

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Maurilio da Silva Morrone

**O PAPEL DA PROTEÍNA BRCA-1 SOBRE A RESPOSTA DE MACRÓFAGOS
ATIVADOS PELAS VIAS CLÁSSICA, ALTERNATIVA E QUANDO EXPOSTOS A
MEIO CONDICIONADO DE GLIOMAS.**

Porto Alegre

2019

**O PAPEL DA PROTEÍNA BRCA-1 SOBRE A RESPOSTA DE MACRÓFAGOS
ATIVADOS PELAS VIAS CLÁSSICA, ALTERNATIVA E QUANDO EXPOSTOS A
MEIO CONDICIONADO DE GLIOMAS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Orientador e coordenador do projeto:

Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira, Professor Associado, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Co-orientador: Prof. Dr. Alfeu Zanotto-

Filho, Professor associado, Departamento de Farmacologia, UFSC.

Porto Alegre

2019

*“... Todo caminho da gente é resvaloso. Mas também, cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta!
...O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa. Sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem. ”*

João Guimarães Rosa

Agradecimentos

Gostaria de primeiro agradecer a minha família, mas efusivamente aos meus avós e pais por me proporcionarem, apesar das dificuldades, todas as oportunidades que eu poderia ter em vida até aqui. Sou uma pessoa extremamente privilegiada por ter esse “berço de ouro”. Vô Renato, Vó Adélia, Vó Gláucia (veia), Vô “jandico” (onde estiver), vocês são meus exemplos que seguirei eternamente. Mãe, Pai e Pai Milson: o sentimento e dedicação incondicional de vocês são meu porto seguro para que eu possa ir além e voltar sempre quando se fizer necessário. Amo vocês!

Zé Cláudio, meu orientador e eterno exemplo docente e de pessoa. Tens na tua essência uma habilidade de nos ensinar como desenvolver o conhecimento e o sentido de viver tudo o que passamos durante esta fase. Obrigado pelo acolhimento nestes 11 anos e pela tua permanente disponibilidade ao compartilhar teu tempo, conhecimento e paciência comigo-afinal de contas, tenho uma história de vida contigo em que muitas coisas acontecem, e sempre me acolheste com minhas decisões, da melhor maneira que eu pudesse imaginar. É um privilégio dizer ao mundo que “sou aluno do Zé”. Hoje, como professor, te levo comigo em toda sala de aula que adentro, usando teus trejeitos, vocabulário e buscando reproduzir tua dedicação com a docência que sempre me mostraste ser imprescindível. Obrigado por tanto.

Aos colegas do laboratório 32 do departamento de bioquímica da UFRGS, principalmente àqueles que me ajudaram a construir este trabalho e me construir como pessoa. Em especial, gostaria de agradecer ao meu colega

e hoje co-orientador desta tese Alfeu Zanotto-Filho. Meu desenvolvimento científico passa pela tua atenção comigo, pois me mostraste que eu era capaz de desenvolver este trabalho mesmo sem pensar que eu pudesse o fazer. Sem tua ajuda eu não chegaria até aqui. Muito obrigado.

Dedico esta tese, em especial, a um colega que está muito orgulhoso de tudo isso também, independentemente de onde estiver. Rafael Calixto Bortolin, eu te amo, cara! O “Uruguaiana” vive em todos nós que tivemos a oportunidade de conhecê-lo. Uma pessoa de enorme coração, que tinha a palavra intensidade tatuada em suas escolhas e atitudes. Obrigado por tudo que vivemos nesta vida. Sinto muito tua falta, e não será diferente no final desta fase concluída. Voa, Urugua!

Aos meus alunos do Fênix vestibulares, que me presenteiam com a preferência de nos escolher junto da sede pelo conhecimento em todo encontro de aula proporcionado. Ao longo deste tempo, vocês me ensinaram e continuam me ensinando muito sobre biologia, paciência, perseverança e amor ao próximo. Neste tempo me encontrei como professor e motivador de pessoas, e isso dá sentido ao que me proponho ser como profissional. Muito obrigado!

À minha namorada, Nauana Somensi. Teu companheirismo, dedicação, e amor se fazem presente no meu cotidiano. No decorrer do tempo em que um relacionamento perdura, ele se transforma. Percebemos, aos poucos, que somos feitos de qualidades e defeitos; acertos e erros. Dentre todos eles, tivemos maturidade e cumplicidade para continuar a vida que escolhemos ter. Sou IMENSAMENTE agradecido pela tua contribuição. O sentimento que tu cativa em mim é elementar antes mesmo do início desta trajetória. Amo-te!

Aos meus amigos, pelos momentos de diversão contagiante e terapêutica. Vocês são a família que escolhi. A presença de vocês me faz rever conceitos diariamente e aprender a cada conversa. Aos colegas da biologia da UFRGS, com quem vivi momentos inenarráveis e de grande valia.

Aos professores e funcionários do PPG bioquímica da UFRGS pelos ensinamentos e auxílios.

Aos órgãos de fomento Cnpq, Capes e FAPERGS e a todos os brasileiros por financiarem o desenvolvimento científico deste trabalho.

RESUMO

Macrófagos são células apresentadoras de antígenos que respondem a sinais inflamatórios possuindo amplo perfil fenotípico de acordo com cenário fisiológico. A atividade de macrófagos é peça importante para a homeostase tecidual, atuando na defesa do hospedeiro no combate a infecções, reparo tecidual e também na regulação de células imunes adjacentes. Além disso, macrófagos se mostram como peça chave no desenvolvimento de tumores, inclusive os cerebrais. A proteína BRCA-1 (BReast CAncer-1) é envolvida no reparo de DNA dependente de recombinação homóloga, reconhecendo e evitando a permanência de danos de fita dupla na molécula de DNA. Mutações ou mudanças na expressão de BRCA-1 são relacionadas com o surgimento (hereditário ou não) de câncer de mama, ovário e próstata. BRCA-1 apresenta propriedades em contextos inflamatórios, porém pouco explorada na biologia de macrófagos. O objetivo desta tese foi analisar a interferência da baixa expressão de BRCA-1 induzida por silenciamento em parâmetros inflamatórios da resposta de macrófagos RAW 264.7 diferenciados a fenótipos clássico, alternativo bem como quando expostos a meio condicionado de culturas de glioblastoma (CMC6). Os macrófagos silenciados apresentaram maior fragmentação de DNA através do ensaio de cometa; houve parada do ciclo celular na transição G1/S causada pelos tratamentos com LPS e meio condicionado de linhagem C6 de glioma (CMC6) e as células silenciadas mostraram também menor sobrevivência após as exposições. O silenciamento de BRCA-1 atenuou a expressão de TNF- α e IL-6 aumentadas por LPS e CMC6 além de ter aumentado a produção de marcadores anti-inflamatórios

como TGF- β e IL-10. Os tratamentos com LPS e CMC6 causaram aumento no número de células autofágicas e o silenciamento de BRCA-1 potencializou a autofagia nestes tratamentos, inclusive nos macrófagos expostos a IL-4. A atividade do fator de transcrição NF- κ B foi comprometida nas células silenciadas uma vez que os tratamentos com LPS e CMC6 estimularam sua atividade transicional. Os experimentos de “docking” molecular mostram que a conservação do domínio BRCT de BRCA-1 é importante para a interação física entre a proteína e a subunidade p65 de NF- κ B, e que mutações em BRCA-1 relacionadas a neoplasias BRCA-1 dependentes impedem a formação do complexo BRCA-1-p65, sendo um forte indicativo da perda de capacidade inflamatória para macrófagos diferenciados. Análises de imunocitoquímica mostraram que a expressão de BRCA-1 diminuiu a presença da subunidade p65 de NF- κ B no núcleo das células estimuladas por LPS e CMC6. Nossos resultados revelam que a expressão constitutiva de BRCA-1 exerce papel central na ativação de macrófagos por alterar as vias responsivas ao fator de transcrição NF- κ B, além de abrirem perspectivas para futuras investigações sobre o papel de BRCA-1 que abordem não somente o reparo de DNA e sobrevivência celular, mas também sobre vias de resposta inflamatória destes fagócitos frente a processos inflamatórios e neoplasias gliais.

ABSTRACT

Macrophages are antigen present cells which respond to inflammatory signals having a wide phenotypic profile according to physiological status. Macrophage activity is an important part of tissue homeostasis, acting in the host defense against infection, tissue repair and also in the regulation of adaptative immune cells. In addition, macrophages play a key role in the development of tumors, including the brain. The BRCA-1 protein (BReast CAncer-1) is involved in homologous recombination-dependent DNA repair, recognizing and avoiding the permanence of double-stranded damage to the DNA molecule. Mutations or changes in BRCA-1 expression are related to the onset (hereditary or not) of breast, ovarian and prostate cancer. BRCA-1 has properties in inflammatory contexts, but little explored in macrophage biology. The aim of this study was to analyze the interference of knockdown expression of BRCA-1 on inflammatory mediators of RAW 264.7 macrophage differentiated to classical, alternative phenotypes as well as when exposed to conditioned medium of glioblastoma culture (CMC6). The silenced cells showed increased DNA fragmentation demonstrated by the comet assay; there was a cell cycle arrest in the G1 / S transition caused by LPS and CMC6 treatments and the silenced cells showed decreased survival after exposure. BRCA-1 knockdown attenuated LPS and CMC6-enhanced expression of TNF- α and IL-6 and pronounced the production of anti-inflammatory markers such as TGF- β and IL-10. LPS and conditioned medium of C6 glioma cell line (CMC6) treatments caused an increase in the number of autophagic cells and BRCA-1 low expression pronounced acridine orange incorporation, suggesting an increase of autophagy in these treatments, also observed in macrophages exposed to IL-4 when BRCA-1 is compromised

by siRNA. NF- κ B activity was abrogated in the silenced cells since LPS and CMC6 treatments stimulated its transcriptional activity. Molecular docking experiments show that the conservation of the BRCA-1 BRCT domain is important for the physical interaction between the protein and the NF- κ B p65 subunit, and that BRCA-1 mutations related to tumor incidence refrain formation of the BRCA-1-p65 complex, suggesting relevance to this interaction related to the loss of inflammatory capacity for differentiated macrophages. Immunocytochemistry assays showed that BRCA-1 expression decreased the presence of the NF- κ B p65 subunit in the nucleus of cells stimulated by LPS and CMC6, indicating a decrease of nuclear activity of p65. Our results reveal that constitutive expression of BRCA-1 in macrophages plays a central role in its activation by changing NF- κ B transcription factor-responsive pathways, and open perspectives for future investigations into the role of BRCA-1 that address not only the DNA repair and cell survival but also inflammatory response pathways of these phagocytes in inflammatory outcome as well as in situations of glial tumorigenesis.

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Macrófagos e o processo inflamatório	14
1.2 Desenvolvimento de macrófagos, polarização e suas vias de sinalização	15
1.3 Macrófagos associados a tumores.....	19
1.4 Papel e relevâncias biológicas da proteína BRCA-1	22
1.5 Justificativa	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos:.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Reagentes	28
3.2 Células	28
3.3 Silenciamento da proteína BRCA-1	29
3.4 Tratamentos	29
3.5 Ensaio cometa- dano ao DNA	30
3.6 <i>Western blot</i>	30
3.7 Quantificação dos mediadores inflamatórios.....	31
3.8 Zimografia.....	32
3.9 Ensaio de capacidade fagocítica	32
3.10 Ciclo celular	33
3.11 Sulforodamina B	33
3.12 Ensaio de gene repórter para NF-kB	34
3.13 <i>Docking</i> molecular BRCA-1/p65, análise estrutural, cálculo de interação energética e termoestabilidade	34
3.14 Imunocitoquímica.....	35
3.15 Marcação com laranja de acridina	36
3.16 Análises estatísticas	37
4. RESULTADOS	38

Capítulo I - Artigo publicado	38
Capítulo II - Resultado complementar	52
4.2.1 Incorporação de laranja de acridina	53
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	66
7. PERSPECTIVAS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICE A - LISTA DE PUBLICAÇÕES NO PERÍODO VIGENTE 2015-2019	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	18
Figura 2	20
Figura 3	54
Figura 4	67

LISTA DE ABREVIATURAS

LPS: Lipopolissacarídeo isolado de *E coli*

IL-x: interleucina de número “x”

CMC6: meio condicionado de linhagem C6 de glioma

BRCA-1: *Breast câncer-1*- proteína de suscetibilidade ao câncer de mama

siRNA: RNA de interferência

Scramble: siRNA controle para a transfecção

MMP-2/ MMP-9: Metaloproteinases de matriz extracelular 2 e 9

TGF- β : Fator de transformação do crescimento-beta

NF-kB: Fator de transcrição nuclear kappa-B

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

MAT: macrófagos associados a tumores

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

SRB: sulforodamina B

1. INTRODUÇÃO

1.1 Macrófagos e o processo inflamatório

A inflamação é uma resposta fisiológica de animais vertebrados que reagem a determinado insulto. É caracterizada através de diferentes sinais como inchaço, vasodilatação local, geração de calor, dor e até mesmo perda de função. O processo inflamatório é gerado normalmente contra insultos externos causados por diferentes fatores como infecções de micro-organismos patógenos, insulto físico/químico, reações alérgicas ou até mesmo por próprio descontrolo na comunicação entre as células imunes e o organismo. Após um estímulo pró-inflamatório ocorre uma rede multifatorial de sinalização celular envolvendo o sistema imune que controla o início, desenvolvimento e desfecho da inflamação em determinado local do organismo hospedeiro. A inflamação sempre começa com um processo local que, se não controlado, se estende a um estado crônico, levando a falência de órgãos e também à morte. O cenário inflamatório é caracterizado principalmente pelo recrutamento, proliferação e ativação de glóbulos brancos em nódulos linfáticos bem como no local do insulto (BRÜNE *et al.*, 2013).

Macrófagos fazem parte da diversidade de glóbulos brancos, chamados de fagócitos; estão distribuídos em praticamente todos os tecidos, principalmente nos conjuntivos adjacentes a epitélios, músculos e nervos. São células apresentadoras de antígenos que respondem a sinais exógenos e endógenos mudando seu perfil fenotípico de acordo com a situação inflamatória (MOSSER; EDWARDS, 2008). A atividade de macrófagos é peça importante para a homeostase tecidual, atuando na defesa do hospedeiro no

combate a infecções, reparo tecidual e também na regulação de células imunes adjacentes (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013).

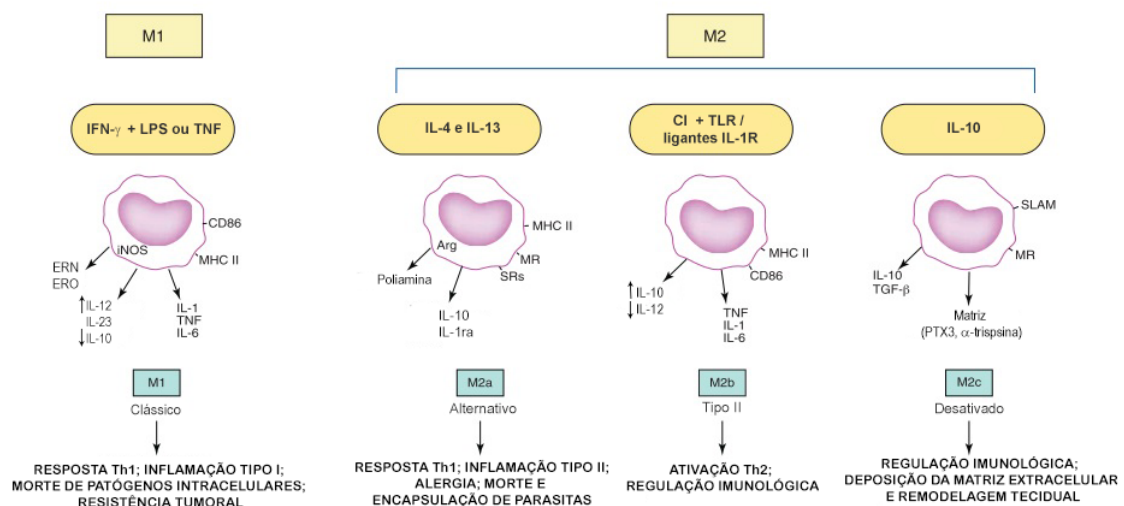
1.2 Desenvolvimento de macrófagos, polarização e suas vias de sinalização

Macrófagos são elementos do sistema imune inato e são derivados do sistema fagocítico mononuclear, apresentando seu desenvolvimento a partir de monócitos. Monócitos, por sua vez, se desenvolvem a partir de células tronco hematopoiéticas na medula óssea e migram, depois de maduras, para a corrente sanguínea- de onde serão recrutadas por tecidos periféricos. Entretanto, em vertebrados, alguns macrófagos podem ser formados por uma via hematopoiética paralela à embrionária, em que essas células são oriundas de precursoras mesenquimais presentes no saco vitelínico (POON *et al.*, 2017). Devido a tais diferenças, macrófagos podem exibir uma alta variedade morfológica e funcional. De acordo com a presença e funções em cada tecido, encontramos diferentes nomes para estas células: células de Kupffer (fígado), células de Langerhans e células dendríticas (conjuntivos), macrófagos alveolares (pulmões), osteoclastos (ossos) e microglia (sistema nervoso), os quais são designados como macrófagos residentes dos respectivos tecidos (BRÜNE *et al.*, 2013; WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013). A ativação de macrófagos influencia e é suscetível a outras atividades do sistema imunológico. Em 1986, Mosmann, Coffman e colaboradores propuseram a hipótese de que dois subconjuntos de células T auxiliares poderiam ser distinguidos pelas citocinas secretadas, mediando funções reguladoras e efetoras distintas, sendo classificadas como respostas Th1 e Th2 (MOSMANN *et al.*, 1986). O termo ativação de macrófagos (ativação clássica) foi introduzido

por Mackaness na década de 1960 em um contexto de infecção para descrever a atividade microbicida dependente de antígeno, mas não específica, de macrófagos em relação ao BCG (bacilo Calmette-Guerin) e *Listeria* após exposição secundária aos patógenos (MACKANESS, 1962). O refinamento dos resultados foi posteriormente associado às respostas Th1 e produção de IFN- γ pelas células imunes ativadas por antígenos (NATHAN *et al.*, 1983) se relacionando com propriedades citotóxicas e antitumorais (CELADA *et al.*, 1984; PACE *et al.*, 1983). Naquela época, o efeito sobre os macrófagos associados à imunidade Th2 dependente de IgE, e relacionado com defesa contra parasitas extracelulares e respostas alérgicas, ainda não estava claro. A descoberta de que o receptor de manose poderia ser estimulado por IL-4 e IL-13 levou Stein, Doyle e colaboradores a propor que estas citocinas fossem capazes de induzir um fenótipo de ativação alternativo, um estado completamente diferente da ativação de IFN- γ (DOYLE *et al.*, 1994; STEIN *et al.*, 1992). Por outro lado, Mills e colaboradores, enquanto investigavam os fatores que regulavam o metabolismo da arginina em macrófagos, descobriram que macrófagos ativados por mediadores Th1 e Th2 em cepas de camundongos diferiam qualitativamente em sua capacidade de responder aos estímulos clássicos (IFN- γ ou lipopolissacarídeo-LPS) e definiram uma importante diferença metabólica na via: os macrófagos M1 produzem o óxido nítrico tóxico (NO), enquanto os macrófagos M2 produzem as poliaminas tóxicas (MILLS *et al.*, 2000). Com isso, eles propuseram que estas fossem denominadas respostas de macrófagos M1 e M2, embora saibamos que este modelo lide mais com a predisposição de macrófagos para desenvolver fenótipos específicos. Mais recentemente, Mosser e Edwards apontam a

adição de outros marcadores centrais dos fenótipos M1 e M2- sendo também classificados como ativação clássica e alternativa de macrófagos (MOSSER; EDWARDS, 2008). Macrófagos M1 atuam como microbicidas e apresentam propriedades antitumorais por expressarem um aumento na produção e secreção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1, IL-6 e também uma acentuada geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Já macrófagos classificados como M2 expressam mediadores como a resistina-like- α (Fizz 1), arginase, chitinase 3-like 3 (Ym1), IL-10, TGF- β associados à expressão diminuída de IL-12, as quais são envolvidas no combate a parasitas, remodelação tecidual e progressão tumoral (GORDON; MARTINEZ, 2010). Ademais, macrófagos M1 e M2 podem ser convertidos um ao outro dependendo do estímulo gerado pelo microambiente em que estão inseridos (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013). Durante a polarização destas células, participam ativamente fatores de transcrição como STAT1/3 (OHMORI; HAMILTON, 1997), CREB (RUFFELL *et al.*, 2009), PPAR- γ (ODEGAARD *et al.*, 2007), NF- κ B (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011) e Nrf2 (BRÜNE *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2014), os quais medeiam a diferenciação e proliferação em diferentes etapas do processo inflamatório. Apesar do perfil alternativo de macrófagos M2 ser assim designado, é importante salientar que dentro deste espectro também é possível diferenciar, no mínimo, três populações com propriedades peculiares. Como mostrado na figura 1, de acordo com Mantovani e colaboradores (2004), classifica-se como M2a os macrófagos que são ativados por IL-4 (secretada por basófilos, mastócitos, os próprios macrófagos ou por células Th2 do sistema imune adaptativo) e assumem um fenótipo relacionado a participação em reações alérgicas,

progressão tumoral remodelagem tecidual e cicatrização. IL-4 estimula a expressão de citocinas anti-inflamatórias, entre elas a expressão da enzima arginase, a qual converte arginina em ornitina- mecanismo precursor importante na síntese de colágeno e de outras proteínas de matriz extracelular, contribuindo, portanto, para a síntese e secreção de proteínas de matriz extracelular (KREIDER *et al.*, 2007). O sub-tipo M2b abrange os macrófagos ativados por exposição a ligantes de receptores do tipo “toll” (TLR)- e complexos imunes, os quais apresentam propriedades regulatórias relacionadas ao perfil inflamatório Th2. Já o perfil M2c corresponde à ativação decorrente de estresse metabólico derivado principalmente da ação de IL-10, o qual retroalimenta a própria produção de IL-10 junto do estímulo à produção de TGF- β sendo relacionado com processos de remodelagem tecidual e imunossupressão (MANTOVANI *et al.*, 2004). Podemos perceber que os três sub-tipos induzem à produção de altos níveis de IL-10 e também diminuem a



expressão de IL-12 - relacionada à ativação clássica- evitando, desta forma, que o macrófago apresente propriedades pró-inflamatórias (LIU *et al.*, 2014).

Figura 1: Marcadores dos perfis M1 e M2 de macrófagos.

Adaptada do trabalho de Mantovani e colaboradores que propuseram um modelo de perfis inflamatórios de macrófagos M1/M2, nos quais M1 inclui ativação por interferon gama (IFN- γ) + lipopolissacarídeo (LPS) ou fator de necrose tumoral (TNF- α) e o perfil M2 é subdividido para agrupar semelhanças e diferenças entre interleucinas- 4 (IL-4) (M2a), complexos imunes + ligantes de receptores do tipo Toll (TLR) (M2b) e IL-10 e glicocorticóides (M2c) (MANTOVANI *et al.*, 2004).

Atualmente, novas considerações mostram relevância e revisam os termos M1 e M2 substituindo a polarização por um espectro de ativação. Dessa forma, a intenção é obter maior clareza sobre os achados e também padronizar as classificações sobre macrófagos, pois muitos dos resultados já obtidos podem ser limitados às características das amostras utilizadas pelos autores, não sendo capazes de se relacionar com estudos paralelos. Como mostrado na figura 2, estudos recentes destacam a importância de se considerar, nas futuras classificações destes fagócitos, um conjunto de padrões baseados em três princípios - a fonte de macrófagos, a definição dos ativadores e uma coleção consensual de marcadores para descrever o tipo de ativação – os quais podem ser mais relevantes para se relacionar com diversos cenários experimentais (MARTINEZ; GORDON, 2014; MURRAY *et al.*, 2014).

1.3 Macrófagos associados a tumores

O papel das células imunes em patologias tumorais possui um amplo espectro de observação, sendo muitas vezes controverso e tendo várias interpretações. Apesar disso, alguns conceitos e observações são bem aceitos e utilizados como ferramentas em diagnósticos e tratamentos. Macrófagos são

considerados as células imunes de maior abundância em diferentes tipos de tumores (MANTOVANI *et al.*, 2002).

	M(IL-4)	M(Ic)	M(IL-10)	M(GC+TGFβ)	M(GC)	M(-)	M(LPS)	M(LPS+IFNγ)	M(IFNγ)
Fatores de transcrição	Camundongo pSTAT6 +++ pSTAT1 -ve <i>Irf4, Socs2</i>		pSTAT3 + <i>Nfil3</i> <i>Sbno2, Socs3</i>				pSTAT1 + pSTAT6 -ve <i>Socs1, Nfkbiz</i>	pSTAT1 + pSTAT6 -ve <i>Socs1, Nfkbiz, Irf5</i>	pSTAT1 +++ <i>Socs1</i>
Proteínas SOCS	Humano <i>IRF4, SOCS1*, GATA3*</i>		<i>SOCS3</i>	<i>ID3, RGS1</i> pSMAD2 +			<i>IRF5</i>	pSTAT1 +++ <i>IRF5, IRF1</i>	pSTAT1 +++ <i>IRF5</i>
Citocinas	Camundongo	<i>Il10, Il6</i>	<i>Il10</i>				<i>Tnf, Il6, Il27</i>	<i>Tnf, Il6, Il27, Il23a, Il12a</i>	
	Humano						<i>TNF, IL6, IL18</i>	<i>TNF, IL6, IL18, IL12A, IL12B, IL23A</i>	
Quimiocinas	Camundongo <i>Ccl17, Ccl24</i> <i>Ccl22</i>	<i>Cxcl13, Ccl1</i> <i>Ccl20</i>							
	Humano <i>CCL4*, CCL13*</i> <i>CCL17, CCL18</i>						<i>CXCL10, IL8</i>	<i>CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11</i>	<i>CCL18 -ve</i>
Receptores de varredura	Camundongo						<i>Marco</i>	<i>Marco</i>	
	Humano <i>MRC1*, STAB1</i> <i>MARCO -ve</i> <i>CD163 -ve</i>			<i>CD163, STAB1, MARCO</i>					
Proteínas de matriz extracelular	Camundongo								
	Humano <i>FN, TGFB1, MMP1, MMP12, TG, F13A1*</i>			<i>F13A1+</i> Negative for markers in M(IL4)			<i>MMP9</i>		
Metabolismo de aminoácidos	Camundongo <i>Arg1 +++</i>	<i>Nos2</i>					<i>Arg1+, Nos2+</i>	<i>Arg1+, Nos2 +++</i>	<i>Ido1, Nos2 +++</i>
	Humano						<i>IDO1, KYNU</i>	<i>IDO1, KYNU</i>	
Outros mediadores	Camundongo <i>Retna, Chi3l3</i> <i>Alox15</i>	<i>Retna -ve</i>	<i>Il4ra</i>						
	Humano <i>TGM2*, ADORA3, TGFB2 -ve, IL17RB, ALOX15*, CD200R*</i>	<i>IL4RA</i>		<i>TGFBR2++</i> <i>ALOX5AP, IL17RB</i>	<i>TGFBR2++</i> <i>ADORA3,</i>		<i>PTX3</i>	<i>GBP1, CCR7, CD40</i>	

Figura 2: Rede de mediadores estimulados pela diferenciação de macrófagos. Na imagem adaptada são mostradas subdivisões funcionais de acordo com o estímulo de macrófagos de camundongo ou macrófagos gerados a partir de monócitos humanos com o conceito de espectro M1-M2 já existente. As condições de estímulo consideradas são: IL-4, complexos imunes (Ic), IL-10, glicocorticóides (GC) + TGF-β, glicocorticóides isolados; LPS, LPS + IFN-γ e IFN-γ isoladamente. Os dados dos marcadores foram extraídos de uma gama de dados publicados os quais foram compilados nesta revisão (MURRAY *et al.*, 2014).

Diferentes trabalhos mostram a importância de ações pró e anti-inflamatórias geradas por macrófagos como elementos importantes na geração e progressão tumoral (LI *et al.*, 2017; MOSSER; EDWARDS, 2008; POON *et al.*, 2017), e uma incidência de alta densidade de macrófagos no ambiente tumoral é diretamente relacionado com mau prognóstico. A medida que o tumor se desenvolve e se estabelece, as células já transformadas respondem positivamente com macrófagos que, em um primeiro momento, geram um status pró-inflamatório e mostram assim um grande potencial em contribuir com o crescimento tumoral no início da neoplasia, principalmente pela alta produção de ERO, as quais são relacionadas com o combate antitumoral, mas acabam causando danos cumulativos nas bases nitrogenadas do DNA das células já transformadas. Isto causa mutações, culminando na progressão em número de células tumorais no organismo. Por outro lado, com o crescimento da massa tumoral, as células transformadas se tornam capazes de influenciar os macrófagos associados que compõem o microambiente; os macrófagos saem do perfil pró-inflamatório e adotam um perfil muito relacionado com o tipo regulatório (POLLARD, 2008). O desenvolvimento das células tumorais cria um microambiente composto por uma série de fatores como hipóxia, secreção de prostaglandinas, corpos apoptóticos e imunoglobulinas que alteram a atividade de macrófagos. Assim, como consequência, tem-se um ambiente imunossupressor que proporciona crescimento, angiogênese e invasividade tumoral (LIN *et al.*, 2006). Apesar da caracterização dos macrófagos associados a tumores ainda não ser estabelecida, a alta produção de IL-10 acompanhada da inibição da expressão de IL-12 são fatores encontrados em diferentes estudos (BISWAS *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2006). A alteração na

atividade de NF- κ B tem sido proposta como um fator central na resposta inflamatória de macrófagos relacionada a tumores. O estímulo inicial é gerado por ligantes de receptores “toll-like”, que culminam na degradação de I κ B, proteína citosólica que ancora NF- κ B, o qual, por sua vez, é translocado para o núcleo e ativa seus genes responsivos. A ativação da subunidade p65 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, iNOS, TNF- α e IL-6 (BISWAS; LEWIS, 2010; MANCINO; LAWRENCE, 2010). Por sua vez, autores mostram que macrófagos associados a tumores (MAT) apresentam baixa atividade pró-inflamatória diretamente relacionada à diminuição da ativação deste fator de transcrição; paralelamente, quando NF- κ B está ativo, MAT retomam sua atividade pró-inflamatória e antitumoral (CHANG *et al.*, 2013a).

1.4 Papel e relevâncias biológicas da proteína BRCA-1

O genoma celular é altamente vulnerável a insultos causados por agentes oxidantes e radiação. O DNA, uma vez danificado, causa um desequilíbrio da homeostase, podendo levar à morte celular e até mesmo à formação de neoplasias. Nesse sentido, o sistema de reparo ao DNA é fundamental no funcionamento da célula, pois além de reparar danos nas bases nitrogenadas, também regula a expressão e atividade de mediadores do ciclo celular relacionados à proliferação e diferenciação (SCULLY; LIVINGSTON, 2000). A proteína BRCA-1 (BReast CAncer-1) é envolvida no reparo de DNA e atua sobre o mecanismo de reparo dependente de recombinação homóloga, sendo responsável por reconhecer e evitar a permanência de danos de fita dupla na molécula de DNA. Mutações ou mudanças na expressão de BRCA-1 são altamente relacionadas com o

surgimento (hereditário ou não) de câncer de mama, ovário e próstata (MIKI *et al.*, 1994; THOMPSON; EASTON, 2002). Atualmente, a função de BRCA-1 tem sido explorada em situações paralelas ao reparo de DNA, como a manutenção da estrutura de heterocromatina (ZHU *et al.*, 2011), regulação de expressão de microRNAs (CHANG *et al.*, 2011) e controle de estresse oxidativo (VURUSANER; POLI; BASAGA, 2012). A expressão elevada de BRCA-1 em células de câncer de mama aumenta a expressão de genes antioxidantes e diminui dano ao DNA e morte celular quando desafiadas com H₂O₂ (BAE *et al.*, 2004). Em situações de choque séptico, a superexpressão de BRCA-1 em camundongos mostra-se como peça essencial na melhora da resposta inflamatória, impedindo a disfunção cardíaca e conferindo menor letalidade aos animais pós punção de ligadura cecal (CLP) (TEOH *et al.*, 2013). Além disso, células periféricas mononucleares isoladas de mulheres com câncer de mama e/ou saudáveis com BRCA-1 mutado, apresentam deficiências na produção de TNF- α quando desafiadas por LPS *in vitro* (ZIELINSKI *et al.*, 2003). Sabe-se também que mulheres mutantes em BRCA-1 entram na menopausa mais precocemente (FINCH *et al.*, 2013) podendo ser também mais propensas à incidência de acidentes cardiovasculares e tumores (ARTS-DE JONG *et al.*, 2014).

1.5 Justificativa

A relação entre as funções de BRCA-1 e respostas celulares tem ganhado enfoque no meio científico, inclusive em pesquisas envolvendo câncer e sistema imunológico. Autores propõem que diferentes proteínas são capazes de apresentar possíveis interações com BRCA-1 levando a diferentes

desfechos biológicos. Nesse sentido, fatores de transcrição com Nrf2 e NF-κB mostram maior atividade transcricional quando BRCA-1 está presente com sua genética e estrutural preservada- sem mutações germinativas, por exemplo. Amostras nucleares de células epiteliais de câncer de mama mostram que BRCA-1 interage fisicamente com Nrf2, promovendo uma maior estabilização do fator de transcrição e sua atividade genômica (GORRINI *et al.*, 2013). BRCA-1 também pode apresentar um papel importante na transcrição de genes responsivos à NF-κB, sendo considerado peça chave na permanência da subunidade p65 no núcleo e assim regulando vias de sobrevivência e morte celular dependentes de NF-κB e derivadas de insultos inflamatórios (BENEZRA *et al.*, 2003). Por outro lado, a ativação de NF-κB pode ter desfecho importante nas funções de reparo genômico dependente de BRCA-1, atuando de maneira direta na reconstituição de danos de fita dupla (VOLCIC *et al.*, 2012). Considerando que a ativação/inibição de NF-κB é peça chave na biologia de macrófagos durante situações inflamatórias, uma investigação sobre os desdobramentos de sua atividade e possíveis interações com proteínas nucleares relacionadas a reparo, como BRCA-1, torna-se um relevante ponto de investigação científica.

A plasticidade dos macrófagos é um elemento importante nas respostas imunes e adaptativas do organismo em situações de inflamação elevada como sepse e câncer- citadas anteriormente. No primeiro caso, o controle do ambiente inflamatório é crucial para a sobrevivência do organismo. Já no caso de macrófagos associados a tumores (MAT), a heterogeneidade fenotípica é uma característica imposta no ambiente tumoral. No início, MAT são recrutados e secretam citocinas pró-inflamatórias que, ao invés de combater,

proporcionam um ambiente de crescimento para células transformadas (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002). Em um estágio mais tardio, MAT são convertidos ao fenótipo M2, e essa mudança é diretamente relacionada à oscilação das vias dependentes de NF- κ B (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011). Nessa fase, os macrófagos favorecem a invasão tumoral por reduzir a imunidade do tecido invadido. Portanto, o conhecimento de mecanismos subjacentes dos fenótipos M1/M2 durante situações que requerem equilíbrio entre o estado pró e anti-inflamatório torna-se um excelente alvo de estudo para o desenvolvimento de terapias imunes centradas na biologia de macrófagos. Adicionalmente, BRCA-1 mostra-se determinante não só na conservação das bases do DNA durante insultos, mas também em vias celulares paralelas ao reparo de DNA, uma vez que a proteína apresenta grande capacidade de interação com outras proteínas relacionadas a processos neoplásicos e inflamatórios/imunológicos. Portanto, estudos com abordagem na plasticidade funcional de BRCA-1 sobre a polarização de macrófagos tornam-se relevantes e podem ser aplicados em diferentes contextos fisiopatológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é analisar o papel da proteína BRCA-1 no perfil inflamatório e funcional de macrófagos submetidos à diferenciação clássica e alternativa bem como quando expostos a meio condicionado de tumores.

2.2 Objetivos específicos:

- 1) Validar, por PCR real time e *western blot*, a expressão e imunoconteúdo de BRCA-1 em macrófagos da linhagem RAW 264.7 bem como testar se a metodologia utilizando RNA interferente (siRNA) escolhida é efetiva em diminuir expressão proteína nestas células;
- 2) Observar se a expressão, uma vez que diminuída, de BRCA-1 é capaz de comprometer o sistema de reparo de DNA das células RAW 264.7 após serem expostas a LPS, IL-4 e meio condicionado de gliomas (CMC6);
- 3) Avaliar parâmetros de ciclo e viabilidade celular em macrófagos deficientes na expressão de BRCA-1 quando expostos aos tratamentos mencionados acima;

- 4) Analisar a expressão celular e a secreção no meio de cultura de citocinas inflamatórias produzidas por macrófagos transfectados com siRNA para BRCA-1 bem como a atividade fagocítica e a secreção de metaloproteinases após a exposição a LPS, IL-4 e meio condicionado de gliomas (CMC6)
- 5) Analisar a atividade do fator de transcrição NF- κ B em macrófagos RAW 264.7 quando a expressão de BRCA-1 está comprometida após os tratamentos com LPS, IL-4 e CMC6, além de avaliar a possibilidade de interação física da subunidade p65 com a proteína BRCA-1 pela técnica de “*docking*” molecular.
- 6) Quantificar através da técnica de imunocitoquímica a marcação nuclear da subunidade p65 de NF- κ B no modelo *in vitro* acima mencionado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

O lipopolissacarídeo de isolado de *E. coli* (Cat.: L2630), Interleucina-4 (Cat.: I1020), Sulforodamina B (Cat.: S1402), Kits de ELISA para TNF- α (Cat.: RAB 0477), Interleucina-6 (Cat.: RAB 0308) e Interleucina-10 (Cat.: RAB 0245), iodeto de propídio e laranja de acridina foram comprados da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA). Os materiais para eletroforese e imunoblot foram adquiridos com Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). Inibidor de protease foi adquirido da Roche (Welwyn Garden city, UK). Anti- β -actina e anti-IgG acoplados com peroxidases isolados de plasma de coelhos ou camundongos foram adquiridos da Cell signaling, EUA. siRNA para BRCA-1 (cat.: SC-29824) e anti-BRCA-1 (cat.: SC-135731) foram comprados da Santa Cruz Biotechnology.

3.2 Células

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 e a linhagem C6 de glioblastoma foram adquiridas através do banco de células do Rio de Janeiro, Brasil. Macrófagos foram cultivados em meio DMEM com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino e coquetel de antibióticos (Gibco BRL, Carlsbad, EUA), e mantidos em estufa com 5% de CO₂ com temperatura (37°C) e umidade controladas. Células da linhagem C6 foram cultivadas em meio DMEM com baixa quantidade de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino nas mesmas condições de incubação citadas acima. As células foram usadas por no máximo 30 passagens.

3.3 Silenciamento da proteína BRCA-1

A expressão de BRCA-1 foi atenuada através do ensaio de “silenciamento” por RNA interferente (siRNA). As células foram incubadas em meio OPTI-MEM contendo agente transfectante RNA iMax (Invitrogen) e oligonucleotídeos de siRNA resistentes à degradação por nucleases (siRNA) específicos para BRCA-1 na concentração de 50nM por 24 horas. O silenciamento foi validado por *western blot* e *polimerase chain reaction* (PCR). A amplificação foi feita através de PCR *real time* com *primers* específicos produzidos pela Sigma Aldrich: BRCA-1 (F: GGGCCTTCACAATGTCCTTT; R: GCCATTATTCTCAGCAGCTCTT). Os níveis de mRNA para BRCA-1 foram quantificados 24 horas pós-transfecção e seu imunoconteúdo foi quantificado por *western blot* pós transfecção e no final dos tratamentos.

3.4 Tratamentos

As células RAW 264.7 foram estimuladas com LPS, IL-4 ou com meio condicionado de gliomas (CMC6) a fim de gerar macrófagos por via clássica (M1), alternativa (M2) e também simular a situação quando macrófagos estão associados a tumores. Basicamente, as células foram submetidas à transfecção de siRNA para BRCA-1 e cultivadas por 24h. Em seguida, foram adicionados LPS (1µg/mL), IL-4 (20ng/mL) e CMC6 na proporção de 2:1 com meio DMEM virgem com soro na concentração de 1% por mais 24 horas. Após o tratamento, as células e o meio de cultura foram coletados para posteriores análises. Para a obtenção do meio condicionado (CMC6), células da linhagem C6 foram semeadas em confluência de 50-70% e cultivadas em meio DMEM

com alta concentração de glicose e 1% de soro por 24h. A partir disso, o meio condicionado foi centrifugado a 1000 x g/5 minutos, coletado e utilizado no tratamento das células RAW 264.7.

3.5 Ensaio cometa- dano ao DNA

Para o ensaio, as células foram coletadas e solubilizadas em meio de agarose *low melting* (0,75%) e adicionadas em lâminas cobertas por lamínulas contendo 1,5% de agarose. As lâminas foram colocadas em tampão de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100mM e Tris 10mM, pH=10,5, Triton X-100 plus 1% e DMSO 10%) por 12 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas passaram por uma eletroforese de 20 minutos a 25V, foram neutralizadas com Tris-base 400mM e lavadas com água destilada. A marcação foi feita com SYBR Green e a análise feita em microscópio de fluorescência. Cem células por amostra foram analisadas pelo tamanho da cauda de DNA como índice de dano, variando de 1 a 4. O índice de dano foi calculado da seguinte maneira: $CI = [(n^{\circ} \text{tipo} 1) \times 1 + (n^{\circ} \text{tipo} 2) \times 2 + (n^{\circ} \text{tipo} 3) \times 3 + (n^{\circ} \text{tipo} 4) \times 4]$, onde “n°tipo” é a quantidade de graus de dano ao DNA apresentado pela amostra.

3.6 Western blot

As células foram lisadas com tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH=6,8, 1% SDS e 10% glicerol) e quantidades equivalentes de proteína foram fracionadas por eletroforese com gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A eficiência da transferência foi feita utilizando a

marcação com Ponceau S e a membrana foi lavada 5x com tampão Tween-Tris (TTBS: 100mM Tris-HCl, pH=7,5 contendo 0,9% de salina e 0,1% de Twenn-20) e bloqueada com albumina a 5% diluída em TTBS. Em seguida as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (diluição de 1:1000) a 4°C por 15 horas. As membranas foram novamente lavadas com TTBS e incubadas com anticorpos secundários anti- IgG contendo peroxidase por mais 2 horas (diluição 1:3000), lavadas e a quimioluminescência foi quantificada com o kit ECL plus. As densitometrias das bandas foram quantificadas e analisadas com o *software* Image J.

3.7 Quantificação dos mediadores inflamatórios

3.7.1 Liberação de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) no meio de cultura pela técnica de ELISA (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; KAPCZINSKI *et al.*, 2011). O procedimento da técnica foi desenvolvido de acordo com o protocolo oferecido pelo fabricante.

3.7.2 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativo *real time*: o RNA das células foi extraído usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Aproximadamente 1 μ g de RNA de cada amostra foi submetida à síntese de cDNA com o uso do “kit SuperScript-II RT pre-amplification system” (Invitrogen). A amplificação através de PCR *real time* foi feita com *primers* específicos produzidos pela Sigma Aldrich: TNF- α (F: AGACCCTCACACTCAGATCA; R: CTGGGAGTAGACAAGGTACAAC), IL-6 (F: GGCCTTCCCTACTTCACAAG; R: TTCCACGATTTCCCAGAGAAC), TGF- β 1 (F: CCTGAGTGGCTGTCTTTTGA; R: CGTGGAGTTTGTTATCTTTGCTG). As

amostras foram analisadas em um termociclador (Applied-Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). As condições de preparação das amostras foram feitas de acordo com prévios estudos do nosso grupo de pesquisa (PASQUALI *et al.*, 2008). A quantificação da expressão gênica foi feita em relação ao gene endógeno GNB2L (F: GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG; R: CTTGCAGTTAGCCAGGTTC).

3.8 Zimografia

Ao término dos tratamentos, os meios foram removidos e foi adicionado meio DMEM virgem por 6h nas células e então foi coletado para ser efetuado o ensaio de zimografia. Basicamente, os meios de cultura foram centrifugados (1000 *xg*/5 minutos) e submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 8% contendo 0,2% de gelatina na ausência de agente redutor. Após a eletroforese, o gel foi lavado 3 vezes de 30 minutos em Triton X-100 2,5% para remoção do SDS. Em seguida o gel foi incubado por 36 horas a 37°C em tampão de reação (50mM Tris-base, NaCl 150mM, ZnCl₂ 1mM, azida sódica 0.02%, CaCl₂ 10mM, pH=8). Nessas condições, as metaloproteinases MMP-2 e 9 são renaturadas e retomam a atividade de collagenases. O gel é corado com Comassie blue 0,1% e a atividades são representadas por bandas claras - resultantes da degradação da gelatina. As bandas foram quantificadas pelo *software* ImageJ.

3.9 Ensaio de capacidade fagocítica

O processo de fagocitose pode ser quantificado em macrófagos usando biopartículas de *E. coli* marcadas com sondas fluorescentes. Quando

internalizadas pelos macrófagos, as partículas emitem fluorescência que pode ser quantificada. Para tal, as células passaram pela transfecção seguida dos tratamentos de 24 horas e foram submetidas ao ensaio de fagocitose com o “Vybrant Phagocytosis Assay Kit” (Eugene, EUA). Os procedimentos foram executados de acordo com as instruções fornecidas pelo protocolo do ensaio. As fluorescências foram quantificadas em um espectrofotômetro de fluorescência (i5 Softmax- Molecular Devices, EUA).

3.10 Ciclo celular

As células foram submetidas aos tratamentos seguidos do procedimento de siRNA para BRCA-1, raspadas, centrifugadas e suspendidas em tampão de lise (10mM PBS, 0,1% v/v Nonidet P-40, 1,2 mg/mL spermina, 5 µg/mL RNase, e 2,5 µg/mL iodeto de propídeo, pH 7,4). As amostras foram mantidas em gelo por 10 minutos. O conteúdo de DNA foi determinado por citometria de fluxo com uso do aparelho FACSCalibur e quantificado pelo *software* CellQuest (BD Biosciences, San Jose, EUA).

3.11 Sulforodamina B

O ensaio foi utilizado a fim de avaliar a capacidade dos tratamentos interferirem no crescimento celular. As células foram silenciadas e tratadas em placas de 96 poços. Após os tratamentos as células foram fixadas com ácido tricloroacético 10% por 60 minutos a 4°C. As placas foram lavadas 5 vezes com água destilada em baixa temperatura. O excesso de água foi decantado e as placas foram secas a temperatura ambiente. Foi adicionado 100 µL de SRB

(0,4% em 1% ácido acético) em contato com as células por 30 minutos. As células foram lavadas até o momento em que somente restassem as células marcadas com SRB nos poços. As placas foram, novamente, secas e em seguida adicionado Tris-base 10 mM nos poços e as células marcadas solubilizadas. A absorbância, quantificada em 492nm, é proporcional a quantidade de proteínas celulares de cada amostra.

3.12 Ensaio de gene repórter para NF-κB

Células foram plaqueadas em placas de 96 poços com confluência de 5×10^3 células por poço e mantidas por 24 horas prévias à transfecção. As células foram co-transfectadas com a mistura de 100 ng do plasmídeo contendo luciferase ligada a elemento responsivo para Nf-KB (pGL4.32 Luc2P-NF-κB® Promega) e 10ng do plasmídeo luciferase-*rennilla* (p-RL-TK® Promega). Os tratamentos foram feitos e após 3h foram quantificadas as atividades com o “kit Dual-Glo®” (Promega). As células também foram transfectadas com vetor para proteína GFP para monitorar a eficiência do procedimento.

3.13 *Docking* molecular BRCA-1/p65, análise estrutural, cálculo de interação energética e termoestabilidade

As estruturas resolvidas com identificação PBD 1T15 (CLAPPERTON *et al.*, 2004), 1T29 (SHIOZAKI *et al.*, 2004) e 4Y18 (WU *et al.*, 2016) foram utilizadas como receptores nos cálculos de *docking* molecular, correspondendo à estrutura da proteína BRCA-1 humana. A estrutura proteica resolvida com

PDB ID 2I9T(ESCALANTE *et al.*, 2002) (chain A) foi usada como ligante, representando a proteína p65 de origem humana. A diversidade das resoluções de *docking* foi incrementada com o uso de 3 representações diferentes da estrutura de BRCA-1 obtidas pelo *software* PIPER via ClusPro 2.0(COMEAU *et al.*, 2004; KOZAKOV *et al.*, 2006). Todas as modelagens foram feitas livre de restrições: sem escolha de pontos de partida na superfície de BRCA-1, permitindo que p65 buscasse o sítio mais adequado para a interação. Os resultados foram agrupados por seus respectivos resultados e submetidos a análise de interação proteína-proteína pelo *software* FoldX (SCHYMKOWITZ *et al.*, 2005).

Mutações em BRCA-1 sobre a termoestabilidade do complexo BRCA-1-p65: O cálculo de energia relacionado a mutações foi utilizado para medir o efeito de mutações pontuais na afinidade de ligação do complexo BRCA-1 com p65. Mutagêneses foram aplicadas usando Pssm command of FoldX, o qual modifica aminoácidos na estrutura da proteína por alaninas. A estabilidade do complexo foi calculada pelo programa FoldX e o valor de $\Delta\Delta G$ foi estimado pela subtração da interação encontrada com a proteína em sua forma nativa da encontrada na proteína mutada. Valores foram interpretados de acordo com Frappier *et al* (FRAPPIER; CHARTIER; NAJMANOVICH, 2015; FRAPPIER; NAJMANOVICH, 2014).

3.14 Imunocitoquímica

A técnica de imunocitoquímica foi utilizada a fim de investigar a imunolocalização de BRCA-1 e p65 após a ativação de macrófagos na

presença ou ausência de BRCA-1. Resumidamente, células da linhagem RAW 264.7 foram semeadas em placas de 24 poços (80.000 células / poço) e transfectadas com 50 nM de BRCA-1 ou controle (*scramble*) de siRNA. Após 24 horas, foram estimuladas com LPS (1µg / mL) ou CMC6 por 1 hora. As células foram então fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos, bloqueadas em T-PBS (0,5% Tween-20) contendo 5% de albumina sérica bovina (BSA) por 1 hora, diluídas em solução salina a 0,5% de tampão Tween-20 / fosfato (T-PBS), seguido de permeabilização com PBS contendo 0,1% de Triton X-100 por 30 min. As células foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpos primários para BRCA-1 (Santa Cruz SC-646) e p65 (Cell Signaling # 6956), ambos com uma diluição de 1: 500. Após 3 lavagens de 10 minutos, incubaram-se os anticorpos secundários conjugados Alexa Fluor 488/555 (Invitrogen) durante 2 horas à temperatura ambiente. As células foram cobertas com meio de montagem contendo 70% de glicerol e DAPI (Invitrogen). As imagens de fluorescência foram obtidas por microscopia óptica com o aparelho EVOS® FL (AMAFD1000 - Thermo Fisher Scientific; MA, EUA). As análises de densitometria foram realizadas com o *software* ImageJ®. Os dados foram calculados em comparação com o grupo controle e expressas como unidades arbitrárias.

3.15 Marcação com laranja de acridina

O corante laranja de acridina é capaz de atravessar a membrana da célula e, quando presente no citoplasma, emite luz laranja, que em pH ácido é reduzido e emite luz verde. A emissão de luz verde indica a presença de vesículas autofágicas ácidas, que estão relacionadas ao processo de autofagia. Para esta análise, as células tratadas foram raspadas e suspendidas em PBS

contendo acridina a 1 μ M por 15 minutos. Após, as fluorescências foram detectadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur. As células positivas para acridina foram quantificadas pelo *software* CellQuest (BD biosciences, San Jose, EUA).

3.16 Análises estatísticas

Os resultados estão representados por média \pm erro padrão com significância de $p < 0,05$. A análise estatística foi feita por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey entre todos os grupos de tratamento ou por teste $-t$ de Student entre o mesmo tratamento com expressão constitutiva e com silenciamento de BRCA-1.

4. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão inseridos em dois capítulos: Capítulo I, sob a forma de artigo científico aceito para publicação; Capítulo II, resultado complementar ao artigo, porém não anexado na publicação.

Capítulo I - Artigo publicado

Artigo anexado, intitulado ***“BRCA-1 depletion impairs pro-inflammatory polarization and activation of RAW 264.7 macrophages in a NF- κ B-dependent mechanism”***- publicado em 2019 no periódico científico ***Molecular and Cellular Biochemistry***.



BRCA-1 depletion impairs pro-inflammatory polarization and activation of RAW 264.7 macrophages in a NF- κ B-dependent mechanism

Maurilio da Silva Morrone¹ · Nauana Somensi¹ · Lucas Franz¹ · Vitor de Miranda Ramos¹ · Juciano Gasparotto^{1,3} · Helen Taís da Rosa¹ · Marcelo Sartori¹ · Fabrício Figueiró¹ · Daniel Pens Gelain¹ · Alfeu Zanotto-Filho² · José Cláudio Fonseca Moreira¹

Received: 24 May 2019 / Accepted: 8 August 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

BRCA-1 is a nuclear protein involved in DNA repair, transcriptional regulation, and cell cycle control. Its involvement in other cellular processes has been described. Here, we aimed to investigate the role of BRCA-1 in macrophages M(LPS), M(IL-4), and tumor cell-induced differentiation. We used siRNAs to knockdown BRCA-1 in RAW 264.7 macrophages exposed to LPS, IL-4, and C6 glioma cells conditioned medium (CMC6), and evaluated macrophage differentiation markers and functional phagocytic activity as well as DNA damage and cell survival in the presence and absence of BRCA-1. LPS and CMC6, but not by IL-4, increased DNA damage in macrophages, and this effect was more pronounced in BRCA-1-depleted cells, including M(IL-4). BRCA-1 depletion impaired expression of pro-inflammatory cytokines, *TNF- α* and *IL-6*, and reduced the phagocytic activity of macrophages in response to LPS. In CMC6-induced differentiation, BRCA-1 knockdown inhibited *TNF- α* and *IL-6* expression which was accompanied by upregulation of the anti-inflammatory markers IL-10 and *TGF- β* and reduced phagocytosis. In contrast, M(IL-4) phenotype was not affected by BRCA-1 status. Molecular docking predicted that the conserved BRCA-1 domain BRCT can interact with the p65 subunit of NF- κ B. Immunofluorescence assays showed that BRCA-1 and p65 co-localize in the nucleus of LPS-treated macrophages and reporter gene assay showed that depletion of BRCA-1 decreased LPS and CMC6-induced NF- κ B transactivation. IL-4 had no effect upon NF- κ B. Taken together, our findings suggest a role of BRCA-1 in macrophage differentiation and phagocytosis induced by LPS and tumor cells secretoma, but not IL-4, in a mechanism associated with inhibition of NF- κ B.

Keywords BRCA-1 · Inflammation · M(LPS) and M(IL-4) polarization · Macrophage activation

Abbreviations

BRCA-1	Breast cancer-1 protein
CMC6	Conditioned medium from C6 cells
LPS	Lipopolysaccharide from <i>E. coli</i>
IL-4	Interleukin-4

✉ Maurilio da Silva Morrone
maurilio.bio@gmail.com

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Estudos de Estresse Oxidativo, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 – Anexo Depto. Bioquímica, Lab 32, Porto Alegre, RS CEP 90035-003, Brazil

² Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer, Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

³ Laboratorio de Toxicología Ambiental, Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, Universidad de la Costa, Calle 58 #55-66, 080002 Barranquilla, Atlántico, Colombia

Introduction

Macrophages are important innate immune cells present in virtually all tissues. They are sensitive to numerous stimuli and play a key role not only during infections and injuries, but also in other physiological and pathological conditions such as tissue regeneration, metabolic stress, and cancer progression [1]. Depending on the inflammatory stimuli, macrophages can assume different phenotypes which are typically grouped into classical or alternative

profiles. Classical activation is stimulated by toxic substances from microbial agents such as LPS (lipopolysaccharide) as well as cytokines derived from T helper cell type 1 (Th1 cells), and interferon γ (IFN- γ). This subtype is associated with an increased production of pro-inflammatory cytokines, namely TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-12, which are involved in cytotoxic responses [2, 3]. On the other hand, alternative macrophages are typically induced by Th2 cytokines (IL-4 and/or IL-13), and are characterized by anti-inflammatory, immune suppressive, and tissue repair responses [4]. For instance, IL-4 stimulates the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, TGF- β , and IL-1R antagonists and inhibits the production of pro-inflammatory cytokines [5–8].

In the tumor microenvironment, cancer cells have been shown to suppress immune responses through upregulation of anti-inflammatory cytokines [9–11] and downregulation of antigen presentation [12], causing an expansion of immunosuppressive cells such as regulatory T cells [9]. In addition to T cells, there is growing evidence that tumor-associated macrophages (TAM) may also exert anti- or pro-tumoral roles depending on the phenotype they acquire once they are recruited into the tumor site. In the classical phenotype, macrophages participate in tumor surveillance and eradication. However, a significant population of TAM is characterized by an anti-inflammatory phenotype, which seems to be pivotal for tumors to succeed. At a gene expression and proteomics level, TAM differs from alternative phenotype obtained *in vitro*, although it retains expression of several anti-inflammatory markers such as high IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , and low IL-12 [13, 14]. TAM shows an impaired capacity to scavenge cancer cells and may promote tumor progression via secretion of soluble factors, such as cytokines [15, 16].

BRCA-1 is a nuclear protein involved in DNA repair, transcriptional regulation, ubiquitination, and cell cycle control [17]. Germinal mutations in BRCA-1 are associated with early onset breast and ovarian cancers, which is attributed to genomic instability caused by impaired homologous recombination (HR) repair in BRCA-1 patients [18, 19]. However, novel functions for BRCA-1 have been described. Some studies have reported a role for BRCA-1 in antioxidant [20] and immune responses in sepsis [21]. BRCA-1 germinal mutation also seems to be associated with unbalanced cytokine production in peripheral blood mononuclear cells [22]. In addition, BRCA-1 can bind to transcription factors, such as p53, ATF1, STAT-1 and the Jun family of proteins, thereby modulating transcription [23–26]. Previous studies also have demonstrated that BRCA-1 can physically interact with the NF- κ B subunit p65/RelA, increasing its transcriptional activity, as well as regulating DNA double-strand break repair via formation of a p65/RelA-BRCA-1-CtIP complex [27, 28].

NF- κ B is a transcription factor that participates in broad range of cellular processes, playing a key role in inflammation and tumor development, and its activation in both cancer cells and macrophages has been associated with tumor formation [29–31]. Activation of TLRs, IL-1R, or TNFR leads to the activation of the IKK complex (consisting of IKK α , IKK β , and NEMO). This triggers phosphorylation of IKK β , which in turn, promotes phosphorylation, ubiquitination, and subsequent degradation of I κ Bs. Degradation of I κ B releases free NF- κ B (p65/p50 heterodimer) which, in turn, translocates into the nucleus, binds to the promoters of inflammatory genes, and stimulates transcription. This canonical NF- κ B pathway activation is a key component of macrophage polarization, phagocytic function, and maintenance of pro-inflammatory status of macrophages [32]. In contrast, TAMs present decreased NF- κ B activity and reduced phagocytosis, which contributes to tumor survival [32, 33]. However, whether and how BRCA-1 and p65 interact to modulate macrophage polarization and function are not well understood.

The aim of this study was to investigate the role of BRCA-1 during the differentiation of macrophages into M(LPS) and M(IL-4) phenotypes in a model of RAW 264.7 murine monocytes, as well as cells exposed to cancer cell conditioned medium (secretoma) as a model of TAM. Cytokine production and other markers of differentiation, phagocytic function, DNA damage, cell cycle, and survival—as well as the BRCA-1/p65 NF- κ B localization and NF- κ B transcriptional activity—were evaluated. We demonstrated that BRCA-1 contributes to M(LPS) and TAM, but not M(IL-4) differentiation, which were characterized by altered patterns of phenotype-specific cytokine production, reduced NF- κ B/BRCA-1 co-localization and NF- κ B activity, and impaired phagocytic activity in BRCA-1-depleted macrophages.

Materials and methods

Chemicals

Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (cat.: L2630), interleukin-4 (cat.: I1020), sulforhodamine B (cat.: S1402), ELISA kits to TNF- α (cat.: RAB0477), IL-6 (cat.: RAB0308), and IL-10 (cat.: RAB0245), propidium iodide, and acridine orange were purchased from Sigma-Aldrich. Material and reagents for electrophoresis were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Protease inhibitors were provided by Roche (Welwyn Garden City, UK). Anti- β -actin (#3700), anti-p65 (#6956), and HRP-linked anti-IgG (#58802) antibodies were from Cell Signaling Technology (USA). BRCA-1 small interfering RNA (siRNA) (cat.: SC-29824) and anti-BRCA-1 antibody (cat.: SC-135731) were from

Santa Cruz Biotechnology. The scrambled siRNA sequence (AM4635) was purchased from Invitrogen.

Cell cultures

RAW 264.7 macrophage cell line and C6 glioma cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, USA). The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 µg/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin G at 37 °C and 5% CO₂ in humidified incubator. Cells were used in the tenth passage in all experiments.

BRCA-1 knockdown by siRNA

For BRCA-1 knockdown, the cells were transfected using the Lipofectamine RNAiMax reagent (Invitrogen, USA) mixed with BRCA-1 siRNA (or scrambled control siRNA) at a 50 nM final concentration following manufacturer's protocol. After 24 h of transfection, the medium was replaced by the treatments described below. Efficiency of BRCA-1 knockdown at a protein and gene expression levels was confirmed by western blot and qRT-PCR, respectively.

M(LPS), M(IL-4), and TAM differentiation protocols

24 h after BRCA-1 knockdown, the cells were treated with LPS (1 µg/mL), IL-4 (20 ng/mL) or CMC6 (conditioned medium from C6 gliomas) to obtain profiles of M(LPS), M(IL-4) [34], and TAMs [35, 36], respectively. LPS and IL-4 were diluted in DMEM containing 1% FBS. CMC6 was prepared from C6 cells seeded at a 70–80% confluence in DMEM supplemented with 1% FBS for 24 h; the medium was collected and centrifuged at 1000×g for 5 min to remove cell debris and, thereafter, it was diluted at a proportion of 2:1 with fresh DMEM containing 1% FBS added to RAW 264.7 cells. Analysis of differentiation markers (by RT-qPCR and ELISA) and functional cell assays (comet, phagocytosis, cell cycle, viability, zymography) were carried out 24 h after inducing differentiation.

Comet assay (DNA damage assay)

Briefly, 2×10^4 cells in 20 µL PBS were mixed with 80 µL of low-melting agarose (0.75%) and added to a 1.5% agarose-coated microscope slide. The slides were placed into a lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.5, 1% Triton X-100, and 10% DMSO) for 24 h at 4 °C, and then the DNA was denatured in alkaline solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA). Afterward, electrophoresis was performed for 20 min at 25 V (0.90 V/cm; 300 mA), and then the samples were neutralized with 400 mM Tris (pH

7.5), washed with dH₂O, and stained with SYBR safe. Hundred cells per sample were counted and classified based on the tail length using a fluorescence microscope. Damage Index (DI) was calculated as follows: $DI = [(n^{\circ}type1) \times 1 + (n^{\circ}type2) \times 2 + (n^{\circ}type3) \times 3 + (n^{\circ}type4) \times 4]$, where "n° type X" is the number of cells carrying a type X of DNA damage.

Western blot

Total cell lysates (50 µg of protein quantified by Bradford method) were separated by SDS-PAGE and electro transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were stained with Ponceau S, rinsed with TBS-T, blocked with 5% bovine serum albumin in TBS-T (1 h), and incubated with primary antibodies (1:1000; 4 °C, overnight). Thereafter, the membranes were incubated with HRP-linked anti-IgG (1:3000, 2 h/room temperature) and then with SuperSignal® West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific). Images were captured by CCD camera (GE ImageQuant LAS 4000).

qRT-PCR

Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized using High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem, USA) from 0.5 µg of total RNA. Quantitative RT-PCR reactions were performed in triplicate for each sample using 7500 Real-Time PCR System thermocycler (Applied Biosystems, USA) and Power SYBR Green PCR kit (Applied Biosystems, USA). The reactions were carried out in 25 µL following manufacturer's instructions, under appropriate conditions for each primer pair. Sequence primers to *TNF-α* (F: AGACCCTCACACTCAGATCA; R: CTG GGAGTAGACAAGGTACAAC), *IL-6* (F: GGCCCTCCC TACTTCACAAG; R: TTCCACGATTTCCAGAGAAC), *TGF-β* (F: CCTGAGTGGCTGTCTTTTGA; R: CGTGGA GTTGTATCTTTGCTG) and *GNB2L* (F: GAGTGTGGC CTTCTCCTCTG; R: GCTTGCAGTTAGCCAGGTTG) were designed and obtained from Sigma-Aldrich and used in a concentration of 100 nM. Quantification was performed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *GNB2L* was used as the house-keeping gene control.

Determination of cytokine levels (ELISA)

Twenty-four hours post-differentiation, RAW 264.7 supernatants were collected and TNF-α, IL-6, and IL-10 levels were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions (Sigma Aldrich).

Phagocytosis assay

The phagocytic activity of macrophages was quantified using *E. coli* fluorescent-labeled particles. Briefly, RAW 264.7 cells were silenced to BRCA-1 and then treated for 24 h with LPS, IL-4 or CMC6. At the end of treatments, phagocytosis was assessed according to Vybrant[®] phagocytosis Kit (Life Technologies). Fluorescence was quantified in a fluorescence spectrophotometer (i5 Softmax-Molecular Devices, USA) set at 480 nm/520 nm (excitation/emission).

Gelatin zymography

Culture media were removed and equal amounts of proteins (approximately 40 µg/lane) were separated by electrophoresis at 120 V in 8% polyacrylamide gels containing 0.2% gelatin (Sigma Aldrich cat. #G9382) in the absence of reducing agent. Following electrophoresis, the gel was washed thrice (30 min each) in 2.5% Triton X-100 at a pH 7.5 to remove SDS, followed by three washes in distilled water at room temperature. The gel was subsequently incubated at 37 °C for 14–16 h in reaction buffer (50 mM Tris base, NaCl 150 mM, ZnCl₂ 1 mM, sodium azide 0.02%, CaCl₂ 10 mM, pH 8). Under these conditions, gelatinases present in the samples get renatured and activated. White zones with gels, which indicate gelatin-degrading activity, were revealed by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 0.1%. Densitometry analyses were performed with the ImageJ[®] software. Data were calculated as compared to control/undifferentiated RAW 264.7 cells and expressed as arbitrary units.

Cell cycle analysis

The cells were collected after treatment, centrifuged, resuspended in 500 µL lysis buffer (10 mM PBS, 0.1% v/v Nonidet P-40, 1.2 mg/mL spermine, 5 µg/mL RNase, and 2.5 µg/mL propidium iodide/PI, pH 7.4) and incubated for 10 min on ice. The DNA content was determined by FACS and analyzed by CellQuest[®] software (BD Biosciences, USA).

Sulforhodamine B assay (SRB)

This colorimetric assay was performed to estimate the cell numbers indirectly by staining total cellular protein with sulforhodamine B (SRB) [37]. The cells were plated onto 96-well plates, treated with LPS, IL-4 or CMC6 and, thereafter, fixed with 100 µL of ice-cold 40% trichloroacetic acid for 1 h at 4 °C. Plates were then washed five times with cold water and left to dry. SRB solution (50 µL; 0.4% SRB in 1% acetic acid) was added to each well and incubated for 30 min. The cells were then washed four times with 1% acetic acid and air-dried. Afterward, 100 µL of 10 mM Tris-base at pH 10.5 was added to each well to solubilize the dye.

The plates were gently shaken for 20 min and the absorbance was read at 492 nm. Cell numbers were calculated as the percentage absorbance compared to the absorbance of untreated controls.

Reporter gene assay

RAW 264.7 cells seeded in 96-well plates were transfected with 100 ng of a vector containing a responsive element to NF-κB driving Firefly luciferase (pGL4.32 Luc2P-NF-κB[®] Promega) and 10 ng constitutive Renilla luciferase construct (pRL-TK[®] Promega) per well. The transfection was carried by ViaFect[®] reagent (Promega) and Opti-MEM. siRNAs particles were transfected along with the plasmids. Cells were also transfected with GFP vector to monitor the efficiency of transfection, and an empty vector was used as negative control as previously described by our group [38]. Thereafter, 3 h of LPS, IL-4 or CMC6 treatments was applied, the cells were lysed and luciferase activity was assessed using the Dual-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega). Results were expressed as the ratio between Firefly and Renilla luciferases and expressed as relative to control groups (considered as RLU = 100).

Molecular docking, structural analyses, and interaction energy calculation

The protein structures under PDB IDs 1T15 [39], 1T29 [40], and 4Y18 [41] corresponding to the human BRCA-1 protein were employed as the receptor in the molecular docking calculations, while PDB ID 2I9T (chain A) [42] corresponding to the human protein p65 was employed as the ligand. To increase the diversity of docking solutions, calculations were performed with three representations of the structure of BRCA-1 on PIPER via ClusPro 2.0 [43, 44]. All docking calculations were performed without restrictions; that is, p65 protein was free to search the entire BRCA-1 surface for its preferential binding site. Docking results were clustered by their own docking scores and then submitted to an interaction energy calculation by FoldX [45].

Immunocytochemistry

The immunocytochemistry technique was used to investigate the immunolocalization of BRCA-1 and p65 following macrophage activation in the presence or absence of BRCA-1. Briefly, RAW 264.7 cells were plated in 24-well plates (80,000 cells/well) in complete medium and transfected with 50 nM of BRCA-1 or scramble siRNA. After 24 h, the cells were stimulated with LPS (1 µg/mL) or CMC6 for 1 h. The cells were then fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min, blocked in T-PBS (0.5% Tween-20) containing 5% BSA for 1 h, diluted in 0.5% Tween-20/Phosphate buffer

saline (T-PBS), followed by permeabilization with PBS containing 0.1% of Triton X-100 for 30 min. The cells were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against BRCA-1 (Santa Cruz SC-646) and p65 (Cell Signaling #6956) both at a 1:500 dilution. After washing, Alexa Fluor 488/555 conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibodies (Invitrogen) were incubated for 2 h at room temperature. The cells were covered with mounting medium containing 70% glycerol and DAPI (Invitrogen). Fluorescence images were obtained with a Microscopy EVOS[®] FL Auto Imaging System (AMAFD1000—Thermo Fisher Scientific; MA, USA). Densitometry analyses were performed with the ImageJ[®] software. Data were calculated as compared to control/undifferentiated RAW 264.7 cells and expressed as arbitrary units.

Statistical analysis

Results were expressed as average values \pm standard error (SEM). The data presented herein were the results of at least three independent biological and experimental triplicate experiments. Statistical analyses and graphical layout were carried out in GraphPad Prism 5 software. Statistical significances were determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for comparison among multiple groups and *t* test for comparison between two groups with significance of $p < 0.05$.

Results

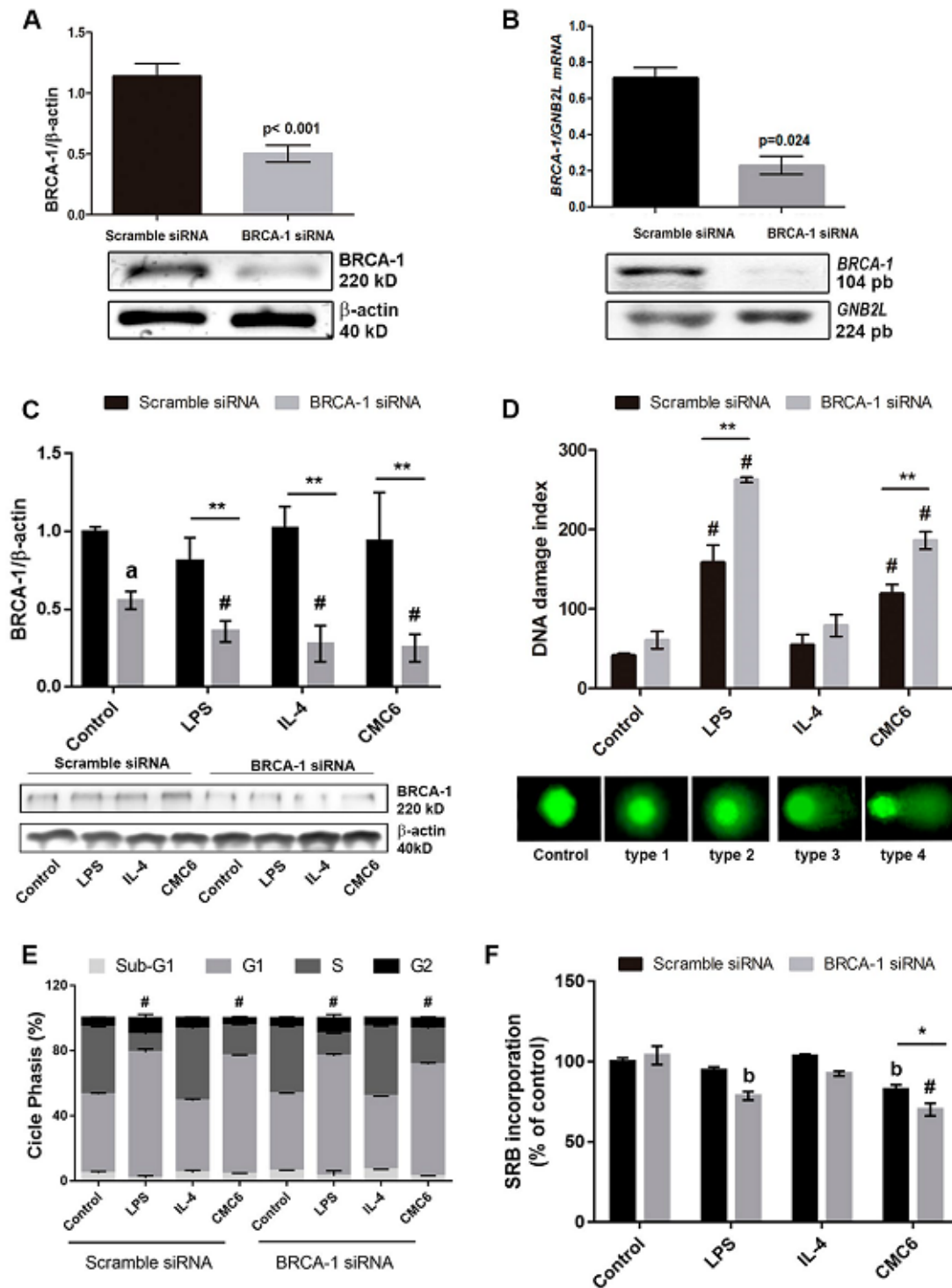
BRCA-1 regulates DNA damage and cell viability in RAW264.7 macrophages

We, first, down regulated *BRCA-1* expression in murine cell line RAW 264.7 using siRNA. The mRNA and protein levels of *BRCA-1* decreased after 24 h as assessed by qRT-PCR and western blot, respectively (Fig. 1a, b). After 24 h of BRCA-1 knockdown, RAW 264.7 cells were stimulated for an additional 24 h with LPS, IL-4 or CMC6 to obtain M(LPS), M(IL-4), and TAMs macrophages phenotypes, respectively. LPS, IL-4, and CMC6 treatments had no effect upon BRCA-1 protein immunocentent, and siRNA-mediated BRCA-1 depletion was maintained during differentiation irrespective of the inducing agent (Fig. 1c). Macrophages stimulated with LPS, and CMC6 in a lower extend, showed an increase in DNA damage score in the comet assay, which indicates DNA strand breaks and fragmentation; this effect was even more pronounced in BRCA-1-depleted cells. On the other hand, differentiation with IL-4 had no impact upon DNA damage, even though BRCA-1 downregulation led to increased damage when compared to untreated BRCA-1 silenced cells (Fig. 1d). Inflammatory insults, such as exposure to LPS, induce cell cycle arrest [46]. Here, at end of

the treatment, LPS and CMC6 increased the cells in G1/G0, which was accompanied by a decrease in S phase cell population, and were not affected by BRCA-1 knockdown (Fig. 1e). Again, IL-4 did not change cell cycle distribution (Fig. 1e). When cell density was analyzed by SRB staining, cells exposed to CMC6 displayed a slightly, but statistically, significant decrease in cell numbers whereas LPS and IL-4 showed no difference compared to controls at 24 h differentiation. When differentiation was carried in BRCA-1 knocked-down cells, we noted a ~25% decrease in cell numbers in M(LPS) and CMC6-treated macrophages whereas M(IL-4) macrophages cell numbers were not affected by BRCA-1 status (Fig. 1f).

BRCA-1 effects upon cellular morphology, inflammatory profile, and phagocytic function of differentiated macrophages

Macrophages are immune cells which present a higher phenotypical plasticity and assume different morphologies according to the stimuli, as shown by phase microscopy after treatment with LPS, IL-4, and CMC6 (Fig. 2a). Cells treated with LPS and CMC6 displayed expansion of plasma membrane and presence of cytosolic vesicles, while cells treated with IL-4 did not show any significant morphological changes compared to the control (Fig. 2a). It is well recognized that exposure of monocytes/macrophages to LPS, IL-4, and tumor conditioned medium increases the expression of secretion of cytokines which can be associated with M1- and M2-like and TAM macrophage phenotypes. *TNF- α* , *IL-6*, and *TGF- β* mRNA levels were quantified in cell lysates by RT-qPCR while *TNF- α* , *IL-6*, and *IL-10* secretion were detected in the cell culture media by ELISA. As shown in Fig. 2, the cells treated with LPS displayed a pro-inflammatory phenotype characterized by upregulation of *TNF- α* and *IL-6* at mRNA and protein level whereas the anti-inflammatory mediators *TGF- β* and *IL-10* remained unaltered (Fig. 2b–g). In keeping with the alternative phenotype, stimulation with IL-4 did not change the expression of pro-inflammatory cytokines (Figs. 2b, c and 3e, f) while the anti-inflammatory *TGF- β* (Fig. 2d) and *IL-10* (Fig. 2g) significantly increased. CMC6 elicited a more complex pattern of expression (in keeping with profiles typically observed in TAM) by inducing *TNF- α* , *IL-6*, and *IL-10*, but not *TGF- β* . Following LPS treatment, BRCA-1 depletion resulted in reduced levels of *TNF- α* and *IL-6* mRNA, and *TNF- α* protein content, whereas no effect of BRCA-1 knockdown upon *TGF- β* and *IL-10* was observed (Fig. 2b–g). On the other hand, in the M(IL-4) differentiation protocol, BRCA-1 knockdown impacted neither *TGF- β* nor *IL-10* upregulation. At last, the CMC6 model of TAM produced a very interesting cytokine profiling. BRCA-1 knockdown inhibited *TNF- α* and *IL-6* mRNA and protein induced by CMC6, as well as



increased the anti-inflammatory *TGF-β* and IL-10 levels if compared to scrambled controls.

We next went on to evaluate whether BRCA-1 depletion affects macrophage cell function following LPS-, IL-4-, and CMC6-induced differentiation. The phagocytic

capacity of macrophages exposed to fluorescein-labeled *E. coli* increased after treatments with LPS and CMC6, but not with IL-4, and BRCA-1 knockdown impaired LPS- and CMC6-induced phagocytosis (Fig. 2h). We also evaluated matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9)

Fig. 1 The impact of BRCA-1 downregulation by siRNA on DNA damage accumulation, BRCA-1 turnover, cell cycle, and viability after macrophage exposition to LPS, IL-4, and conditioned medium obtained from C6 glioma cells (CMC6). First, RAW 264.7 macrophages were transfected for 24 h in the presence or absence of BRCA-1 siRNA (50 nM) confirmed by BRCA-1 immunoccontent (a) and mRNA levels (b). After 24 h of transfection, RAW 264.7 macrophages were treated with LPS (1 µg/mL), IL-4 (20 ng/mL), and CMC6 for 24 h in the presence or absence of BRCA-1 siRNA (50 nM). c Representative western blot shows BRCA-1 immunoccontents in RAW 264.7 macrophages at the end of all treatments. d Quantification of comet assay and four types of tail length were chosen between samples to estimate DNA Damage Index. e Cell cycle analysis by flow cytometry and f SRB incorporation assay ^a*p*<0.05 when compared with the control. ^b*p*<0.01 compared to control. ^{*}*p*<0.001 when compared with the control. ^{**}*p*<0.01 when compared between cells showing the downregulated and normal expression of BRCA-1 under the same treatment (*n*=3 in biological and experimental triplicate, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for multiple groups comparison and *t* test between columns)

activities in the culture medium after the treatment (Fig. 2i). We observed an increase in MMP-9 and MMP-2 activities in the LPS- and CMC6-treated groups, but not IL-4, as compared to the control. Knockdown of BRCA-1 had no effect upon these enzymes activities. These results reiterate that BRCA-1 is important to M(LPS) and TAM differentiation of macrophages, thereby, impacting their phagocytic function.

Role of BRCA-1 in NF-κB activation in LPS- and CMC6-differentiated macrophages

NF-κB is a transcription factor typically induced by LPS and other pro-inflammatory contexts. Because BRCA-1 depletion impaired inflammatory gene expressions in LPS- and CMC6-induced macrophage polarization, we decided to evaluate whether BRCA-1 may affect NF-κB activation. We assessed the transcriptional activity of NF-κB using a reporter gene assay coupled to luciferase expression. There was a tenfold increase in luciferase activity in cells treated with LPS and an eightfold increase in cells treated with CMC6 as compared to control, indicating that these treatments promote transactivation of NF-κB. BRCA-1 showed to be important on this response, given that BRCA-1 depletion significantly reduced NF-κB-driven luciferase activity in both LPS and CMC6 differentiation protocols (Fig. 3a). Exposure to IL-4 caused no impact upon NF-κB reporter activity. This IL-4 lack of effect is in accordance with the literature, since it is well described that IL-4 inhibits NF-κB signaling through STAT3 and STAT6 upstream activation [32]. Once it was evident that BRCA-1 was able to modulate inflammatory cytokines and NF-κB transactivation in macrophages, we decided to investigate whether these events occur as a result of the interaction between NF-κB and BRCA-1 as previously demonstrated [28]. The residues on the interacting domain between BRCA-1 and p65

were analyzed and compared with the residues that interact between BRCA-1 and the phosphorylated proteins on the BRCT domain from the PDB structures 1T15, 1T29, and 4Y18. Docking complexes that presented conserved residues were selected and submitted to an interaction energy calculation. Complexes 1T29-2I9T, 4Y18-2I9T, and 1T15-2I9T presented interaction energies of -13.13, -16.98, and -18.16 kcal/mol, respectively. The complex which presented the lowest interaction energy was selected to represent the putative model. The residues K1702, R1699, L1657, and G1656 from BRCA-1 were present on all complexes forming hydrogen bonds with the residues of p65 and were mutated to assess their effects on the thermostability of the docking complex (Fig. 3b-d). In addition, two cancer causing mutations in BRCA-1, F1695L, and D1733G [47], were also subjected to mutagenesis. Only K1702A and G1656A had a destabilizing effect on the docking complexes, with $\Delta\Delta G$ values of 2.01 and 0.58 kcal/mol, respectively; all other mutations were neutral (Fig. 3e). Based on these results, we next sought to investigate if BRCA-1 could interfere on NF-κB localization in the cell. Presence of the NF-κB subunit p65 in the nucleus is a key step of canonical NF-κB pathway activation which cumulates into pro-inflammatory gene expression during inflammatory insult. This is critical step for M(LPS) differentiation of macrophages [32, 48]. Figure 3f shows that RAW 264.7 macrophages treated with LPS or CMC6 showed increased levels of p65, which was merged with DAPI staining in the nuclear compartment as soon as 1 h post-exposure to LPS and CMC6. Moreover, treatments caused co-localization of BRCA-1/p65 as assessed by merged images. In contrast, knockdown of BRCA-1 decreased both BRCA-1, as expected, as well as the NF-κB p65 subunit nuclear staining followed by LPS and CMC6 stimulation, indicating that BRCA-1 expression is an important factor for p65 nuclear presence during pro-inflammatory contexts (Fig. 3g, h). This is in agreement with previous data which described that BRCA-1 acts as a co-activator of NF-κB via interaction with p65, thereby increasing its nuclear activity [28].

Discussion

To characterize the importance of expression of BRCA-1 in macrophage differentiation toward M(LPS), M(IL-4) or TAM phenotypes, we depleted BRCA-1 in RAW 264.7 macrophages and, subsequently, stimulated differentiation *in vitro*. We obtained a typical pro-inflammatory phenotype following stimulation with LPS, an anti-inflammatory phenotype using IL-4 as the stimulant (as previously described by Zanin et al. [34]). In addition, a TAM profile was induced with CMC6, which comprises several soluble factors secreted by glioma cells that have been implicated

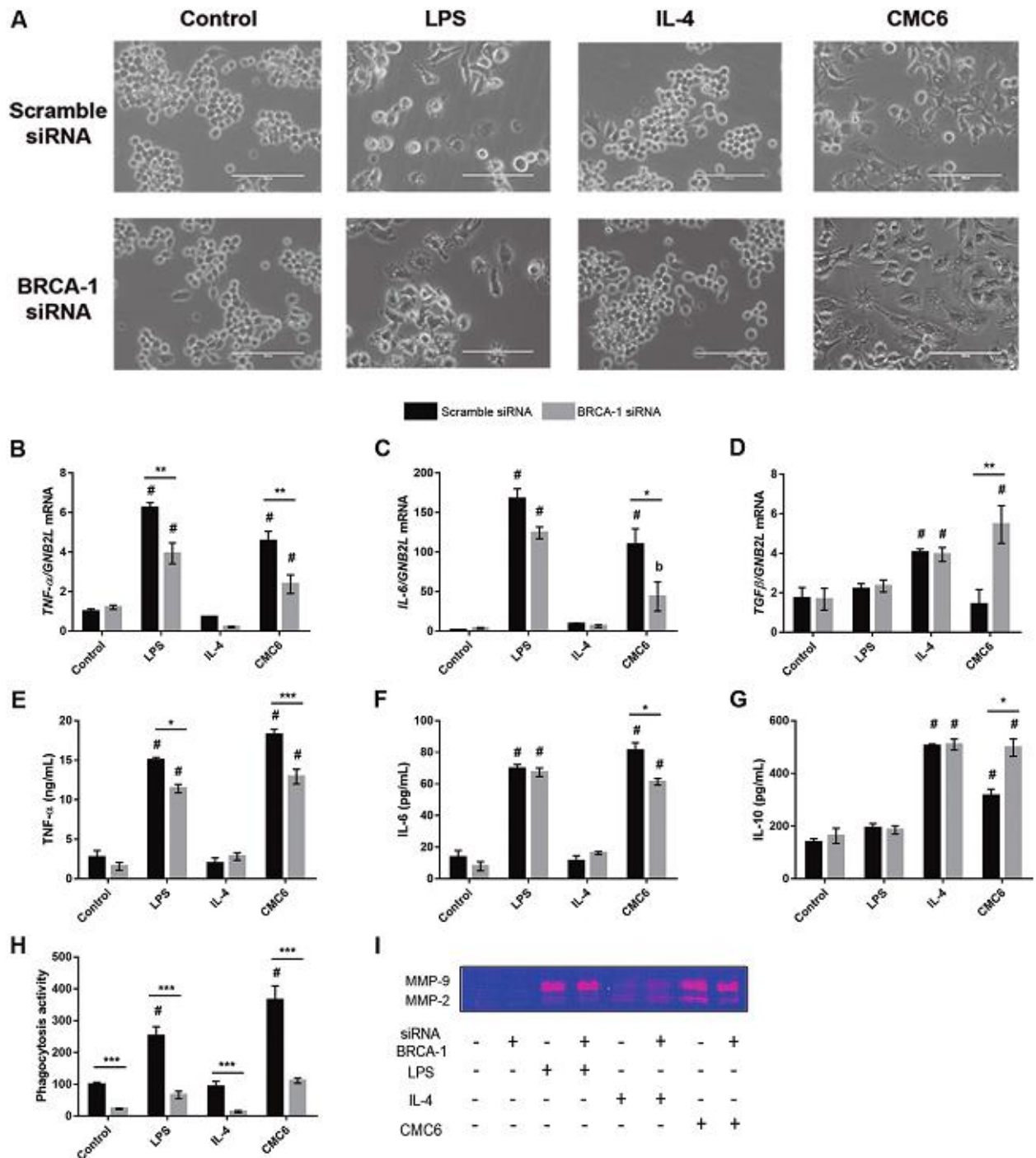


Fig. 2 Cell cycle, inflammatory markers, MMPs activity, and phagocytic capacity in RAW 264.7 macrophages. The cells were treated with LPS, IL-4, and CMC6 for 24 h in the presence or absence of BRCA-1 siRNA. **a** Phase-contrast microscopy of cells at the end of treatments. **b** TNF-α, **c** IL-6, and **d** TGF-β expression were quantified in the cellular content by RT-qPCR. ELISA assay was performed to detect **e** TNF-α, **f** IL-6 and **g** IL-10 protein content in culture medium. **h** Phagocytosis capacity was measured using fluorescein-coupled beads. **i** Gelatin zymography was performed in cul-

ture medium to detect the presence of MMP-2 and MMP-9 activities; superior red bands correspond to MMP-9 activity and inferior band corresponds to MMP-2 activity. * $p < 0.001$ when compared to the control. * $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ when compared between cells showing the downregulated and normal expression of BRCA-1 under the same treatments ($n = 3$ in biological and experimental triplicate, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for multiple groups comparison and t test between columns)

in recruitment and activity of microglia and macrophages including monocyte chemoattractant protein-1 (Mcp1) [49], Mep3 [50], Cxcr1-Cxcr1 [51], GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) [52], transforming growth factor- β 1 (Tgfb1), macrophage inhibitory cytokine-1 [53, 54], and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [55]. We found that BRCA-1 seems to be an important factor to macrophage differentiation induced by LPS and CMC6, given that BRCA-1 depletion reduced the cytokines related to the M(LPS) and CMC6 phenotype, and also increased anti-inflammatory in the CMC6 model. Depletion of BRCA-1 has a minor/no impact on M(IL-4) macrophages stimulated with IL-4. TNF- α and IL-6 markers were attenuated, while IL-10 and TGF- β increased in cells downregulated for BRCA-1 expression. Previous studies corroborate our findings, in which TNF- α -dependent signaling as well as IL-6 production was compromised in monocytes isolated from healthy females with germline mutations of BRCA-1 when stimulated with LPS [22]. In contrast to IL-6 mRNA, it is noteworthy that LPS-induced IL-6 protein secretion was not abrogated in BRCA-1 silenced cells, indicating that other alterations, such as the modulation of recycling endosomes, can influence differential secretion of TNF- α and IL-6 during inflammatory responses [56]. With regard to CMC6-induced macrophage differentiation, it is well described that TAMs gene expression profiles may simultaneously include a variety of inflammatory markers found in both M(LPS) and M(IL-4) profiles [16]. In our model, CMC6 induced both TNF- α , IL-6 as well as IL-10, and BRCA-1 depletion attenuated pro-inflammatory genes (i.e., TNF- α and IL-6) while increased anti-inflammatory markers (IL-10 and TGF- β). Data from LPS and CMC6 models indicate that functional BRCA-1 contributes to pro-inflammatory gene expression while BRCA-1 deficiency drives anti-inflammatory phenotypes in macrophages. For example, TGF- β production by TAMs is a driver of lung cancer and it promotes glioma growth [10, 57, 58]. Consistent data indicate that MMPs have important roles in macrophage activation, extracellular matrix remodeling, and cell recruitment to tumor microenvironment [59]. MMPs transcription and activities can be stimulated by a variety of stimuli, including NF- κ B activation [60]. In our model, silencing of BRCA-1 was not able to modify MMP-2 and MMP-9 activities stimulated by LPS and CMC6. These results show that although BRCA-1 is able to modulate both NF- κ B activation and expression of inflammatory markers related to macrophage differentiation, it does not appear to be involved in the regulation of key gene associated with extracellular matrix modeling such as MMPs. Nevertheless, BRCA-1 knockdown significantly compromised phagocytic function of macrophages, indicating that impaired differentiation and function (i.e., phagocytosis) correlate with inhibited inflammatory cytokine production and NF- κ B activity.

The activation of the transcriptional factor NF- κ B is a pivotal step in the activation of macrophages. Its nuclear activity, which involves the formation of p65/p50 heterodimers (canonical pathway) [30, 61] is required during M(LPS) activation pathways, thereby increasing the expression of inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6, as well as acquisition of antitumor phenotypes [29]. LPS and CMC6 treatments increased NF- κ B activity, and expression of BRCA-1 was able to modulate NF- κ B transactivation in RAW 264.7 macrophages, which can be related to the modulation of TNF- α and IL-6 expressions observed herein. Molecular docking predicted the interactions between the conserved BRCT domain of BRCA-1 with p65, which corresponds to C terminal region of BRCA-1, and also pointed out that one type of BRCA-1 mutation typical of breast cancer may disrupt BRCA-1:p65 interaction. Benezra et al. [28] also showed that Rel homology domain of the p65/RelA NF- κ B subunit interacts with BRCA-1, but through its N terminal region; they concluded that BRCA-1 acts as a scaffold protein, stabilizing the complex between NF- κ B and other proteins, such as CBP and RNA polymerase II holoenzyme, thus enhancing NF- κ B transcriptional activity and expression of inflammatory genes. We also showed that in immune cells, BRCA-1 constitutive expression leads to increased nuclear p65 levels and NF- κ B transcriptional activity in reporter gene assays. Whether this NF- κ B signaling potentiation involves p65 gene transcription or impaired p65 nuclear export or degradation by BRCA-1 requires further investigation. In addition, more studies are needed to better characterize whether BRCT regions of BRCA-1 are relevant to their interaction with p65 and how it controls NF- κ B signaling. Besides, it is important to note that NF- κ B modulation by BRCA-1 seems to vary depending on the context. For example, BRCA-1 mutant triple negative breast cancer (TNBC) cells, such as HCC1937 cells, exhibit NF- κ B hyperactivity that can be downregulated by wild-type BRCA-1 overexpression [62].

In summary, the herein presented data suggest a new function of BRCA-1 related to the activation and differentiation of macrophages, which involves modulation of NF- κ B signaling to modulate pro-inflammatory status. In addition, depleted BRCA-1 is associated with increased expression of anti-inflammatory markers when macrophages are exposed to conditioned media from tumor cells, reinforcing the importance of BRCA-1 expression in the activation and survival of immune cells when they are stimulated by tumor secretoma. Further studies using in vivo models are needed to clarify the mechanism of BRCA-1 and p65 pathway interaction in other contexts/models and its potential contribution to macrophage responses in inflammation-related diseases.

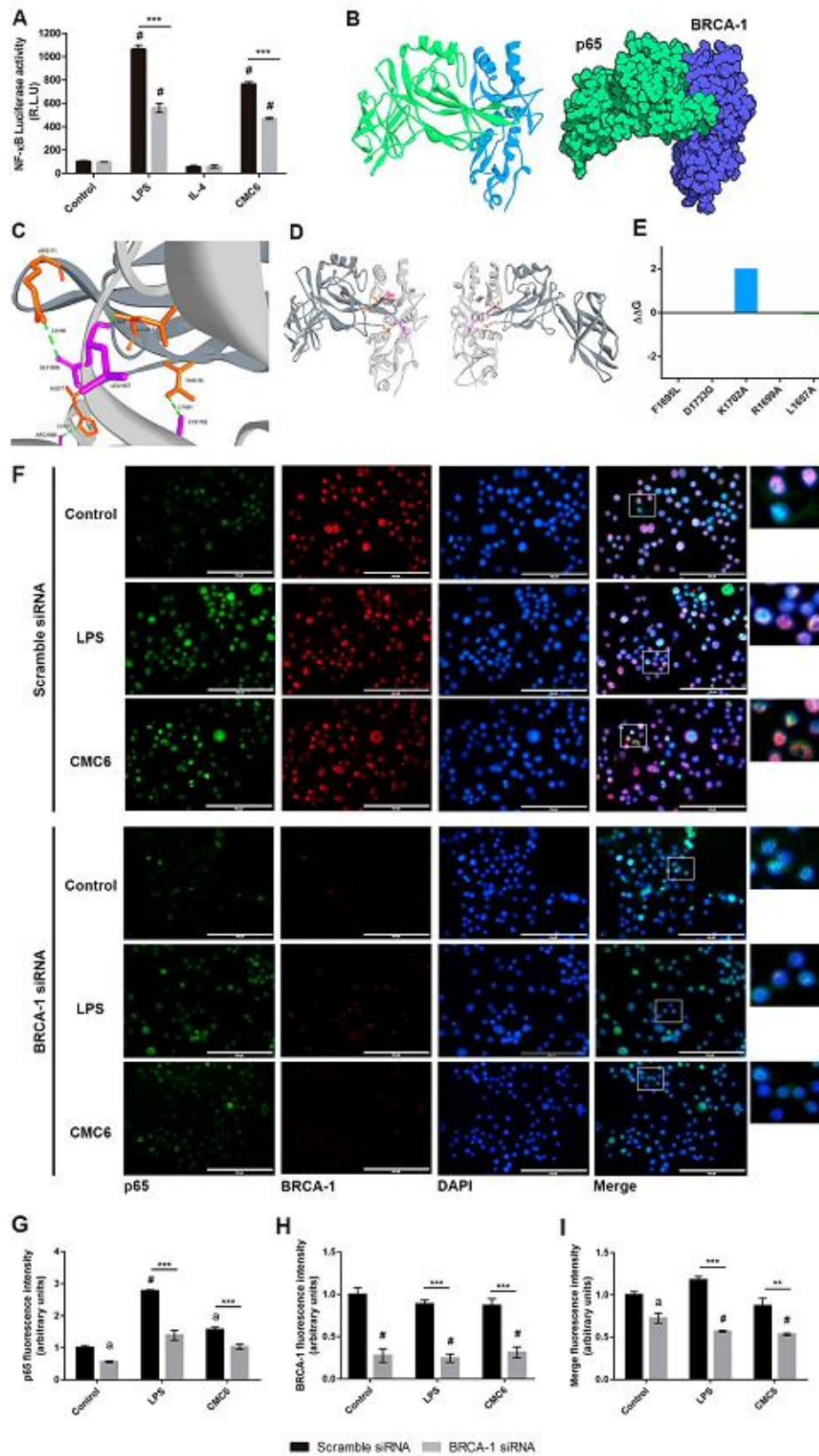


Fig. 3 NF- κ B transactivation in RAW 264.7 macrophages, putative model for BRCA-1-p65 interaction and immunocytochemistry **a** Gene reporter assay was performed in cells to assess NF- κ B transcription activity. Luciferase activity was measured and results are expressed as fold induction of Luciferase/Renilla luminescence control. R.L.U: relative luminescence units. **b** Overview of the lowest energy complex, ribbon representation on left and surface on the right. **c** Zoomed in representation of the interaction with residues forming hydrogen bonds colored green and their distances in angstroms. **d** Zoomed out representation of the docked complex, BRCA-1 ribbon colored light gray with interacting residues colored pink and p65 ribbon colored dark gray with interacting residues colored orange. **e** Effect of mutations on the thermostability of BRCA-1-p65 complex. For next in vitro analysis, RAW 264.7 macrophages were treated with LPS or CMC6 for 1 h in presence or absence of BRCA-1 siRNA (50 nM). **f** Microscopy analysis show the fluorescence of p65 in green, fluorescence of BRCA-1 in red, and fluorescence of DAPI nucleus marker in blue. Scale bars represent 100 μ m. Fluorescence intensity of p65 (**g**), BRCA-1 (**h**) and merged images (**i**) obtained by densitometry. ^a $p < 0.05$ when compared with the control. ^b $p < 0.001$ when compared with the control. ^c $p < 0.01$ when compared between cells showing the downregulated and normal expression of BRCA-1 under the same treatment. ^d $p < 0.001$ when compared between cells showing the downregulated and normal expression of BRCA-1 under the same treatment. ($n=$ three in biological and experimental triplicate, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for multiple groups comparison and t test between columns)

Acknowledgements This work was supported by FAPERGS/MS/CNPq-PPSUS 17/2551-001408-1; FAPERGS/CNPq-PRONEX 16/2551-0000499-4.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Brüne B, Dehne N, Grossmann N et al (2013) Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal* 19(6):595–637. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4785>
- Schebesch C, Kodolja V, Müller C et al (1997) Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro. *Immunology* 92(4):478–486
- Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32(5):593–604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3(1):23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>
- Bonder CS, Dickensheets HL, Finlay-Jones JJ, Donnelly RP, Hart PH (1998) Involvement of the IL-2 receptor gamma-chain (gamma c) in the control by IL-4 of human monocyte and macrophage proinflammatory mediator production. *J Immunol* 160(8):4048–4056
- Cheung DL, Hart PH, Vitti GF, Whitty GA, Hamilton JA (1990) Contrasting effects of interferon-gamma and interleukin-4 on the interleukin-6 activity of stimulated human monocytes. *Immunology* 71(1):70–75
- Yang C, He L, He P et al (2015) Increased drug resistance in breast cancer by tumor-associated macrophages through IL-10/STAT3/bcl-2 signaling pathway. *Med Oncol* 32(2):352. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0352-6>
- Maeda H, Shiraishi A (1996) TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol* 156(1):73–78
- Chahlavi A, Rayman P, Richmond AL et al (2005) Glioblastomas induce T-lymphocyte death by two distinct pathways involving gangliosides and CD70. *Cancer Res* 65(12):5428–5438. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4395>
- Ueda R, Fujita M, Zhu X et al (2009) Systemic inhibition of transforming growth factor- β in glioma-bearing mice improves the therapeutic efficacy of glioma-associated antigen peptide vaccines. *Clin Cancer Res* 15(21):6551–6559. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1067>
- Zou JP, Morford LA, Choungnet C et al (1999) Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. *J Immunol* 162(8):4882–4892
- Mehling M, Simon P, Mittelbronn M et al (2007) WHO grade associated downregulation of MHC class I antigen-processing machinery components in human astrocytomas: does it reflect a potential immune escape mechanism? *Acta Neuropathol* 114(2):111–119. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0231-8>
- Standiford TJ, Kuick R, Bhan U, Chen J, Newstead M, Keshamouni VG (2011) TGF- β -induced IRAK-M expression in tumor-associated macrophages regulates lung tumor growth. *Oncogene* 30(21):2475–2484. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.619>
- Siveen KS, Kuttan G (2009) Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett* 123(2):97–102. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.02.011>
- Movahedi K, Laoui D, Gysemans C et al (2010) Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res* 70(14):5728–5739. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4672>
- Liu CY, Xu JY, Shi XY et al (2013) M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Lab Invest* 93(7):844–854. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.69>
- Huen MSY, Sy SMH, Chen J (2010) BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2):138–148. <https://doi.org/10.1038/nrm2831>
- Deng CX, Scott F (2000) Role of the tumor suppressor gene Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation. *Oncogene* 19(8):1059–1064. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203269>
- Walsh CS (2015) Two decades beyond BRCA1/2: homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy? *Gynecol Oncol* 137(2):343–350. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.02.017>
- Bae I, Fan S, Meng Q et al (2004) BRCA1 induces antioxidant gene expression and resistance to oxidative stress. *Cancer Res* 64(21):7893–7909. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1119>
- Teoh H, Quan A, Creighton AK et al (2013) BRCA1 gene therapy reduces systemic inflammatory response and multiple organ failure and improves survival in experimental sepsis. *Gene Ther* 20(1):51–61. <https://doi.org/10.1038/gt.2011.214>
- Zielinski CC, Budinsky AC, Wagner TMU et al (2003) Defect of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production and TNF-alpha-induced ICAM-1-expression in BRCA1 mutations carriers. *Breast Cancer Res Treat* 81(2):99–105. <https://doi.org/10.1023/A:1025761716283>

23. Hu Y-F, Li R (2002) JunB potentiates function of BRCA1 activation domain 1 (AD1) through a coiled-coil-mediated interaction. *Genes Dev* 16(12):1509–1517. <https://doi.org/10.1101/gad.99550.2>
24. Houvras Y, Benezra M, Zhang H, Manfredi JJ, Weber BL, Licht JD (2000) BRCA1 physically and functionally interacts with ATF1. *J Biol Chem* 275(46):36230–36237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002539200>
25. Ouchi T, Lee SW, Ouchi M, Aaronson SA, Horvath CM (2000) Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(10):5208–5213. <https://doi.org/10.1073/pnas.080469697>
26. Zhang H, Somasundaram K, Peng Y et al (1998) BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* 16(13):1713–1721. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201932>
27. Volcic M, Karl S, Baumann B et al (2012) NF- κ B regulates DNA double-strand break repair in conjunction with BRCA1-CtIP complexes. *Nucleic Acids Res* 40(1):181–195. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr687>
28. Benezra M, Chevallier N, Morrison DJ, MacLachlan TK, El-Deiry WS, Licht JD (2003) BRCA1 augments transcription by the NF- κ B transcription factor by binding to the rel domain of the p65/RelA subunit. *J Biol Chem* 278(29):26333–26341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303076200>
29. Chang C-P, Su Y-C, Hu C-W, Lei H-Y (2013) TLR2-dependent selective autophagy regulates NF- κ B lysosomal degradation in hepatoma-derived M2 macrophage differentiation. *Cell Death Differ* 20(3):515–523. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.146>
30. He G, Karin M (2010) NF- κ B and STAT3—key players in liver inflammation and cancer. *Nat Publ Gr* 21(1):159–168. <https://doi.org/10.1038/nr.2010.183>
31. Zanotto-Filho A, Braganhol E, Schröder R et al (2011) NF κ B inhibitors induce cell death in glioblastomas. *Biochem Pharmacol* 81(3):412–424. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.10.014>
32. Biswas SK, Lewis CE (2010) NF- κ B as a central regulator of macrophage function in tumors. *J Leukoc Biol* 88(5):877–884. <https://doi.org/10.1189/jlb.03.10153>
33. Mancino A, Lawrence T (2010) Nuclear factor-kappaB and tumor-associated macrophages. *Clin Cancer Res* 16(3):784–789. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1015>
34. Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS et al (2012) Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. *PLoS ONE* 7(2):e31205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031205>
35. Bloch O, Crane CA, Kaur R, Safaei M, Rutkowski MJ, Parsa AT (2013) Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages. *Clin Cancer Res* 19(12):3165–3175. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3314>
36. Zhou W, Ke SQ, Huang Z et al (2015) Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol* 17(2):170–182. <https://doi.org/10.1038/ncb3090>
37. Vichai V, Kirtikara K (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 1(3):1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
38. Somensi N, Brum PO, de Miranda Ramos V et al (2017) Extracellular HSP70 activates ERK1/2, NF- κ B and Pro-inflammatory gene transcription through binding with RAGE in A549 human lung cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 55(5):2507–2522. <https://doi.org/10.1159/000480213>
39. Clapperton JA, Manke IA, Lowery DM et al (2004) Structure and mechanism of BRCA1 BRCT domain recognition of phosphorylated BACH1 with implications for cancer. *Nat Struct Mol Biol* 11(6):512–518. <https://doi.org/10.1038/nsmb775>
40. Shiozaki EN, Gu L, Yan N, Shi Y (2004) Structure of the BRCT repeats of BRCA1 bound to a BACH1 phosphopeptide: implications for signaling. *Mol Cell* 14(3):405–412. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00238-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00238-2)
41. Wu Q, Paul A, Su D et al (2016) Structure of BRCA1-BRCT/abraxas complex reveals phosphorylation-dependent BRCT dimerization at DNA damage sites. *Mol Cell* 61(3):434–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.017>
42. Escalante CR, Shen L, Thanos D, Aggarwal AK (2002) Structure of NF- κ B p50/p65 heterodimer bound to the PRDII DNA element from the interferon- β promoter. *Structure* 10(3):383–391. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00723-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00723-2)
43. Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ (2004) ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res* 32:96–99. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh354>
44. Kozakov D, Brenke R, Comeau SR, Vajda S (2006) PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 65(2):392–406. <https://doi.org/10.1002/prot.21117>
45. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L (2005) The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res* 33:382–388. <https://doi.org/10.1093/nar/gki387>
46. Lee HA, Koh EK et al (2017) Ethyl acetate extract from *Asparagus cochinchinensis* exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells by regulating COX-2/iNOS, inflammatory cytokine expression, MAP kinase pathways, the cell cycle and anti-oxidant activity. *Mol Med Rep* 15:1613–1623. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6166>
47. Liu J, Pan Y, Ma B, Nussinov R (2006) “Similarity trap” in protein-protein interactions could be carcinogenic: simulations of p53 core domain complexed with 53BP1 and BRCA1 BRCT domains. *Structure* 14(12):1811–1821. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.10.009>
48. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011) Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* 12(8):695–708. <https://doi.org/10.1038/ni.2065>
49. Platten M, Kretz A, Naumann U et al (2003) Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann Neurol* 54(3):388–392. <https://doi.org/10.1002/ana.10679>
50. Okada M, Saio M, Kito Y, Ohe N, Yano H et al (2009) Tumor-associated macrophage/microglia infiltration in human gliomas is correlated with MCP-3, but not MCP-1. *Int J Oncol* 34(6):1261–1269. <https://doi.org/10.3892/ijo.00000292>
51. Held-Feindt J, Hattermann K, Mürköster SS et al (2010) CX3CR51 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs). *Exp Cell Res* 316(9):1553–1566. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.018>
52. Ku MC, Wolf SA, Respondek D et al (2013) GDNF mediates glioblastoma-induced microglia attraction but not astrogliosis. *Acta Neuropathol* 125(4):609–620. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1079-8>
53. Wei J, Barr J, Kong LY et al (2010) Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. *Clin Cancer Res* 16(2):461–473. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1983>
54. Grobden B, De Deyn PP, Slegers H (2002) Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 310(3):257–270. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0651-7>
55. Sielska M, Przanowski P, Wylot B et al (2013) Distinct roles of CSF family cytokines in macrophage infiltration and activation in glioma progression and injury response. *J Pathol* 230(3):310–321. <https://doi.org/10.1002/path.4192>

56. Manderson AP, Kay JG, Hammond LA, Brown DL, Stow JL (2007) Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF α . *J Cell Biol* 178(1):57–69. <https://doi.org/10.1083/jcb.200612131>
57. Poon CC, Sarkar S, Yong VW, Kelly JJP (2017) Glioblastoma-associated microglia and macrophages: targets for therapies to improve prognosis. *Brain* 140(6):1548–1560. <https://doi.org/10.1093/brain/aww355>
58. Kennedy BC, Showers CR, Anderson DE et al (2013) Tumor-associated macrophages in glioma: friend or foe? *J Oncol* 2013:486912. <https://doi.org/10.1155/2013/486912>
59. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141(1):52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>
60. Yoo HG, Shin B, Park JS et al (2002) IL-1 β induces MMP-9 via reactive oxygen species and NF- κ B in murine macrophage RAW 2647 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 298(2):251–256. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02431-2](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02431-2)
61. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12):958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
62. Buckley NE, Haddock P, Simoes RDM et al (2016) A BRCA1 deficient, NF- κ B driven immune signal predicts good outcome in triple negative breast cancer. *Oncotarget* 7(15):19884–19896. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7865>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Capítulo II - Resultado complementar

Resultado não publicado, complementar ao estudo.

4.2.1 Incorporação de laranja de acridina

As Figuras complementares 3A e 3B mostram a porcentagem de células positivas para a incorporação da acridina em vesículas fagolisossômicas analisadas por citometria de fluxo e a respectiva quantificação. O corante laranja de acridina atravessa a membrana celular e, quando presente no citoplasma, emite luz verde, que em pH ácido é reduzido e emite luz vermelha. A emissão de luz vermelha indica a presença de vesículas ácidas, que estão relacionadas ao processo de autofagia, a qual é detectada por citometria de fluxo. Os tratamentos com LPS e CMC6 aumentaram a marcação positiva para laranja de acridina, enquanto que o estímulo com IL-4 não causou diferença estatística em relação ao grupo controle. O silenciamento de BRCA-1 causou maior incorporação de laranja de acridina nas células expostas a LPS, IL-4 e CMC6 quando comparados com o grupo controle bem como comparadas aos respectivos tratamentos na ausência de siRNA para BRCA-1, demonstrando que a diminuição da expressão de BRCA-1 é capaz de potencializar o efeito já observado nas células expostas a LPS e CMC6 e induzir autofagia nas células tratadas com IL-4.

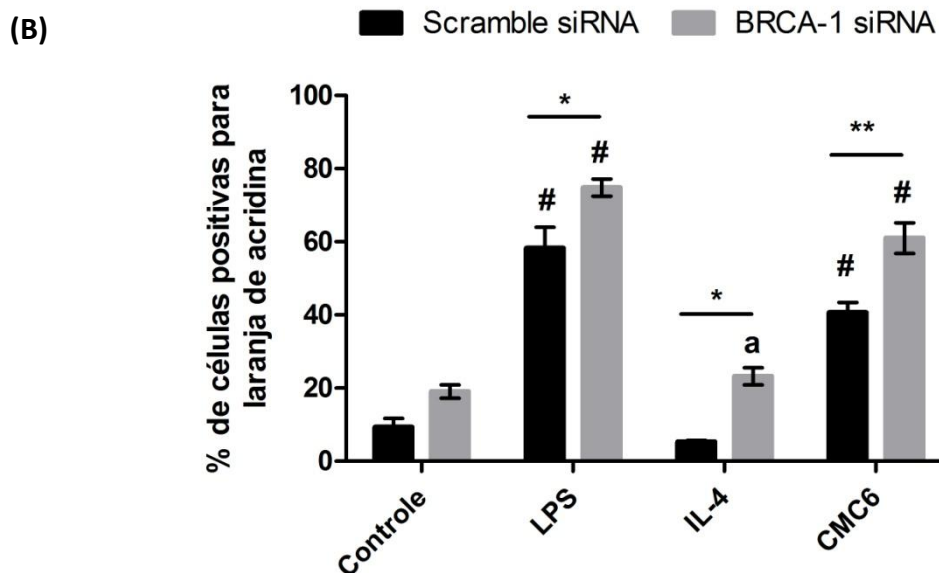
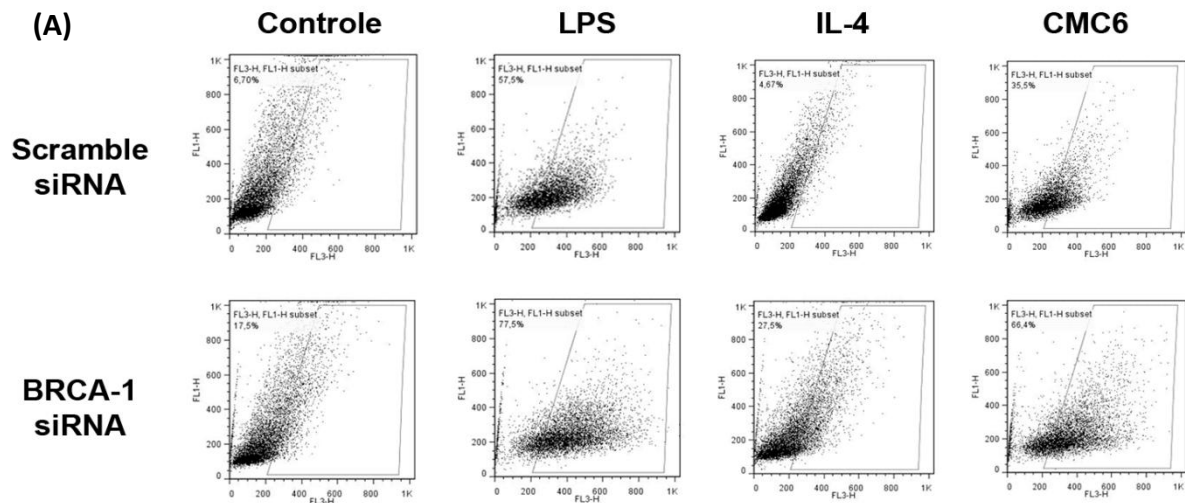


Figura 3: O envolvimento de BRCA-1 na incorporação de laranja de acridina em macrófagos RAW 264.7 expostos a LPS, IL-4 e CMC6. *Dot-plot* (A) e gráfico (B) representativos para laranja de acridina em macrófagos silenciados para BRCA-1 e expostos a LPS (1µg/mL), IL-4 (20 ng/mL) e meio condicionado de linhagem C6 de glioblastoma (CMC6). ^a: p<0,05 quando comparado ao grupo controle; #: p<0,001 quando comparado ao grupo controle; *: p<0,05 quando comparado grupo *scramble* do mesmo tratamento **: p<0,001 quando comparado grupo *scramble* do mesmo tratamento (experimentos com

n=3 reproduzidos em triplicatas biológicas e experimentais. Análise estatística feita por ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey para análises entre todos os grupos e teste-t para comparação entre os grupos do mesmo tratamento na presença e ausência de siRNA para BRCA-1).

5. DISCUSSÃO

Macrófagos são reguladores importantes em diferentes estágios do processo inflamatório- desde a geração até o controle e retomada da homeostase tecidual. A ativação de macrófagos é composta por uma variedade de eventos celulares que envolvem desde a exposição de receptores e complexos de histocompatibilidade, até a produção e secreção de citocinas inflamatórias e suas mudanças fenotípicas. Autores salientam que a ativação de macrófagos e o consequente controle da inflamação podem ser determinantes em desfechos patológicos que dependam do processo inflamatório como em situações de infecção bacteriana, fúngica bem como no surgimento e progressão de neoplasias (BISWAS; LEWIS, 2010; BRÜNE *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2013a; KONG *et al.*, 2010; KREIDER *et al.*, 2007; POON *et al.*, 2017).

Este estudo traz evidências sobre a participação da proteína BRCA-1 durante a ativação de macrófagos em contextos inflamatórios, os quais estimulam estas células fagocíticas a assumir fenótipos e atividades inflamatórias distintas. Mutações deletérias (ou germinativas) em BRCA-1 tem incidência considerável em pacientes com câncer de mama e ovário. Coach *et al.*, descrevem que a incidência pode chegar a 8,5% em pacientes com câncer de mama com histórico familiar triplo negativo (COUCH *et al.*, 2015). Paralelamente, por BRCA-1 ser uma proteína com atividade de reparo de DNA dependente de recombinação homóloga, dados da literatura mostram que quimioterápicos com ação genotóxica apresentam melhor eficácia nestes pacientes, mostrando a importância da forma constitutiva de BRCA-1 também

como alvo de tratamentos (AUDEH *et al.*, 2010; BYRSKI *et al.*, 2014; WALSH, 2015). Outros autores também já demonstram sua importância dentro da resposta imune, bem como salientando a atuação direta ou até mesmo as possíveis interações físicas com fatores de transcrição, aumentando suas atividades transcricionais e aumentando a eficiência da resposta inflamatória (BAE *et al.*, 2004; GORRINI *et al.*, 2013; TEOH *et al.*, 2013; VOLCIC *et al.*, 2012). Neste sentido, trazemos como novidade a importância da proteína BRCA-1 na resposta inflamatória de macrófagos causada por três diferentes situações *in vitro*: durante a ativação clássica (LPS), alternativa (IL-4) e quando em contato com meio de tumores. Escolhemos a linhagem C6 por ser capaz de secretar uma série de moléculas sinalizadoras como proteína quimioatrativa de monócitos-1 e 3- Mcp1 (PLATTEN *et al.*, 2003) Mcp3 (OKADA, M. *et al.*, 2009), receptor para quimiocinas 1 e 11-Cxcr11-Cxcr1 (HELD-FEINDT *et al.*, 2010), fator neurotrófico derivado de células gliais- GDNF (KU *et al.*, 2013), fator de transformação de crescimento-TGF- β (WEI *et al.*, 2010) e bem como citocina inibitória de macrófagos- MIC-1 capazes de atrair e estimular a atividade células imunes adjacentes ao tumor- como os macrófagos (GROBBEN; DE DEYN; SLEGGERS, 2002). Portanto, objetivamos avaliar se o silenciamento da proteína BRCA-1 poderia influenciar a resposta destas células imunes quando submetidas às situações citadas acima.

Nossos primeiros resultados mostram que a linhagem murina RAW 264.7 expressa constitutivamente BRCA-1, identificada por imunocitoquímica bem como por RT-qPCR, além de mostrar ser possível diminuir a expressão de BRCA-1 através da técnica de transfecção com RNA interferente. Estímulos que causam resposta pró-inflamatória em macrófagos, como o LPS, resultam

em alta produção de prostaglandinas e espécies reativas tanto de oxigênio como de nitrogênio, os quais são mediadores importantes durante a resposta imune contra patógenos (JI *et al.*, 2012). Porém, quando a inflamação não é controlada, contribuem para a oxidação de lipídios de membrana, de proteínas e do DNA do hospedeiro afetando inclusive a sobrevivência das células imunes durante o insulto (KIM; HA, 2009). Em MAT's, a manutenção de um ambiente pró-tumoral pelas células transformadas- que secretam uma gama de moléculas contribui para a polarização dos MAT podendo gerar genotoxicidade (MOSSER; EDWARDS, 2008). Os tratamentos com LPS e CMC6 induziram acúmulo de fragmentação do DNA quantificada através da técnica de cometa, e o silenciamento de BRCA-1 foi determinante para um maior dano ao material genético nestes grupos, o que demonstra a importância da via de reparo BRCA-1 dependente em conter genotoxicidade nas determinadas situações. A análise de ciclo celular mostra que os tratamentos com LPS e CMC6 causam parada em G1/S, indicando que estas células estejam em menor taxa de proliferação e/ou com aumento de morte. Os resultados de viabilidade celular revelam que os macrófagos que receberam CMC6 apresentaram menor densidade celular e que o silenciamento de BRCA-1 reduz potencialmente a viabilidade celular. Os macrófagos silenciados também foram afetados neste parâmetro quando expostos a LPS enquanto que o mesmo tratamento nas células não silenciadas não apresentou diferenças com o controle. Nesse sentido, a proteína BRCA-1 mostra-se como uma peça importante na viabilidade de macrófagos durante suas respostas inflamatórias aqui estudadas, nas quais há o envolvimento de mecanismos que possam culminar em dano ao DNA e morte celular. Estudos prévios mostram que BRCA-1 pode

favorecer a sobrevivência celular por interagir com o fator de transcrição Nrf2 e assim conferir aumento da capacidade antioxidante (GORRINI *et al.*, 2013); BRCA-1 também atua como fator crítico na transição entre as fases G1/S e G2/M do ciclo celular (HUEN; SY; CHEN, 2010), além de apresentar atividade anti-apoptótica (QUINN *et al.*, 2003).

A classificação de macrófagos ativados pela via clássica e alternativa é uma alternativa para distinguir as respostas Th1 (pró-inflamatórias) e Th2 (anti-inflamatórias) respectivamente, a linfócitos T. Macrófagos ativados pela via clássica regulam a resposta inflamatória aguda e são ativados por lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS), interferon- γ (IFN- γ) e pelo fator de necrose tumoral- TNF- α . Apresentam os marcadores CD40, CD80, CD16/32, CD86, expressam citocinas como TNF- α , interleucina-6 e 12 além de possuírem atividade fagocítica e alta capacidade de apresentação de antígenos a células T (ZHU *et al.*, 2017). Macrófagos ativados pelas vias alternativas reduzem o processo inflamatório e promovem reparo tecidual. Apesar de amplo, o perfil alternativo pode ser induzido por IL-4, IL-10, IL-13 e também pelo fator estimulante de colônia de fagócito mononuclear sintetizado por células mesenquimais (M-CSF). Estudos com abordagem em tumores, incluindo glioblastomas, inferem que MAT expressam tanto marcadores de ativação clássica quanto alternativa dependendo do estágio de crescimento de área tumoral analisada (LAOUI *et al.*, 2011; MOVAHEDI *et al.*, 2010; SZULZEWSKY *et al.*, 2015). Apesar da importância do quadro pró-inflamatório de macrófagos em neoplasias, a literatura mostra que tumores são capazes de promover uma sinalização com estas células e os induzir ao perfil alternativo, e tal alteração é diretamente associada com a progressão e invasividade das células

transformadas (JETTEN *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2017). Por análise de microscopia óptica observamos que os tratamentos com LPS e meio condicionado de gliomas (CMC6) alteraram a morfologia das células após 24 horas de exposição com o aparecimento de extensões de membrana (pseudópodes) e vesículas fagolisossômicas intracelulares - característico da ativação clássica de macrófagos- enquanto o tratamento com IL-4 não causou diferenças morfológicas significativas. O silenciamento de BRCA-1 não causou diferenças significativas entre os tratamentos como pode ser evidenciado nas imagens obtidas por microscopia. Ao avaliarmos marcadores de ativação clássica e alternativa observamos que o silenciamento de BRCA-1 comprometeu a expressão de TNF- α e IL-6 além de diminuir a secreção de TNF- α no meio de cultura uma vez que estes parâmetros foram estimulados por LPS e CMC6. Paralelamente, as células deficientes em BRCA-1 apresentaram maiores níveis de IL-10 e TGF- β quando em contato com CMC6, indicando a presença de marcadores anti-inflamatórios significativamente aumentados neste grupo. Além disso, o silenciamento de BRCA-1 comprometeu a atividade fagocítica em todos os grupos de tratamento em que houve estímulo da atividade pelas exposições a LPS e CMC6, evidenciando um aspecto fisiológico importante para a perda de capacidade funcional dos macrófagos. Estudos prévios concordam com os nossos achados, mostrando que monócitos isolados de mulheres saudáveis com mutações deletérias em BRCA-1 apresentam menores níveis nos marcadores para TNF- α e IL-6 quando comparadas aos monócitos de mulheres com expressão constitutiva de BRCA-1 ao serem estimulados com LPS (ZIELINSKI *et al.*, 2003). Em contraste, a queda da expressão de IL-6 causada pelo

silenciamento de BRCA-1 não foi acompanhada de uma diminuição de sua secreção, evidenciando que podem existir outros fatores que estejam atuando no intervalo entre a expressão e a secreção como a reciclagem de endossomos, a qual pode explicitar peculiaridades entre a secreção de TNF- α e IL-6 durante respostas inflamatórias (MANDERSON *et al.*, 2007). Experimentos com terapia gênica, focando a superexpressão de BRCA-1, revelam que animais apresentam melhores parâmetros de sobrevivência e resposta inflamatória em modelo de choque séptico (TEOH *et al.*, 2013). Paralelamente, a produção e secreção de metaloproteinases (MMP-2 e 9, principalmente) é um fator chave desempenhado por macrófagos ativado por via clássica (LEE; LAN TRAN; VAN TA, 2009) Por outro lado, a produção de MMP's por macrófagos pode ser induzida pelo microambiente tumoral, causando mudanças fenotípicas destas células relacionadas ao perfil alternativo de ativação e, desta forma, contribuindo para angiogênese e progressão tumoral (LIU *et al.*, 2013). Nossos resultados mostram que os tratamentos com LPS e CMC6 induziram aumento significativo de MMP-2 e MMP-9 após 24 horas de exposição e que o silenciamento de BRCA-1 não causou alteração significativa do resultado. Com isso, podemos afirmar que o silenciamento de BRCA-1 atenua o aumento de marcadores pró-inflamatórios em macrófagos estimulados por LPS e por CMC6 sem alterar os parâmetros relativos à atividade das metaloproteinases, além de aumentar marcadores anti-inflamatórios como IL-10 e TGF- β quando o meio tumoral é mimetizado, proporcionando tanto a diminuição do perfil antitumoral destes macrófagos frente a neoplasias quanto o aumento da presença de marcadores que favorecem a progressão deste tipo de tumor. Estudos prévios mostram que a

produção de TGF- β por macrófagos associados a tumores favorece o desenvolvimento do câncer de pulmão e o crescimento de neoplasias gliais (KENNEDY *et al.*, 2013; POON *et al.*, 2017). Por sua vez, IL-10 secretada por macrófagos promove tumorigênese, através da ativação da via JAK2/STAT3 de gliomas (QI *et al.*, 2016). Também é importante salientar que MAT podem apresentar plasticidade fenotípica frente a células tumorais, expressando marcadores pró e anti-inflamatórios (BLOCH *et al.*, 2013; POON *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2017). Apesar disso, é bem considerado pela literatura que o aumento de marcadores anti-inflamatórios em MAT apresenta correlação com mau-prognóstico em diferentes neoplasias (BLOCH *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013; STANDIFORD *et al.*, 2011). Os dados da literatura reforçam nossos achados que descrevem a proteína BRCA-1 como tendo um papel importante na polarização de macrófagos, principalmente durante a geração de estímulos pró-inflamatórios por LPS e através do contato com meio condicionado de glioblastomas, diminuindo a capacidade inflamatória e aumentando marcadores de ativação alternativa destes fagócitos.

Há uma linha tênue que divide o papel da autofagia tanto em vias que induzem sobrevivência quanto em vias que se destinam para morte celular. Dependendo do cenário, a autofagia confere resistência ao estresse, aumentando a adaptação e suprimindo apoptose. A medida que as células não resistem as causas de estresse, podem utilizar o mecanismo para promover uma via alternativa de morte celular que sucede a autofagia. (MAIURI *et al.*, 2007). Em macrófagos associados a tumores, a autofagia possui papel importante em torno do surgimento e manutenção do fenótipo anti-inflamatório, contribuindo para proliferação e invasividade das células transformadas

(CHANG *et al.*, 2013a; LIU *et al.*, 2013). O fator de transcrição NF- κ B apresenta-se como um dos mais decisivos elementos na resposta de macrófagos a estímulos inflamatórios (BISWAS; LEWIS, 2010). Paralelamente, se sabe que o aumento da autofagia em MAT é relacionado com a degradação lisossomal da subunidade p65- interação determinante para a manutenção do perfil anti-inflamatório de macrófagos expostos a meio condicionado de linhagem de hepatoma (CHANG *et al.*, 2013a). Nossos achados mostram que o silenciamento de BRCA-1 elevou o número de células autofágicas e comprometeu a transativação de NF- κ B, com maior evidência nos grupos em que receberam LPS e CMC6, corroborando com dados da literatura que inferem uma possível relação entre o aumento da autofagia com a diminuição das respostas dependentes de NF- κ B (CHANG *et al.*, 2013a, 2013b). No entanto, mais estudos são necessários com uma maior variedade de parâmetros que demonstrem uma relação direta entre o aumento da autofagia e a transativação de NF- κ B.

BRCA-1 é uma proteína que pode apresentar papéis adicionais ao de reparo genômico, como, por exemplo, atuar como ligante de diferentes proteínas e fatores de transcrição. Estudos prévios mostram que BRCA-1 interagem com proteínas como p53, ATF-1 e Nrf2 servido como co-ativador transcricional (GORRINI *et al.*, 2013; HOUVRAS *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 1998). Adicionalmente, dados da literatura mostram que BRCA-1 pode atuar como uma proteína estabilizadora da subunidade p65 de NF- κ B, desta forma, estabilizando a interação do fator com a enzima RNA polimerase II aumentando sua atividade transcricional (BENEZRA *et al.*, 2003). Os tratamentos com LPS e CMC6 causaram aumento da transativação de NF- κ B e

o silenciamento de BRCA-1 atenuou a atividade do fator de transcrição, o qual pode ser relacionado com os menores níveis de TNF- α e IL-6, sendo que estas interleucinas são responsivas à ativação de p65 (BISWAS; LEWIS, 2010; TANIGUCHI; KARIN, 2018). Paralelamente, os resultados de *docking* molecular mostram que o domínio BRCT conservado da proteína BRCA-1 é capaz de formar pontes de hidrogênio e interagir fisicamente com p65. Nesse sentido, a expressão constitutiva da proteína BRCA-1 pode ser considerada um fator determinante na atividade de macrófagos dependente deste fator de transcrição em diferentes contextos inflamatórios (BISWAS; LEWIS, 2010; MOSSER; EDWARDS, 2008). Outros dados da literatura complementam nossos resultados ao mostrar que a interação entre BRCA-1-p65 é considerada uma comunicação importante não somente na transcrição de genes responsivos a p65, mas também em aumentar a eficiência do sistema de reparo em combater danos de dupla fita na molécula de DNA (VOLCIC *et al.*, 2012). Decidimos então avaliar a possível relação entre BRCA-1 e p65 nas células RAW 264.7, e observamos que a expressão de BRCA-1 conservada apresentou relação com uma maior marcação nuclear de p65 nas células expostas a LPS e CMC6 quantificada por imunocitoquímica, indicando que o silenciamento de BRCA-1 afeta não somente a atividade transcricional de NF- κ B, mas como sua presença a nível nuclear. Nesse sentido, mais estudos são necessários para esclarecer se a proteína BRCA-1 é capaz de interagir fisicamente com p65 no núcleo das células RAW 264.7 e, desta forma, também analisar se genes responsivos estariam sofrendo alterações devido a esta possível interação, como demonstrado em estudos prévios (BENEZRA *et al.*, 2003).

Por fim, nossos resultados mostraram comprometimento da atividade pró-inflamatória associado a maior fragmentação do DNA em macrófagos estimulados por LPS quando a expressão de BRCA-1 é atenuada por RNA de interferência, sendo que as mesmas células estimuladas por IL-4 apresentaram pouca variação dos parâmetros inflamatórios associadas ao silenciamento de BRCA-1. Observamos também, sobreposição de mediadores pró e anti-inflamatórios nos macrófagos expostos a CMC6, validando dados prévios da literatura que descrevem a presença destes marcadores para os diferentes perfis dentro da mesma massa tumoral (SZULZEWSKY *et al.*, 2015). Adicionalmente, podemos notar que as células silenciadas para BRCA-1 apresentam menores níveis dos marcadores pró-inflamatórios e menor atividade de NF- κ B associados ao níveis elevados de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 e TGF- β bem como uma maior quantidade de células com incorporação de acridina e menor sobrevivência, mecanismos que estão envolvidos na resposta imunossupressora do organismo frente a neoplasias e normalmente associado com mau prognóstico (GORDON, 2003; HAN *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2013; YANG; PANG; MOSES, 2010).

6. CONCLUSÕES

Consideramos que o silenciamento de BRCA-1 interferiu pouco nos parâmetros obtidos das células expostas a IL-4, já que BRCA-1 mostrou-se como fator importante na manutenção das respostas NF- κ B dependentes e macrófagos estimulados por IL-4 apresentam ativação de STAT6 a qual causa inibição citosólica de NF- κ B, impedindo o fator de transcrição de migrar para o núcleo e ativar genes responsivos. (BISWAS; LEWIS, 2010). Em contrapartida, os resultados encontrados nos macrófagos tratados com LPS com baixa expressão de BRCA-1 são bem referenciados; nestas situações há produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, exigindo que a célula mantenha seus mecanismos de reparo funcionando o mais plenamente possível para garantir funcionalidade e sobrevivência no insulto inflamatório. Os resultados dos macrófagos expostos a CMC6 sugerem um papel importante para a proteína BRCA-1, e que talvez esta resposta tenha relação com uma possível ausência de interação entre BRCA-1 e p65 a nível nuclear decorrente de mutação ou do silenciamento da proteína de reparo. Atualmente, o histórico familiar referente a mutações em BRCA-1 não é considerado um fator de risco para o surgimento de tumores gliais. Além disso, existem poucos estudos de caso inferindo correlação positiva ou até mesmo ausente entre mutações em BRCA-1 e o surgimento de tumores cerebrais (BOUKERROUCHA *et al.*, 2015; ELMARIAH *et al.*, 2006). Nesse sentido, nosso estudo enfatiza que o papel da proteína BRCA-1 em MAT merece melhor investigação devido a sua capacidade em não somente evitar acúmulo de dano ao DNA e morte celular destas células imunes, mas também influenciar diretamente a resposta

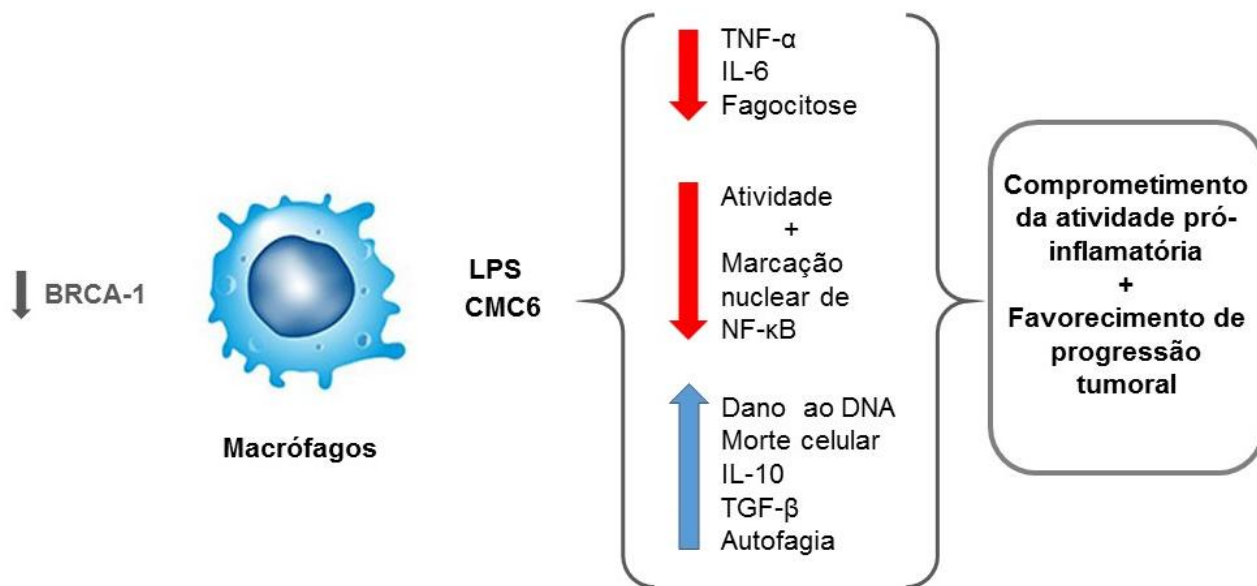


Figura 4: resumo esquemático da relação entre a expressão de BRCA-1 e os resultados referentes a ativação de macrófagos encontrados neste trabalho.

7. PERSPECTIVAS

Tendo em vista o concluído, as perspectivas deste trabalho são listadas abaixo:

- Avaliar o tipo de morte celular que esteja comprometendo a viabilidade celular dos macrófagos quando BRCA-1 é silenciada;
- Validar por ensaio de imunoprecipitação a interação BRCA-1/p65 em células RAW 264.7;
- Adicionar aos grupos de tratamentos células transfectadas com plasmídeos contendo constructos causando superexpressão da proteína BRCA-1 e analisar se a produção de citocinas pró-inflamatórias é retomada;
- Estudar o mecanismo em culturas primárias de monócitos obtidas de camundongos *knockout* para BRCA-1 e analisar se os resultados obtidos com os tratamentos se refletem numa situação além do *in vitro*.
- Utilizar modelos pré-clínicos de glioblastoma em camundongos *knockout* para BRCA-1 e analisar se a expressão da proteína altera a suscetibilidade à temozolomida (quimioterápico padrão para o tratamento de gliomas) e a melhora na sobrevida dos animais frente à neoplasia induzida em modelo animal de gliomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTS-DE JONG, M. *et al.* BRCA1/2 mutation carriers are potentially at higher cardiovascular risk. **Critical reviews in oncology/hematology**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 159–71, 2014. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24529552>. Acesso em: 15 dez. 2014.

AUDEH, M. William *et al.* Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: A proof-of-concept trial. **The Lancet**, [S. l.], v. 376, n. 9737, p. 245–251, 2010.

BAE, Insoo *et al.* BRCA1 induces antioxidant gene expression and resistance to oxidative stress. **Cancer research**, [S. l.], v. 64, n. 21, p. 7893–909, 2004.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520196>. Acesso em: 12 nov. 2014.

BENEZRA, Miriam *et al.* BRCA1 augments transcription by the NF- κ B transcription factor by binding to the rel domain of the p65/RelA subunit. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 278, n. 29, p. 26333–26341, 2003.

BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, Claire E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **The Journal of pathology**, [S. l.], v. 196, n. 3, p. 254–65, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11857487>. Acesso em: 6 jan. 2015.

BISWAS, Subhra K. *et al.* A distinct and unique transcriptional program expressed by A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- B and enhanced IRF-3 / STAT1

activation). **Blood**, [S. l.], v. 107, n. 5, p. 2112–22, 2006. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269622>

BISWAS, Subhra K.; LEWIS, Claire E. NF- κ B as a central regulator of macrophage function in tumors. **Journal of leukocyte biology**, [S. l.], v. 88, n. 5, p. 877–84, 2010. Disponível em:
<http://www.jleukbio.org/content/88/5/877.abstract>

BLOCH, Orin *et al.* Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 19, n. 12, p. 3165–3175, 2013.

BOUKERROUCHA, Meriem *et al.* BRCA1 germline mutation and glioblastoma development: report of cases. **BMC cancer**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 181, 2015.
Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/15/181>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25880076>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4377178>

BRÜNE, Bernhard *et al.* Redox control of inflammation in macrophages. **Antioxidants & redox signaling**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 595–637, 2013.
Disponível em:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3718318&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 29 nov. 2014.

BYRSKI, T. *et al.* Pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. **Breast cancer research and treatment**, [S. l.], v. 147, n. 2, p. 401–5, 2014. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129345>

CELADA, A. *et al.* Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. **The Journal of experimental medicine**, [S. l.], v. 160, n. 1, p. 55–74, 1984. Disponível em: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.160.1.55>

CHANG, C. P. *et al.* TLR2-dependent selective autophagy regulates NF- κ B lysosomal degradation in hepatoma-derived M2 macrophage differentiation. **Cell death and differentiation**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 515–23, 2013 a. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3569990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 9 dez. 2014.

CHANG, Chih Peng *et al.* Targeting NF κ B by autophagy to polarize hepatoma-associated macrophage differentiation. **Autophagy**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 619–621, 2013 b.

CHANG, Suhwan *et al.* Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155. **Nature medicine**, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 1275–82, 2011. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3501198&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 11 dez. 2014.

CLAPPERTON, Julie a *et al.* Structure and mechanism of BRCA1 BRCT domain recognition of phosphorylated BACH1 with implications for cancer. **Nature structural & molecular biology**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 512–518, 2004. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nsmb775>

COMEAU, Stephen R. *et al.* ClusPro: A fully automated algorithm for protein-protein docking. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 32, n. WEB SERVER ISS.,

p. 96–99, 2004.

COUCH, Fergus J. *et al.* Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 304–311, 2015.

DE OLIVEIRA, Marcos Roberto *et al.* Total and mitochondrial nitrosative stress, decreased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and glutamate uptake, and evidence of endoplasmic reticulum stress in the hippocampus of vitamin A-treated rats. **Neurochemical research**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 506–17, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188516>. Acesso em: 31 dez. 2014.

DOYLE, Anthony G. *et al.* Interleukin- 13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: Comparison with interleukin- 4 and interferon- γ . **European Journal of Immunology**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 1441–1445, 1994.

ELMARIAH, Sarina B. *et al.* Multicentric glioblastoma multiforme in a patient with BRCA-1 invasive breast cancer. **Breast Journal**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 470–474, 2006.

ESCALANTE, Carlos R. *et al.* Structure of NF- κ B p50/p65 heterodimer bound to the PRDII DNA element from the interferon- β promoter. **Structure**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 383–391, 2002.

FINCH, Amy *et al.* Frequency of premature menopause in women who carry a BRCA1 or BRCA2 mutation. **Fertility and sterility**, [S. l.], v. 99, n. 6, p. 1724–8, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23414920>. Acesso

em: 30 dez. 2014.

FRAPPIER, Vincent; CHARTIER, Matthieu; NAJMANOVICH, Rafael J. ENCoM server: Exploring protein conformational space and the effect of mutations on protein function and stability. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 43, n. W1, p. W395–W400, 2015.

FRAPPIER, Vincent; NAJMANOVICH, Rafael J. A Coarse-Grained Elastic Network Atom Contact Model and Its Use in the Simulation of Protein Dynamics and the Prediction of the Effect of Mutations. **PLoS Computational Biology**, [S. l.], v. 10, n. 4, 2014.

GORDON, Siamon. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews. Immunology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 23–35, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246403>

GORDON, Siamon; MARTINEZ, Fernando O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510870>. Acesso em: 10 jul. 2014.

GORRINI, Chiara *et al.* BRCA1 interacts with Nrf2 to regulate antioxidant signaling and cell survival. **The Journal of experimental medicine**, [S. l.], v. 210, n. 8, p. 1529–44, 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3727320&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 nov. 2014.

GROBBEN, Bert; DE DEYN, Peter Paul; SLEGERS, Herman. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion.

Cell and Tissue Research, [S. l.], v. 310, n. 3, p. 257–270, 2002.

HAN, Jianfeng *et al.* TGF- β signaling and its targeting for glioma treatment.

American journal of cancer research, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 945–55, 2015.

Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26045979>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4449428>

HELD-FEINDT, Janka *et al.* CX3CR1 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs). **Experimental Cell Research**, [S. l.], v. 316, n. 9, p. 1553–1566, 2010. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.018>

HOUVRAS, Y. *et al.* BRCA1 physically and functionally interacts with ATF1.

Journal of Biological Chemistry, [S. l.], v. 275, n. 46, p. 36230–36237, 2000.

HUEN, Michael S. Y.; SY, Shirley M. H.; CHEN, Junjie. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 138–148, 2010. Disponível em:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm2831>

<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm2831>

JETTEN, Nadine *et al.* Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1

macrophages promote angiogenesis in vivo. **Angiogenesis**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 109–118, 2014.

Jl, Guiyuan *et al.* Genistein suppresses LPS-induced inflammatory response through inhibiting NF- κ B following AMP kinase activation in RAW 264.7

macrophages. **PloS one**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. e53101, 2012. Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3534028&tool=pmce>

ntrez&rendertype=abstract. Acesso em: 20 nov. 2014.

KAPCZINSKI, Flávio *et al.* Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. **Journal of psychiatric research**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 156–61, 2011.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541770>. Acesso em: 17 dez. 2014.

KENNEDY, Benjamin C. *et al.* Tumor-associated macrophages in glioma:

Friend or foe? **Journal of Oncology**, [S. l.], v. 2013, 2013.

KIM, In Deok; HA, Bae Jin. Paeoniflorin protects RAW 264.7 macrophages from LPS-induced cytotoxicity and genotoxicity. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 23, n.

6, p. 1014–1019, 2009. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.019>

KONG, Xiaoni *et al.* NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species mediate amplified TLR4 signaling and sepsis-induced mortality in Nrf2-deficient mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 185, n. 1, p.

569–77, 2010. Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2913313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 15 dez. 2014.

KOZAKOV, Dima *et al.* PIPER: An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S. l.],

v. 65, n. 2, p. 392–406, 2006. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17705269>

KREIDER, Timothy *et al.* Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Current opinion in immunology**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 448–53,

2007. Disponível em:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095279150700115X>

KU, Min Chi *et al.* GDNF mediates glioblastoma-induced microglia attraction but not astrogliosis. **Acta Neuropathologica**, [S. l.], v. 125, n. 4, p. 609–620, 2013.

LAOUI, Damya *et al.* Mononuclear phagocyte heterogeneity in cancer: Different subsets and activation states reaching out at the tumor site. **Immunobiology**, [S. l.], v. 216, n. 11, p. 1192–1202, 2011. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2011.06.007>

LEE, Yun-Song; LAN TRAN, Huong Thi; VAN TA, Quang. Regulation of expression of matrix metalloproteinase-9 by JNK in Raw 264.7 cells: presence of inhibitory factor(s) suppressing MMP-9 induction in serum and conditioned media. **Experimental and Molecular Medicine**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 259, 2009. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.3858/emm.2009.41.4.029>

LI, Jing *et al.* The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment.

Oncotarget, [S. l.], 2017. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722681>

LIN, Elaine Y. *et al.* Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. **Cancer Research**, [S. l.], v. 66, n. 23, p. 11238–11246, 2006.

LIU, C. Y. *et al.* M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. **Lab Invest**, [S. l.], v. 93, n. 7, p. 844–854, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23752129>

LIU, Yan-Cun *et al.* Macrophage polarization in inflammatory diseases.

International journal of biological sciences, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 520–9,

2014. Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4046879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 22 dez. 2014.

MACKANESS, G. B. CELLULAR RESISTANCE TO INFECTION. **Journal of**

Experimental Medicine, [S. l.], v. 116, n. 3, p. 381–406, 1962. Disponível em:

<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.116.3.381>

MAIURI, M. Chiara *et al.* Self-eating and self-killing: crosstalk between

autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v.

8, n. 9, p. 741–752, 2007. Disponível em:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm2239>

MANCINO, Alessandra; LAWRENCE, Toby. Nuclear factor-kappaB and tumor-associated macrophages. **Clinical cancer research : an official journal of the**

American Association for Cancer Research, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 784–9,

2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103670>. Acesso

em: 16 mar. 2017.

MANDERSON, Anthony P. *et al.* Subcompartments of the macrophage

recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF α . **Journal**

of Cell Biology, [S. l.], v. 178, n. 1, p. 57–69, 2007.

MANTOVANI, Alberto *et al.* Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes.

Trends in Immunology, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 549–555, 2002.

MANTOVANI, Alberto *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.

MARTINEZ, Fernando O.; GORDON, Siamon. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, [S. l.], v. 6, n. March, p. 1–13, 2014. Disponível em:
<http://www.f1000.com/prime/reports/b/6/13>

MIKI, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 266, n. 5182, p. 66–71, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545954>.
Acesso em: 15 nov. 2014.

MILLS, Charles D. *et al.* M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 164, n. 12, p. 6166–6173, 2000.
Disponível em:
<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.164.12.6166>

MOSMANN, T. R. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 136, n. 7, p. 2348–57, 1986.
Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419430>

MOSSER, David M.; EDWARDS, Justin P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews. Immunology**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 958–69, 2008. Disponível em:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2724991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 9 jul. 2014.

MOVAHEDI, Kiavash *et al.* Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. **Cancer Research**, [S. l.], v. 70, n. 14, p. 5728–5739, 2010.

MURRAY, Peter J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>

NATHAN, Carl F. *et al.* Identification of interferon- γ , as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 158, n. 3, p. 670–689, 1983. Disponível em: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.158.3.670>

ODEGAARD, Justin I. *et al.* Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, [S. l.], v. 447, n. 7148, p. 1116–20, 2007. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2587297&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 10 dez. 2014.

OECKINGHAUS, Andrea; HAYDEN, Matthew S.; GHOSH, Sankar. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. **Nature immunology**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 695–708, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21772278>. Acesso em: 25 jul. 2014.

OHMORI, Y.; HAMILTON, T. A. IL-4-induced STAT6 suppresses IFN- γ -stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 159, n. 11, p. 5474–82, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9548487>. Acesso em: 30 dez. 2014.

OKADA, M.; SAIO, M.; KITO, Y.; OHE, N.; YANO, H.; YOSHIMURA, S.; IWAMA, T.; TAKAMI, T. Tumor-associated macrophage/microglia infiltration in human gliomas is correlated with MCP-3, but not MCP-1. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 1261–9, 2009. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/ijo/34/6/1621>

PACE, J. L. *et al.* Macrophage activation: Priming activity from a T-cell hybridoma is attributable to interferon- γ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 80, n. 12 I, p. 3782–3786, 1983.

PASQUALI, Matheus A. B. *et al.* Retinol and retinoic acid modulate catalase activity in Sertoli cells by distinct and gene expression-independent mechanisms. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 1177–83, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18440196>. Acesso em: 13 dez. 2014.

PLATTEN, Michael *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. **Annals of Neurology**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 388–392, 2003.

POLLARD, J. W. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 84, n. 3, p. 623–630, 2008. Disponível em: <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.1107762>

POON, Candice C. *et al.* Glioblastoma-associated microglia and macrophages: targets for therapies to improve prognosis. **Brain**, [S. l.], v. 140, n. 6, p. 1548–1560, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/aww355>

QI, Ling *et al.* IL-10 secreted by M2 macrophage promoted tumorigenesis through interaction with JAK2 in glioma. **Oncotarget**, [S. l.], v. 7, n. 44, p. 71673–71685, 2016.

QUINN, Jennifer E. *et al.* BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer Research**, [S. l.], v. 63, n. 19, p. 6221–6228, 2003.

RUFFELL, Daniela *et al.* A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 106, n. 41, p. 17475–80, 2009. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2762675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

SCHYMKOWITZ, Joost *et al.* The FoldX web server: An online force field. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 33, n. SUPPL. 2, p. 382–388, 2005.

SCULLY, R.; LIVINGSTON, D. M. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. **Nature**, [S. l.], v. 408, n. 6811, p. 429–32, 2000.

Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2981135&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 30 dez. 2014.

SHIOZAKI, Eric N. *et al.* Structure of the BRCT repeats of BRCA1 bound to a BACH1 phosphopeptide: Implications for signaling. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 405–412, 2004.

STANDIFORD, T. J. *et al.* TGF- β -induced IRAK-M expression in tumor-

associated macrophages regulates lung tumor growth. **Oncogene**, [S. l.], v. 30, n. 21, p. 2475–84, 2011. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278795>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3102782>

STEIN, Michael *et al.* Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **The Journal of experimental medicine**, [S. l.], v. 176, n. 1, p. 287–92, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1613462>

SZULZEWSKY, Frank *et al.* Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 1–27, 2015.

TANIGUCHI, Koji; KARIN, Michael. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri.2017.142>

TEOH, H. *et al.* BRCA1 gene therapy reduces systemic inflammatory response and multiple organ failure and improves survival in experimental sepsis. **Gene therapy**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 51–61, 2013. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257935>. Acesso em: 30 nov. 2014.

THOMPSON, Deborah; EASTON, Douglas F. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 94, n. 18, p. 1358–65, 2002. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12237281>. Acesso em: 30 dez. 2014.

VOLCIC, Meta *et al.* NF- κ B regulates DNA double-strand break repair in

conjunction with BRCA1-CtIP complexes. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 181–195, 2012.

VURUSANER, Beyza; POLI, Giuseppe; BASAGA, Huveyda. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. **Free radical biology & medicine**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 7–18, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019631>. Acesso em: 14 dez. 2014.

WALSH, Christine S. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy? **Gynecologic Oncology**, [S. l.], v. 137, n. 2, p. 343–350, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.02.017>

WEI, Jun *et al.* Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 461–473, 2010.

WU, Qian *et al.* Structure of BRCA1-BRCT/Abraxas Complex Reveals Phosphorylation-Dependent BRCT Dimerization at DNA Damage Sites. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 434–448, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.017>

WYNN, Thomas A.; CHAWLA, Ajay; POLLARD, Jeffrey W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, [S. l.], v. 496, n. 7446, p. 445–55, 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3725458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 30 dez. 2014.

YANG, Li; PANG, Yanli; MOSES, Harold L. TGF-?? and immune cells: an

important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression.

Trends in Immunology, [S. l.], v. 31, n. 6, p. 220–227, 2010. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2010.04.002>

ZHANG, H. *et al.* BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. **Oncogene**, [S. l.], v. 16, n. 13, p. 1713–1721, 1998.

ZHAO, Changcheng *et al.* Nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) is required for NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 289, n. 24, p. 17020–9, 2014. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798340>. Acesso em: 31 out. 2014.

ZHU, Changbin *et al.* The contribution of tumor-associated macrophages in glioma neo-angiogenesis and implications for anti-angiogenic strategies.

Neuro-Oncology, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 54, 2017. Disponível em:

<https://academic.oup.com/neuro-oncology/article-lookup/doi/10.1093/neuonc/nox081>

ZHU, Quan *et al.* BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. **Nature**, [S. l.], v. 477, n. 7363, p. 179–84, 2011. Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3240576&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 30 dez. 2014.

ZIELINSKI, Christoph C. *et al.* Defect of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production and TNF-alpha-induced ICAM-1-expression in BRCA1 mutations carriers. **Breast cancer research and treatment**, [S. l.], v. 81, n. 2, p. 99–105, 2003. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14572152>. Acesso em: 21 dez. 2014.

APÊNDICE A - LISTA DE PUBLICAÇÕES NO PERÍODO VIGENTE 2015-2019

DE ASSIS, ADRIANO M.; RECH, ANDERSON; LONGONI, ALINE; **DA SILVA MORRONE, MAURÍLIO**; DE BITTENCOURT PASQUALI, MATHEUS A ; PERRY, MARCOS L.S ; SOUZA, DIOGO O. ; MOREIRA, JOSÉ C.F. . Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids revert renal responses induced by a combination of 2 protocols that increase the amounts of advanced glycation end product in rats. Nutrition Research (New York, N.Y.) **JCR**, v. 35, p. 512-522, 2015.

ZANOTTO-FILHO, ALFEU; BRAGANHOL, ELIZANDRA; KLAFKE, KARINA; FIGUEIRÓ, FABRÍCIO; TERRA, SÍLVIA RESENDE; PALUDO, FRANCIS JACKSON; **MORRONE, MAURÍLIO**; BRISTOT, IVI JULIANA; BATTASTINI, ANA MARIA; FORCELINI, CASSIANO MATEUS; BISHOP, ALEXANDER JAMES ROY; GELAIN, DANIEL PENS; MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO FONSECA. Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas. Cancer Letters (Print) **JCR**, v. 358, p. 220-231, 2015.

BORTOLIN, RAFAEL CALIXTO; GASPAROTTO, JUCIANO; DE VARGAS, AMANDA RODRIGUES; **MORRONE, MAURILIO DA SILVA**; KUNZLER, ALICE; HENKIN, BERNARDO SALDANHA; CHAVES, PALOMA RODRIGUES; RONCATO, SABRINA; GELAIN, DANIEL PENS; MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO FONSECA. Effects of Freeze-Thaw and Storage on Enzymatic Activities, Protein Oxidative Damage, and Immunocontent of the Blood, Liver, and Brain of Rats. Biopreservation and Biobanking **JCR**, v. 8, p. bio.2016.0023, 2016.

SOUZA, NATÁLIA CABRAL; DE OLIVEIRA, JULIANA

MEDEIROS; **MORRONE, MAURÍLIO DA SILVA**; ALBANUS, RICARDO D'OLIVEIRA; AMARANTE, MARIA DO SOCORRO MEDEIROS; CAMILLO, CHRISTINA DA SILVA; LANGASSNER, SILVANA MARIA ZUCOLOTTI; GELAIN, DANIEL PENS; Moreira, José Cláudio Fonseca; DALMOLIN, RODRIGO JULIANI SIQUEIRA; PASQUALI, MATHEUS AUGUSTO DE BITTENCOURT. Anti-Inflammatory Properties in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Journal Of Medicinal Food JCR*, v. 19, p. jmf.2016.0047, 2016.

MORRONE, M.S.; SCHNORR, CARLOS EDUARDO; BEHR, GUILHERME ANTÔNIO; GASPAROTTO, J.; BORTOLIN, R.C.; MORESCO, KARLA SUZANA; BITTENCOURT, LEONARDO; ZANOTTO-FILHO, ALFEU; GELAIN, D. P.; MOREIRA, J. C. F.. Oral administration of curcumin relieves behavioral alterations and oxidative stress in the frontal cortex, hippocampus, and striatum of ovariectomized Wistar rats. *Journal Of Nutritional Biochemistry JCR*, v. 32, p. 181-188, 2016.

DO PRADO, CARINE HARTMANN; GRASSI-OLIVEIRA, RODRIGO; WIECK, ANDRÉA; ZAPARTE, ALINE; FILHO, LEDO DARUY; **MORRONE, MAURILIO DA SILVA**; MOREIRA, JOSÉ C.; BAUER, MOISÉS EVANDRO. The impact of childhood maltreatment on redox state: relationship with oxidative damage and antioxidant defenses in adolescents with no psychiatric disorder. *Neuroscience Letters (Print) JCR*, v. 617, p. 173-177, 2016.

MORRONE, M.S.; SCHNORR, CARLOS EDUARDO; BEHR, GUILHERME ANTÔNIO; GASPAROTTO, J.; BORTOLIN, R.C.; MARTINELLO, K. B.; HENKIN, B. S.; RABELO, THALLITA KELLY; ZANOTTO-FILHO,

ALFEU; GELAIN, DANIEL PENS; MOREIRA, J. C. F.. Curcumin Supplementation Decreases Intestinal Adiposity Accumulation, Serum Cholesterol Alterations, and Oxidative Stress in Ovariectomized Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity (Print)* **JCR**, v. 2016, p. 1-12, 2016.

MORESCO, KARLA; SILVEIRA, ALEXANDRE; SCHNORR, CARLOS; ZEIDÁN-CHULIÁ, FARES; BORTOLIN, RAFAEL; BITTENCOURT, LEONARDO; MINGORI, MOARA; HEIMFARTH, LUANA; RABELO, THALLITA; **MORRONE, MAURILIO**; CARINI, JULIANA; GELAIN, DANIEL; BASSANI, VALQUIRIA; MOREIRA, JOSÉ. Supplementation with *Achyrocline satureioides* Inflorescence Extracts to Pregnant and Breastfeeding Rats Induces Tissue-Specific Changes in Enzymatic Activity and Lower Neonatal Survival. *Biomedicines*, v. 5, p. 53, 2017.

SOUZA, NATÁLIA CABRAL; DE OLIVEIRA, JULIANA MEDEIROS; **MORRONE, MAURÍLIO DA SILVA**; ALBANUS, RICARDO D'OLIVEIRA; AMARANTE, MARIA DO SOCORRO MEDEIROS; CAMILLO, CHRISTINA DA SILVA; LANGASSNER, SILVANA MARIA ZUCOLOTTO; GELAIN, DANIEL PENS; MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO FONSECA; DALMOLIN, RODRIGO JULIANI SIQUEIRA; PASQUALI, MATHEUS AUGUSTO DE BITTENCOURT. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Anacardium occidentale* Leaf Extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **JCR**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

SOMENSI, NAUANA; BRUM, PEDRO OZORIO; DE MIRANDA RAMOS, VITOR; GASPAROTTO, JUCIANO; ZANOTTO-FILHO, ALFEU; ROSTIROLLA, DIANA CAROLINA; **DA SILVA MORRONE, MAURILIO**; MOREIRA,

JOSÉ CLAUDIO FONSECA; PENS GELAIN, DANIEL. Extracellular HSP70 Activates ERK1/2, NF- κ B and Pro-Inflammatory Gene Transcription Through Binding with RAGE in A549 Human Lung Cancer Cells. Cellular Physiology and Biochemistry **JCR**, v. 42, p. 2507-2522, 2017.

KLEBER SILVEIRA, ALEXANDRE; MORESCO, KARLA SUZANA; MAUTONE GOMES, HENRIQUE; **DA SILVA MORRONE, MAURÍLIO**; KICH GRUN, LUCAS; PENS GELAIN, DANIEL; DE MATTOS PEREIRA, LEANDRO; GIONGO, ADRIANA; RODRIGUES DE OLIVEIRA, RAFAEL; FONSECA MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) alters gut microbiota and modulates redox status, partially via caffeine in Wistar rats. Phytotherapy Research **JCR**, v. 32, p. 2466, 2018.

MORRONE, MAURILIO DA SILVA; SOMENSI, NAUANA; FRANZ, LUCAS; RAMOS, VITOR DE MIRANDA; GASPAROTTO, JUCIANO; DA ROSA, HELEN TAÍS; SARTORI, MARCELO; FIGUEIRÓ, FABRÍCIO; GELAIN, DANIEL PENS; ZANOTTO-FILHO, ALFEU; MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO FONSECA. BRCA-1 depletion impairs pro-inflammatory polarization and activation of RAW 264.7 macrophages in a NF- κ B-dependent mechanism. Molecular and Cellular Biochemistry **JCR**, V. 1, P. 1-1, 2019.