>.

RIVLIN, Noa.; BROSH, Ran.; OREN, Moshe.; ROTTER, Varda. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes & Cancer*, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 466-474, 1 abr. 2011. SAGE Publications.  
<http://dx.doi.org/10.1177/1947601911408889>.

SABAPATHY, Kanaga; LANE, David P.. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nature Reviews Clinical Oncology*, [S.L.], v.15, n. 1, p. 13-30, 26 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.151>.

SAPUDOM, Jiranuwat; KARAMAN, Shaza; MOHAMED, Walaa K. E.; GARCIA-SABATÉ, Anna; QUARTEY, Brian C.; TEO, Jeremy C. M.. 3D in vitro M2 macrophage model to mimic modulation of tissue repair. *Npj Regenerative Medicine*, [S.L.], v. 6, n. 1, 30 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41536-021-00193-5>.

SCHMID, Peter; CORTES, Javier; PUSZTAI, Lajos; MCARTHUR, Heather; KÜMMEL, Sherko; BERGH, Jonas; DENKERT, Carsten; PARK, Yeon Hee; HUI, Rina; HARBECK, Nadia. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 382, n. 9, p. 810-821, 27 fev. 2020. Massachusetts Medical Society.  
<http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1910549>.

STRIZOVA, Zuzana; BENESOVA, Iva; BARTOLINI, Robin; NOVYSEDLAK, Rene; CECRDLOVA, Eva; FOLEY, Lily Koumbas; STRIZ, Ilja. M1/M2 macrophages and their overlaps –

myth or reality? *Clinical Science*, [S.L.], v. 137, n. 15, p. 1067-1093, ago. 2023. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/cs20220531>.

SO, Jae Young; OHM, Joyce; LIPKOWITZ, Stan; YANG, Li. Triple negative breast cancer (TNBC): non-genetic tumor heterogeneity and immune microenvironment. *Pharmacology & Therapeutics*, [S.L.], v. 237, p. 108253, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108253>.

SOUSSI, Thierry; MAY, Pierre. Structural Aspects of the p53 Protein in Relation to Gene Evolution: a second look. *Journal Of Molecular Biology*, [S.L.], v. 260, n. 5, p. 623-637, ago. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0425>.

STIEWE, Thorsten; HARAN, Tali E.. How mutations shape p53 interactions with the genome to promote tumorigenesis and drug resistance. *Drug Resistance Updates*, [S.L.], v. 38, p. 27-43, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2018.05.001>.

The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, [S.L.], 490, 61–70 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11412>

VECCHI, Lara; MOTA, Sara Teixeira Soares; ZÓIA, Mariana Alves Pereira; MARTINS, Isabella Castro; SOUZA, Jessica Brito de; SANTOS, Tiago Góss; BESERRA, Adriano de Oliveira; ANDRADE, Victor Piana de; GOULART, Luiz Ricardo; ARAÚJO, Thaise Gonçalves. Interleukin-6 Signaling in Triple Negative Breast Cancer Cells Elicits the Annexin A1/Formyl Peptide Receptor 1 Axis and Affects the Tumor Microenvironment. *Cells*, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 1705, 20 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells11101705>.

VISSER, Karin E. de; JOYCE, Johanna A.. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 374-403, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>.

VRBA, Lukas; JUNK, Damian J; NOVAK, Petr; FUTSCHER, Bernard W. P53 induces distinct epigenetic states at its direct target promoters. *Bmc Genomics*, [S.L.], v. 9, n. 1, 15 out. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-486>.

WANG, Zilu; BURIGOTTO, Matteo; GHETTI, Sabrina; VAILLANT, François; TAN, Tao; CAPALDO, Bianca D.; PALMIERI, Michelle; HIROKAWA, Yumiko; TAI, Lin; SIMPSON, Daniel S.. Loss-of-Function but Not Gain-of-Function Properties of Mutant TP53 Are Critical for the Proliferation, Survival, and Metastasis of a Broad Range of Cancer Cells. *Cancer Discovery*, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 362-379, 24 out. 2023. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-23-0402>.

XIAO, Yi; YU, Dihua. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, [S.L.], v. 221, p. 107753, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107753>.

XING, Ai-Yan; LIU, Long; LIANG, Ke; WANG, Bin. P53 Missense Mutation is Associated with Immune Cell PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Investigation*, [S.L.], v. 40, n. 10, p. 879-888, 29 set. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07357907.2022.2115058>.

YEUDALL, W.Andrew; VAUGHAN, Catherine A.; MIYAZAKI, Hiroshi; RAMAMOORTHY, Mahesh; CHOI, Mi-Yon; CHAPMAN, Christopher G.; WANG, Huixin; BLACK, Elena; BULYSHEVA, Anna A.; DEB, Swati Palit. Gain-of-function mutant p53 upregulates CXC chemokines and enhances cell migration. *Carcinogenesis*, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 442-451, 22 nov. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgr270>.

YIN, Wen; WANG, Jialing; JIANG, Linling; KANG, Y James. Cancer and stem cells. *Experimental Biology And Medicine*, [S.L.], v. 246, n. 16, p. 1791-1801, 5 abr. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.1177/15353702211005390>.

YUE, Xuétian; ZHAO, Yuhan; XU, Yang; ZHENG, Min; FENG, Zhaohui; HU, Wenwei. Mutant p53 in Cancer: accumulation, gain-of-function, and therapy. *Journal Of Molecular Biology*, [S.L.], v. 429, n. 11, p. 1595-1606, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.030>.

ZANOTTO-FILHO, Alfeu; RAJAMANICKAM, Subapriya; LORANC, Eva; MASAMSETTI, V. Pragathi; GORTHI, Aparna; ROMERO, July Carolina; TONAPI, Sonal; GONÇALVES, Rosangela Mayer; REDDICK, Robert L.; BENAVIDES, Raymond. Sorafenib improves alkylating therapy by blocking induced inflammation, invasion and angiogenesis in breast cancer cells. *Cancer Letters*, [S.L.], v. 425, p. 101-115, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2018.03.037>.

ZHAOTING, Li; DING, Yingyue; LIU, Jun; WANG, Jianxin; MO, Fanyi; WANG, Yixin; CHEN-MAYFIELD, Ting-Jing; SONDEL, Paul M.; HONG, Seungpyo; HUX, Quanyin. Depletion of tumor associated macrophages enhances local and systemic platelet-mediated anti-PD-1 delivery for post-surgery tumor recurrence treatment. *Nat Commun*, [S.L.], 13(1):1845, apr 2022. doi:10.1038/s41467-022-29388-0.

ZHU, Shuangli; WU, Yuze; SONG, Bin; YI, Ming; YAN, Yuheng; MEI, Qi; WU, Kongming. Recent advances in targeted strategies for triple-negative breast cancer. *Journal Of Hematology & Oncology*, [S.L.], v. 16, n. 1, ago. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-023-01497-3>.

ZOU, Zijuan; LIN, Hongfen; LI, Mengsen; LIN, Bo. Tumor-associated macrophage polarization in the inflammatory tumor microenvironment. *Front. Oncol*, [S.L.], v. 13:1103149, fev. 2023. doi: 10.3389/fonc.2023.1103149.