

**Projeto de Iniciação Científica
PIBIC 2020**

**Cultura 3D de Células de Câncer de Mama
como Modelo para Estudo de Novos Alvos
Terapêuticos**

ORIENTADOR: Sandra Martha Gomes Dias

Agosto 2020

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Metabolismo tumoral, glutaminases, inflamação associada ao câncer e macrófagos do tipo M2	1
1.2. Cultivo de células 3D para estudo do câncer	4
1.3 Ensaios de mamosferas para estudo de <i>cancer stem cells</i> de câncer de mama triplo negativo	6
2. Objetivos.....	8
2.2 Objetivos específicos	8
3. Metodologia	9
3.1 Linhagens.....	9
3.2 Estudos de esferoides.....	9
3.3 Estudos de mamosferas	10
3.4 Extração de monócitos primários de camundongos.....	11
3.5 Co-cultivo 3D de células de câncer de mama e macrófagos.....	12
3.6 Extração de RNA e PCR quantitativo.....	12
3.7 Imunofluorescência de esferas.....	13
4. Referências	15

Resumo

O modelo de estudos mais tradicional para investigações sobre o câncer é o de cultura 2D (monocamada) de células. Este é um modelo de fácil criação e reprodução, mas que possui poucas semelhanças com a variabilidade de um tumor. Alternativamente, modelos de cultura 3D de células tumorais apresentam maiores semelhanças à massa tumoral no organismo, mas também possuem diversos desafios técnicos associados. Nesse projeto, vamos estabelecer métodos de obtenção, análise e interpretação de dados de ensaios de *high content screening* para estudos de alvos terapêuticos no tratamento de câncer de mama, utilizando modelos de cultivo e co-cultivo de esferoides com e sem magnetização de células e de mamóferas a partir de *cancer stem cells*. Vamos aplicar estes três modelos em células de câncer de mama triplo-negativo para avaliar os processos de proliferação tumoral, potencial tumorigênico e interação entre tumor e macrófagos dependente das enzimas glutaminases 1 e 2.

1. Introdução

1.1 Metabolismo tumoral, glutaminases, inflamação associada ao câncer e macrófagos do tipo M2

O processo de replicação celular constante em células tumorais requer a síntese de moléculas de ácidos nucleicos, lipídios e proteínas. Para atender essa demanda, essas células necessitam de precursores biossintéticos que geram essas macromoléculas (DeNicola & Cantley, 2015; Zhu & Thompson, 2019). Neste sentido, o *intake* aumentado de nutrientes do microambiente tumoral é uma necessidade para essas células em alta taxa proliferativa (Pavlova & Thompson, 2016; Zhu & Thompson, 2019), causando um *shift* metabólico característico de células tumorais. Esta mudança no metabolismo é um dos marcos da transformação tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

Além da glicose, células cancerosas consomem uma grande quantidade do aminoácido glutamina (Hensley et al., 2013). O processamento da glutamina começa na mitocôndria com a enzima glutaminase. Em seguida, o glutamato é processado em α -cetoglutarato, tanto pela enzima glutamato desidrogenase quanto por diversas transaminases, o qual alimenta (e faz anaplerose) do ciclo do TCA (*tricarboxylic acid cycle* – ciclo do ácido cítrico) (Owen et al., 2002).

Dois genes diferentes, localizados em cromossomos distintos, codificam para as isoformas da glutaminase humana: o gene GLS codifica para as isoformas KGA (*Kidney-Type Glutaminase*) e GAC (*Glutaminase C*), ambas referenciadas como GLS; e o gene GLS2, que codifica para as isoformas LGA (*Liver-Type Glutaminase*) e GAB (*Glutaminase B*), ambas referenciadas como GLS2 (Hensley et al., 2013; Katt et al., 2017). Diversos estudos já confirmaram a correlação do aumento da expressão de *GLS* com altas taxas proliferativas e malignidade em células tumorais (Hensley et al., 2013; Katt et al., 2017), sendo, portanto, um alvo importante de inibição para promover o tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo câncer de mama ⁹. Um de seus mais potentes inibidores é o composto CB-839, que teve capacidade antiproliferativa observada nas linhagens de câncer de mama triplo negativo e modelos *in vivo* (Gross et al., 2014) e já está em testes clínicos fase I/II para combate de câncer de mama triplo negativo, entre outros tumores sólidos e tumores hematopoiéticos.

Em alguns trabalhos, GLS2 apresentou ter um papel supressor de tumor (Hu et al., 2010; Martín-Rufián et al., 2012; Suzuki et al., 2010; Zhang et al., 2016). No entanto, em recente publicação do grupo (Dias et al., n.d.), foi comprovado que GLS2 é importante para a progressão tumoral em câncer de mama. Os experimentos e resultados desenvolvidos no trabalho mostram a importância *in vivo* e *in vitro* de GLS2 para metástase tumoral de mama.

A relação causal entre inflamação, imunidade e câncer já está consolidada, tendo sido reportada como uma característica facilitadora para a progressão tumoral e um dos *hallmarks* do câncer (Hanahan & Weinberg, 2011). Vários mecanismos têm sido descritos em que células tumorais se utilizam de vias inflamatórias para promover o próprio crescimento e a colonização de tecidos distantes. Por exemplo, vias de sinalização de angiogênese e de atração de tipos celulares infiltradores no microambiente tumoral, como linfócitos, macrófagos e mastócitos, que promovem a progressão do tumor (Flier et al., 1986). Neste sentido, a inflamação estabelece um microambiente favorável à progressão tumoral e à ocorrência de metástases e mecanismos imunossupressores que evadem a resposta do sistema imune.

Os macrófagos são uma população de células do sistema imune com alto grau de heterogeneidade fenotípica e funcional. Estão amplamente distribuídos em todos os tecidos, compõem parte importante da resposta imune inata do hospedeiro contra infecções, e desempenham funções relacionadas a homeostase, reparação e desenvolvimento teciduais (Wynn et al., 2013). Nas últimas décadas, foram publicados inúmeros estudos relacionando o papel de macrófagos no microambiente tumoral (Liu & Cao, 2015), comumente denominados macrófagos associados a tumores (*tumor-associated macrophages* – TAMs). TAMs podem estimular a proliferação de células tumorais, induzir invasão e metástase e angiogênese e inibir a resposta antitumoral mediada por células T, contribuindo para a progressão tumoral (Grivennikov et al., 2011; Qian & Pollard, 2010). Diversos estudos clínicos apontaram para um pior prognóstico de pacientes cujos tumores continham maior infiltração de TAMs (Noy & Pollard, 2014).

Em resposta a diversos sinais, macrófagos podem ser ativados de maneira “clássica M1”, estimulados sumariamente por ligantes de TLRs (*toll-like receptors*) e IFN- γ ; ou de maneira “alternativa M2”, estimulados principalmente por IL-4 e IL-13.

O fenótipo M1 é caracterizado pela expressão de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, alta produção de espécies reativas intermediárias de nitrogênio e oxigênio, promoção da resposta Th1, e forte atividade microbicida e tumoricida. Em contraste, macrófagos do subtipo M2 estão envolvidos na resposta imune contra parasitas, promovem a remodelação tecidual e a progressão tumoral, e possuem funções imunorreguladoras. São caracterizados por eficiente atividade fagocitária e alta expressão de receptores de manose e galactose, importantes para a resposta de *wound healing* ou remodelamento tecidual (Sica & Mantovani, 2012).

A infiltração de macrófagos do subtipo M2 está relacionada com um pior prognóstico em diversos tipos de câncer, inclusive câncer de mama (Leek & Harris, 2002; Sica et al., 2006). A interação com infiltrados imunes, especialmente de macrófagos do subtipo M2, e células tumorais de mama pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da agressividade tumoral.

Em trabalho recente, nosso grupo de pesquisa mostrou o papel protumorigênico de GLS2 em um subgrupo de tumores de mama (Figura 1A-B, (Dias et al., n.d.)). Neste trabalho, verificou-se que GLS2 aumentou invasão *in vitro* e *in vivo* de tumores de mama, assim como o tamanho dos tumores primários, e níveis de marcadores mesenquimais (Polyak & Weinberg, 2009). Com o uso do CIBERSORT, um programa que infere a representação leucocitária de um total de transcritos obtidos de uma massa tumoral (Newman et al., 2015), observamos uma diminuição significativa nos macrófagos M1 em tumores com maior expressão de GLS2, acompanhado de aumento de M2 (Figura 1D). Os achados foram corroborados por outra análise imunogenômica realizada conforme algoritmo recentemente publicado (Thorsson et al., 2018). Com este algoritmo, tumores de mama divididos em alta e baixa expressão de GLS2 revelaram um perfil C4 (Figura 1D), o que está ligado a pior prognóstico, e apresentaram assinaturas relacionadas a baixo conteúdo de linfócitos e alta presença de macrófagos (principalmente M2), o que é consistente com um microambiente tumoral imunossuprimido e pior desfecho. Neste sentido, especulou-se uma possível relação entre expressão de GLS2 em

células tumorais de mama e polarização de macrófagos para o subtipo M2, o que pode ter relação com a progressão tumoral.

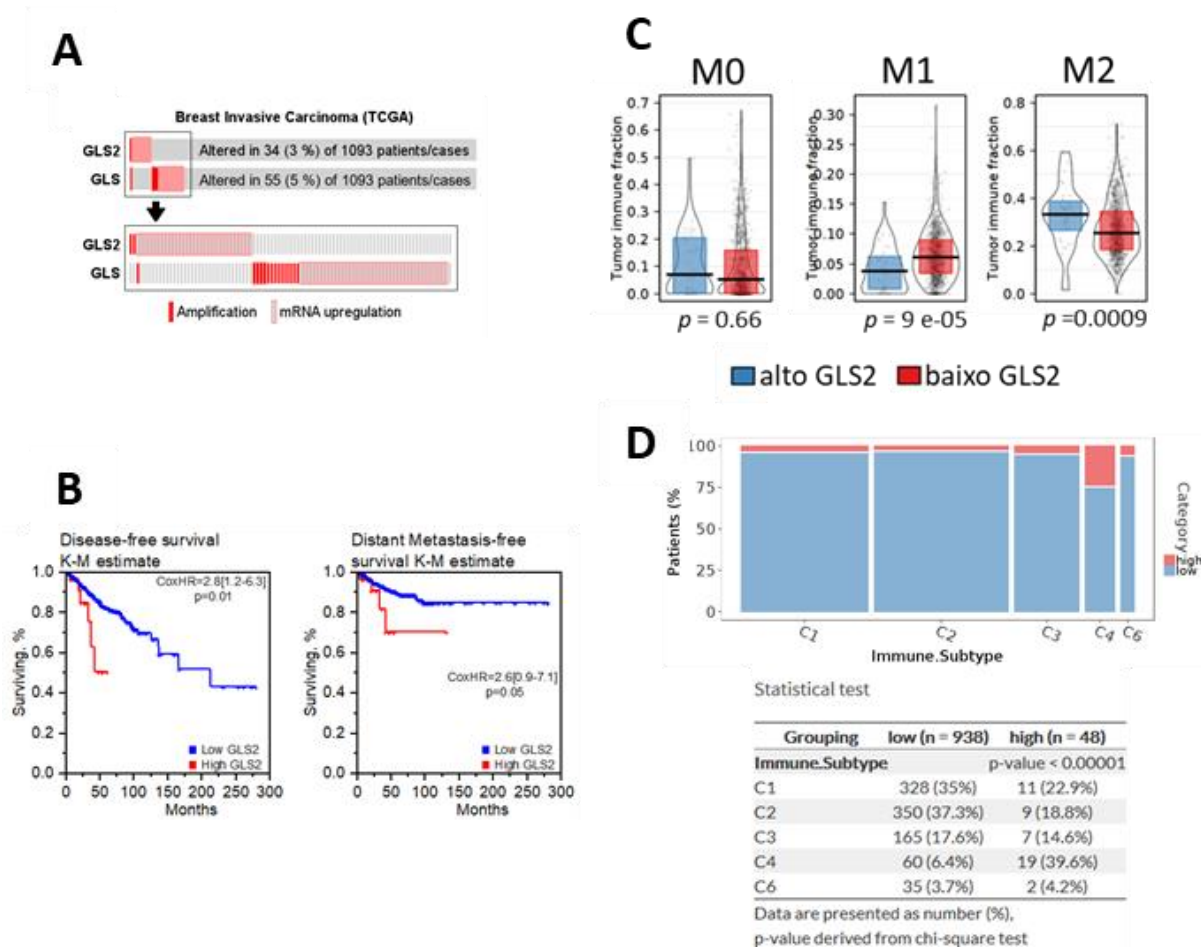


Figura 1 – GLS2 está ligado a pior prognóstico de grupo de pacientes de câncer de mama, o que pode estar relacionado com remodelamento da resposta imune. Dados de tumores de mama obtidos do TCGA mostram grupo com amplificação ou aumento de expressão (Z score > 2.5) de *GLS2* (A); aumento nos níveis de *GLS2* está ligado a pior sobrevida livre de recidiva e metástase (B); análise de assinatura gênica de tumores com alta e baixa expressão de *GLS2* sugerem aumento de infiltração de macrófagos M2 em tumores com alto *GLS2* (CIBERSORT, C) ou perfil imunológico C4 (D).

1.2. Cultivo de células 3D para estudo do câncer

Agregados *in vitro* de células-tronco e células tumorais denominados esferoides são usados há décadas como modelos para recapitular o ambiente tecidual *in vivo* (Kunz-Schughart et al., 2004; Mueller-Klieser, 1997; WARTENBERG et al., 2001). Esferoides podem ser estabelecidos a partir de um único tipo de célula ou a partir de misturas de vários tipos de células, como células tumorais, e diferentes células do estroma tais como as do sistema imune. Acredita-se que os esferoides imitem o comportamento do tumor de forma mais eficaz que a cultura

bidimensional convencional (2D). Esferoides, assim como os tumores, contêm células expostas à superfície e células profundamente infiltradas na massa tumoral; células proliferando e células não proliferativas; e células bem oxigenadas e hipóxicas (Frieboes et al., 2006). Em condições de crescimento tridimensionais (3D), os esferoides reproduzem parâmetros importantes dos microambientes tumorais, incluindo gradientes de oxigênio e nutrientes (Wenzel et al., 2014).

Esferoides de diversos tipos celulares já foram produzidos, como de câncer de mama (Calcagno et al., 2010; Ponti et al., 2005), cólon, próstata, entre outros, com o objetivo de se tornarem um modelo mais fiel às doenças que representam (Kunz-Schughart et al., 2004; Wenzel et al., 2014). Modelos 3D de co-cultura de linhagens tumorais e outras células como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais também já foram estabelecidos com o objetivo de mimetizar os componentes pertencentes ao microambiente tumoral (Devi et al., 2015; Dwyer et al., 2016; Noel et al., 2017; Rebelo et al., 2018).

Houve progresso significativo no desenvolvimento de modelos e técnicas de cultivo de células 3D nos últimos anos. O modelo de *hanging drop* utiliza placas especializadas para plaqueamento da suspensão celular e ferramentas para manipular os processos de troca de meio e adição de compostos (Tung et al., 2011). Neste modelo, as células são transferidas para placas separadas para análise. Outros modelos de formação de esferoides envolvem microambientes projetados para auxiliar na formação de estruturas 3D com estruturas extracelulares e matrizes (por exemplo, Matrigel), muito utilizados para o *screening* de drogas (Montanez-Sauri et al., 2013; Wang & Wang, 2014). A formação de esferoides em placas de fundo redondo de baixa adesão é outro método interessante, pois oferece um fluxo de trabalho mais simples e adequado para imagens de alto conteúdo (Vinci et al., 2012). Mais recentemente, abordagens que envolvem agregação das células por nanopartículas magnéticas associada a um ímã permitem a formação rápida das esferas, em apenas 24 horas, e em diversas replicatas para análise de *high content screening* (HCS) (Baillargeon et al., 2019).

Diferentes tipos de análises para esferoides foram descritas. Métodos comuns incluem a disrupção de esferoides e análise de lisados ou suspensões celulares com marcadores de viabilidade celular. Métodos de imageamento *high content* foram demonstradas como técnicas promissoras para caracterizar efeitos

de compostos químicos em esferoides, por exemplo. As imagens têm vantagens sobre outros métodos, como luminescência ou fluorescência baseada em leitor de placas, sem que haja extensiva manipulação dos esferoides e em que são possíveis várias leituras biológicas (Herrmann et al., 2007; Kunz-Schughart et al., 2004). A luz transmitida, por análise com microscópio de transmissão invertido comum, pode ser usada para verificar o tamanho dos esferoides e, em alguns casos, também a densidade. Imagens de fluorescência podem ser obtidas com tratamento dos esferoides com corantes de viabilidade celular, corantes de ligação ao DNA, corantes de apoptose ou outros marcadores (Waite & Roth, 2009). Alternativamente, as células podem ser transfectadas ou transduzidas com uma proteína fluorescente antes da formação de esferoides para permitir a detecção de mudanças no tamanho ou intensidade dos esferoides por fluorescência (Drewitz et al., 2011). O método pode ser estendido para modelos multicelulares mais complexos que expressam uma pluralidade de marcadores fluorescentes.

Normalmente, imagens de baixa ampliação são usadas para capturar uma imagem completa do esferoide, como em objetivas de magnificação de 2x e 10x, por exemplo. No entanto, essa abordagem limita a obtenção de informações sobre alterações no diâmetro dos esferoides, no conteúdo celular ou na intensidade média de fluorescência, por exemplo (Krausz et al., 2013). O uso de uma ampliação maior permite resolução de célula única e fornece informações estruturais e celulares do esferoide, mas o ganho de informação é acompanhado por aumento de complexidade de análise, principalmente em ensaios HCS. Portanto, o *software* de análise de imagem deve capturar um objeto relativamente grande com equilíbrio entre o máximo possível de detalhe e capacidade técnica de obtenção e análise de dados, permitindo comparações entre diferentes formatos de esferoides de diferentes tipos celulares, possibilitando a obtenção de IC50 de compostos em tratamentos, além de garantir reprodutibilidade e rendimento do ensaio.

1.3 Ensaios de mamóferas para estudo de *cancer stem cells* de câncer de mama triplo negativo

A teoria de *cancer stem cells* (CSCs) defende que, em uma população de células de câncer de mama, há apenas algumas células pluripotentes com capacidade

tumorigênica. Essas células são mais resistentes a terapias e possuem alta capacidade proliferativa, podendo se diferenciar nas diferentes linhagens que formam uma massa tumoral (Badve & Nakshatri, 2012)(Clevers, 2011). Apesar da teoria ser recente, já existem inúmeros tipos de ensaios para estudos das características de proliferação dessas células em diferentes tipos de câncer. Um desses ensaios é a cultura de mamíferas, baseada na capacidade das *CSCs* de se proliferarem suspensas em um meio de cultura, formando pequenas esferas a partir de expansão clonal de uma única célula (Alimperti et al., 2014)(Lombardo et al., 2015). Isso possibilita abrir novos estudos de tratamento de câncer de mama com foco em combate às *CSCs*, fazendo ensaios farmacológicos e estudos das propriedades metabólicas dessas células, que podem ser resistentes a tratamentos tradicionais e se proliferar de forma a causar a reincidência do câncer em pacientes tratados.

2. Objetivos

O objetivo desse projeto é empregar técnicas de cultivo 3D de células de câncer de mama triplo negativo para obtenção, análise e interpretação de dados relativos aos processos de proliferação celular, potencial tumorigênico e interação com macrófagos. O efeito das enzimas glutaminases para estes fenótipos será avaliado.

2.1 Objetivos específicos

- Realizar cultura de esferoides de câncer de mama triplo negativo e avaliar o efeito da inibição química e *knockdown* de GLS na proliferação/viabilidade celular;
- Realizar cultura de mamoesferas de linhagens de câncer de mama e avaliar o efeito da inibição química e *knockdown* de GLS no número e tamanho de mamoesferas;
- Desenvolver esferoides de co-cultivo de linhagem murina de câncer de mama triplo negativo com macrófagos murinos e avaliar se há relação entre expressão de GLS2 e polarização de macrófagos.

3. Metodologia

3.1 Linhagens

Vamos utilizar as linhagens de câncer de mama descritas na Tabela 1. Para os experimentos de co-cultura, usaremos a linhagem de câncer de mama triplo negativo murina 4T1 *Mock* (com vetor vazio) e 4T1 GAB (com superexpressão de GAB). As linhagens serão cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e, para as linhagens com vetores transduzidos, 1% penicilina/estreptomicina. Células serão mantidas em estufa à 37°C, 5% de CO₂.

Tabela 1 – Linhagens de câncer de mama

LINHAGEM	Sublinhagem	Característica
Hs578T	Parental	Triplo negativo
Hs578T	mKO2	Transduzida com gene mKO2, produz proteínas fluorescentes no laranja
Hs578T	shGFP	Transduzida com vetor que expressa RNAi shGFP, usada como controle
Hs578T	shGLS	Transduzida com vetor que expressa RNAi shGLS, <i>knockdown</i> do gene
MDA-MB-231	Parental	Triplo negativo
MCF7	Parental	Receptor Estrogênio +, Receptor Progesterona +, HER2-
4T1	<i>Mock</i>	Triplo negativa murina controle
4T1	GAB	Triplo negativa murina controle transduzida com vetor que expressa GAB

3.2 Estudos de esferoides

Para formação de esferoides por meio de magnetização celular, células Hs578T serão incubadas com 1 µL de *NanoShuttle*® (nanopartículas magnéticas) para cada 10⁴ células em solução, em meio RPMI suplementado. Em seguida, as células serão centrifugadas (300g, 5 minutos), o sobrenadante removido e as células lavadas com meio RPMI suplementado. O processo de lavagem será repetido 3 vezes.

Para formar esferoides, 25 mil células de Hs578T em 200 μ L de meio de cultura serão colocadas em placas *cell repellent* (Greiner). Ímãs serão colocados sob os poços por 24h, forçando a aproximação das células e incitando a formação de um agregado tridimensional. Os tratamentos nas esferas iniciam após 24h da retirada do ímã, com remoção de metade do volume de meio RPMI e adição do volume correspondente contendo o tratamento. Para crescimento de esferoides sem magnetização vamos adicionar 3-5 mil células por poço em placa 384 CellCarrier Spheroid ULA. Tratamento será feito sem remoção de meio de cultura.

Para obtenção de imagens das esferas após experimento, vamos adicionar 2 μ M de calceína, 10 μ g/mL de *Hoechst* e 4 μ g/mL de iodeto de propídeo. Os corantes serão incubados por 2 horas na estufa à 37°C, 5% de CO₂ e as placas levadas para obtenção de imagens no microscópio *Operetta® High Content Imaging System* (Perkin Elmer) com objetivas de 2x e 10x e em múltiplos planos focais (10 a 15). Os filtros de excitação/emissão para Calceína AM 1 (460-490nm/500-550nm), *Hoechst* 33342 (360-400nm/410-480nm) e iodeto de propídeo (520-550nm/640-680nm) serão utilizados e, também, imagens de campo claro (*Brightfield*). As imagens serão analisadas no *software Columbus®* (Perkin Elmer), versão 2.4.0, a partir de máscaras de análise ajustadas para cada experimento.

Para análise da ação citotóxica/citostática do inibidor de GLS será feito um ensaio de dose-resposta do composto CB-839 em esferas de Hs578T parental produzidas com e sem magnetização de células. O efeito do *knock down* de GLS também será avaliado pela comparação de raio e volume de esferoides obtido de Hs578t mock e com *knock down* de GLS.

3.3 Estudos de mamosferas

A formação de mamosferas será realizada adicionando células MCF-7, Hs578T (parental, shGFP ou shGLS) ou MDA-MB-231 em cada poço de uma placa de 96 poços *Ultra Low Attachment* (Cormning) contendo 200 μ L de *Mammosphere Human Medium Kit* (STEMCELL Technologies). No experimento para análise do impacto do inibidor de GLS na formação das mamosferas, a adição do veículo (DMSO 0,1%) ou de 1 μ M CB-839 será realizada concomitantemente ao plaqueamento (ou após formação das mesmas) e as células incubadas em estufa à 37°C, 5% CO₂, por 7-

20 dias.. Transcorrido o período, as mamosferas serão incubadas com 50 µg/ml de *Hoechst* 33342, 20 µM de calceína e 5 µg/ml de iodeto de propídeo por 2 horas. As células serão analisadas no microscópio *Operetta*® utilizando objetivas de 2x e 10x, em 3 planos focais distintos e com canais de emissão e excitação de Calceína AM 1, *Hoechst* e iodeto de propídeo. As imagens serão analisadas no *software Columbus*® (*Perkin Elmer*), versão 2.4.0, a partir de máscaras de análise ajustadas para cada experimento.

3.4 Extração de monócitos primários de camundongos

Monócitos serão extraídos da medula óssea de camundongos para diferenciação em macrófagos. Para extração de monócitos, camundongos adultos saudáveis da linhagem BALB/c provenientes do biotério de experimentação do LNBio serão eutanasiados em câmara de CO₂ seguido de deslocamento cervical. Todos os procedimentos feitos em animais de laboratório previstos neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do LNBio (CEUA #56). O fêmur e a tibia das patas traseiras serão removidos e dissecados, com o cuidado de não romper nenhum osso. Os ossos serão limpos, imersos em álcool 70% e levados ao fluxo laminar de cultura de células para a extração de modo asséptico. As extremidades dos ossos serão cortadas com uma tesoura cirúrgica e, com uma agulha hipodérmica (26G ½) e com uma seringa de 3 ml de PBS estéril, será feito o *flush* da medula óssea para extração das células em tubo Falcon. Após o *flush* em todos os ossos, as células serão tratadas com um tampão de lise de hemácias (cloreto de amônio 160mM e Tris-HCl 170mM pH 7,6) por 2 minutos em temperatura ambiente para eliminar as células vermelhas e manter apenas as células brancas. As células serão neutralizadas com PBS e centrifugadas a 300 x g por 5 minutos a 4°C, ressuspensas em PBS novamente e contadas, para que sejam plaqueadas 1 x 10⁶ células por poço de uma placa de 24 poços.

O meio em que as células serão plaqueadas após o *flush* será RPMI completo suplementado com solução de aminoácidos não essenciais 1x (*Sigma* – M7145-100ML), piruvato de sódio 1 mM (*Sigma* – S8636-100ML), solução de vitaminas 1x (*Sigma* – M6895-100ML) e o fator de diferenciação para macrófagos M-CSF murino

a 20 ng/ml (*BioLegend*). As células serão mantidas no meio de diferenciação por 5 dias.

3.5 Co-cultivo 3D de células de câncer de mama e macrófagos

Esferoides da linhagem murina 4T1 *Mock* e GAB serão pré-formadas pela adição de 25 mil células por poço em 200 µl de meio RPMI com 10% de soro fetal bovino por 24 horas. Após esse período, os macrófagos diferenciados serão removidos da sua placa de cultura com a ajuda de um *cell scraper*, contados e distribuídos nas esferas pré-formadas nas proporções 1:0 (não adicionados - controle), 1:0.5 (25 mil células 4T1:12.500 macrófagos) ou 1:1 (25 mil células 4T1:25 mil macrófagos). Alternativamente, macrófagos e células 4T1, também nas proporções descritas, serão co-incubados logo no início do experimento, formando esferoides com a mistura dos dois tipos celulares. Vamos empregar placas em fundo “U” tratadas com *poly-HEMA* (*Sigma*), reagente que impede a adesão das células na parede do poço.

As células serão mantidas em co-cultura por 7 dias. Após isso, as esferas serão separadas para extração de RNA ou para criopreservação em meio *TissueTek*® (*Leica*) e armazenadas a -80°C.

3.6 Extração de RNA e PCR quantitativo

O RNA total dos esferoides em co-cultivo será coletado utilizando-se o reagente *TRI-Reagent* (*Sigma*) e extraído utilizando-se o método de fenol-clorofórmio (Sambrook, J., E. F. Fritsch, 1989). A síntese da primeira fita de cDNA será feita com o uso do kit *GoScript Reverse Transcriptase* (*Promega*) e *oligo random hexamers*, utilizando-se cerca de 1 µg inicial de RNA total coletado das esferas, sob as condições de 25°C por 10 minutos; 42°C por 60 minutos; e 70°C por 15 minutos. Os primers utilizados para identificação da expressão de genes marcadores de polarização de macrófagos estão descritos na Tabela 2.

A análise da expressão relativa dos mRNAs será realizada utilizando-se a metodologia de PCR quantitativo (qPCR) empregando-se 5x *HOT FIREPol*® *EvaGreen*® *qPCR Mix Plus* (*ROX*) (*Solis BioDyne*). Nesta metodologia, monta-se uma

reação com o mRNA das amostras, os primers dos genes de interesse e o composto fluorescente intercalante de DNA *EvaGreen*. As amostras serão aplicadas em triplicatas técnicas e a reação se derá pelas condições de 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos seguidos de 60°C por 60 segundos, 40 vezes. Os dados serão normalizados pela expressão do normalizador *Hprt*. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 2 – Lista de primers, sequência, genes e função no experimento de PCR quantitativo

PRIMER	SEQUÊNCIA	GENE	FUNÇÃO
mHprt_Fow	CAGTCCCAGCGTCGTGATTA	Hprt	Endógene (Controle)
mHprt_Rev	TGGCCTCCCATCTCCTTCAT		
mNos2_Fow	GGTGAAGGGACTGAGCTGTT	Nos2	Marcador de M1
mNos2_Rev	ACGTTCTCCGTTCTCTTGACAG		
mTnf-α_Fow	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT	Tnf- α	Marcador de M1
mTnf-α_Rev	TGGTTTGCTACGACGTGGG		
mIl-1β_Fow	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	Il-1 β	Marcador de M1
mIl-1β_Rev	ATACTGCCTGCCTGAAGCTC		
mArg1_Fow	CTTGCGAGACGTAGACCCTG	Arg1	Marcador de M2
mArg1_Rev	TTTCTTCCTTCCCAGCAGGT		
mMrc1_Fow	CATTCCCTCAGCAAGCGATG	Mrc1	Marcador de M2
mMrc1_Rev	GATACTTGCCAGGTCCCCAC		
mFizz1_Fow	TGCCAATCCAGCTAACTATCCC	Fizz1	Marcador de M2
mFizz1_Rev	CAGTGGTCCAGTCAACGAGT		

3.7 Imunofluorescência de esferas

Os blocos contendo as esferas criopreservadas serão cortados em criostato à temperatura de -23°C em secções de 10 μ m e os cortes colocados em lâminas previamente tratadas com *HistoGrip* (Sigma). Posteriormente, os cortes serão fixados com paraformaldeído 4%. Em seguida, os cortes serão permeabilizados com

Triton 0,2% em PBS, efetuado bloqueio de carga com *Image IT-FX* caseiro (*signal enhancer*) e bloqueio de inespecificidade com BSA 0,1% e o soro do animal em que foi produzido o anticorpo secundário utilizado.

Após essa etapa, os cortes serão incubados com os anticorpos primários *anti-F4/80* (marcador de macrófagos); *anti-CD68* (marcador de macrófago M1); *anti-CD206* (marcador de macrófago M2); *anti-GLS2* por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, será realizada a incubação com os anticorpos secundários *Alexa-647 rat (F4/80)*; *Alexa-488 mouse (CD68)*; *Alexa-546 rabbit (CD206 e GLS2, em cortes separados)* por 1 hora em temperatura ambiente. Para a contramarcacão nuclear, será utilizado DAPI a 0,25 ng/ μ L em PBS por 5 minutos em temperatura ambiente. Entre todas as etapas de marcação, serão feitas 3 lavagens com PBS. As lâminas serão levadas, em seguida, para análise em microscópio de fluorescência confocal *Leica TCS SP8 X® (Leica)* e analisadas pelo *software LAS X® (Leica)*. Presença de macrófago e seu subtipo será avaliado em função da expressão de GAB.

4. Referências

- Alimperti, S., Lei, P., Wen, Y., Tian, J., Campbell, A. M., & Andreadis, S. T. (2014). Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. *Biotechnology Progress*, 30(4), 974–983. <https://doi.org/10.1002/btpr.1904>
- Badve, S., & Nakshatri, H. (2012). Breast-cancer stem cells—beyond semantics. *The Lancet Oncology*, 13(1), e43–e48. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70191-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70191-7)
- Baillargeon, P., Shumate, J., Hou, S., Fernandez-Vega, V., Marques, N., Souza, G., Seldin, J., Spicer, T. P., & Scampavia, L. (2019). Automating a Magnetic 3D Spheroid Model Technology for High-Throughput Screening. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation*, 24(4), 420–428. <https://doi.org/10.1177/2472630319854337>
- Calcagno, A. M., Salcido, C. D., Gillet, J.-P., Wu, C.-P., Fostel, J. M., Mumau, M. D., Gottesman, M. M., Varticovski, L., & Ambudkar, S. V. (2010). Prolonged Drug Selection of Breast Cancer Cells and Enrichment of Cancer Stem Cell Characteristics. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(21), 1637–1652. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq361>
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 17(3), 313–319. <https://doi.org/10.1038/nm.2304>
- DeNicola, G. M., & Cantley, L. C. (2015). Cancer's Fuel Choice: New Flavors for a Picky Eater. *Molecular Cell*, 60(4), 514–523. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.018>
- Devi, K. S. P., Mishra, D., Roy, B., Ghosh, S. K., & Maiti, T. K. (2015). Assessing the immunomodulatory role of heteroglycan in a tumor spheroid and macrophage co-culture model system. *Carbohydrate Polymers*, 127, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.035>
- Dias, M. M., Adamoski, D., Reis, L. M., Ascensão, C. F. R., Oliveira, K. R. S. De, Carolina, A., Mafra, P., Cristiny, A., Quintero, M., Cassago, C. D. G., Ferreira, I. M., Fidelis, C. H. V., Rocco, S. A., Chaim, M., Berindan-neagoe, Z. S. I., Calin, G. A., Luis, A., Ambrosio, B., Martha, S., ... Ambrosio, B. (n.d.). GLS2 is protumorigenic in breast cancers. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1007-z>
- Drewitz, M., Helbling, M., Fried, N., Bieri, M., Moritz, W., Lichtenberg, J., & Kelm, J. M. (2011). Towards automated production and drug sensitivity testing using scaffold-free spherical tumor microtissues. *Biotechnology Journal*, 6(12), 1488–1496. <https://doi.org/10.1002/biot.201100290>
- Dwyer, A. R., Ellies, L. G., Holme, A. L., & Pixley, F. J. (2016). A three-dimensional co-culture system to investigate macrophage-dependent tumor cell invasion. *Journal of Biological Methods*, 3(3), 49. <https://doi.org/10.14440/jbm.2016.132>
- Flier, J. S., Underhill, L. H., & Dvorak, H. F. (1986). Tumors: Wounds That Do Not Heal. *New England Journal of Medicine*, 315(26), 1650–1659. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>
- Frieboes, H. B., Zheng, X., Sun, C.-H., Tromberg, B., Gatenby, R., & Cristini, V. (2006). An Integrated Computational/Experimental Model of Tumor Invasion. *Cancer Research*, 66(3), 1597–1604. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3166>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2011). *Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell. 2010;140(6):883–899. 140(6), 883–899.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Gross, M. I., Demo, S. D., Dennison, J. B., Chen, L., Chernov-Rogan, T., Goyal, B., Janes, J. R., Laidig, G. J., Lewis, E. R., Li, J., Mackinnon, A. L., Parlati, F., Rodriguez, M. L. M., Shwonek, P. J., Sjogren, E. B., Stanton, T. F., Wang, T., Yang, J., Zhao, F., & Bennett, M. K. (2014). Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(4), 890–901. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0870>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5),

- 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hensley, C. T., Wasti, A. T., & Deberardinis, R. J. (2013). *Review series Glutamine and cancer : cell biology , physiology , and clinical opportunities*. 123(9). <https://doi.org/10.1172/JCI69600.3678>
- Herrmann, R., Fayad, W., Schwarz, S., Berndtsson, M., & Linder, S. (2007). Screening for Compounds That Induce Apoptosis of Cancer Cells Grown as Multicellular Spheroids. *Journal of Biomolecular Screening*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1177/1087057107310442>
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., & Feng, Z. (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7455–7460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001006107>
- Katt, W. P., Lukey, M. J., & Cerione, R. A. (2017). A tale of two glutaminases: homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. *Future Medicinal Chemistry*, 9(2), 223–243. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0190>
- Krausz, E., de Hoogt, R., Gustin, E., Cornelissen, F., Grand-Perret, T., Janssen, L., Vloemans, N., Wuyts, D., Frans, S., Axel, A., Peeters, P. J., Hall, B., & Cik, M. (2013). Translation of a Tumor Microenvironment Mimicking 3D Tumor Growth Co-culture Assay Platform to High-Content Screening. *Journal of Biomolecular Screening*, 18(1), 54–66. <https://doi.org/10.1177/1087057112456874>
- Kunz-Schughart, L. A., Freyer, J. P., Hofstaedter, F., & Ebner, R. (2004). The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening: The Multicellular Spheroid Model. *Journal of Biomolecular Screening*, 9(4), 273–285. <https://doi.org/10.1177/1087057104265040>
- Leek, R. D., & Harris, A. L. (2002). Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7(2), 177–189.
- Liu, Y., & Cao, X. (2015). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Cellular & Molecular Immunology*, 12(1), 1–4. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.83>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lombardo, Y., de Giorgio, A., Coombes, C. R., Stebbing, J., & Castellano, L. (2015). Mammosphere Formation Assay from Human Breast Cancer Tissues and Cell Lines. *Journal of Visualized Experiments*, 97, 1–5. <https://doi.org/10.3791/52671>
- Martín-Rufián, M., Tosina, M., Campos-Sandoval, J. a, Manzanares, E., Lobo, C., Segura, J. a, Alonso, F. J., Matés, J. M., & Márquez, J. (2012). Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PLoS One*, 7(6), e38380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038380>
- Montanez-Sauri, S. I., Sung, K. E., Berthier, E., & Beebe, D. J. (2013). Enabling screening in 3D microenvironments: probing matrix and stromal effects on the morphology and proliferation of T47D breast carcinoma cells. *Integrative Biology*, 5(3), 631. <https://doi.org/10.1039/c3ib20225a>
- Mueller-Klieser, W. (1997). Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 273(4), C1109–C1123. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.4.C1109>
- Newman, A. M., Liu, C. L., Green, M. R., Gentles, A. J., Feng, W., Xu, Y., Hoang, C. D., Diehn, M., & Alizadeh, A. A. (2015). Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nature Methods*, 12(5), 453–457. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3337>
- Noel, P., Muñoz, R., Rogers, G. W., Neilson, A., Von Hoff, D. D., & Han, H. (2017). Preparation and Metabolic Assay of 3-dimensional Spheroid Co-cultures of Pancreatic Cancer Cells and Fibroblasts. *Journal of Visualized Experiments*, 126. <https://doi.org/10.3791/56081>
- Noy, R., & Pollard, J. W. (2014). Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity*, 41(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>

- Owen, O. E., Kalhan, S. C., & Hanson, R. W. (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30409–30412. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200006200>
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Polyak, K., & Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 265–273. <https://doi.org/10.1038/nrc2620>
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M. A., & Daidone, M. G. (2005). Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties. *Cancer Research*, 65(13), 5506–5511. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0626>
- Qian, B.-Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, 141(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
- Rebelo, S. P., Pinto, C., Martins, T. R., Harrer, N., Estrada, M. F., Loza-Alvarez, P., Cabeçadas, J., Alves, P. M., Gualda, E. J., Sommergruber, W., & Brito, C. (2018). 3D-3-culture: A tool to unveil macrophage plasticity in the tumour microenvironment. *Biomaterials*, 163, 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.030>
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. M. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual* (2nd Editio).
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 787–795. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
- Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., & Allavena, P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer*, 42(6), 717–727. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.003>
- Suzuki, S., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V., Nagano, H., Mayama, T., Ohkubo, S., Lokshin, M., Hosokawa, H., Nakayama, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Sato, E., Nagao, T., Yokote, K., Tatsuno, I., & Prives, C. (2010). Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7461–7466. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002459107>
- Thorsson, V., Gibbs, D. L., Brown, S. D., Wolf, D., Bortone, D. S., Ou Yang, T. H., Porta-Pardo, E., Gao, G. F., Plaisier, C. L., Eddy, J. A., Ziv, E., Culhane, A. C., Paull, E. O., Sivakumar, I. K. A., Gentles, A. J., Malhotra, R., Farshidfar, F., Colaprico, A., Parker, J. S., ... Shmulevich, Ilya. (2018). The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*, 48(4), 812–830.e14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.023>
- Tung, Y.-C., Hsiao, A. Y., Allen, S. G., Torisawa, Y., Ho, M., & Takayama, S. (2011). High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *The Analyst*, 136(3), 473–478. <https://doi.org/10.1039/C0AN00609B>
- Vinci, M., Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Court, W., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D., & Eccles, S. A. (2012). Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biology*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-29>
- Waite, C. L., & Roth, C. M. (2009). PAMAM-RGD Conjugates Enhance siRNA Delivery Through a Multicellular Spheroid Model of Malignant Glioma. *Bioconjugate Chemistry*, 20(10), 1908–1916. <https://doi.org/10.1021/bc900228m>
- Wang, Y., & Wang, J. (2014). Mixed hydrogel bead-based tumor spheroid formation and anticancer drug testing. *The Analyst*, 139(10), 2449–2458. <https://doi.org/10.1039/C4AN00015C>
- WARTENBERG, M., DÖNMEZ, F., LING, F. C., ACKER, H., HESCHELER, J., & SAUER, H. (2001). Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor

- spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *The FASEB Journal*, 15(6), 995–1005. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0350com>
- Wenzel, C., Riefke, B., Gründemann, S., Krebs, A., Christian, S., Prinz, F., Osterland, M., Golfier, S., Räse, S., Ansari, N., Esner, M., Bickle, M., Pampaloni, F., Mattheyer, C., Stelzer, E. H., Parczyk, K., Prechtel, S., & Steigemann, P. (2014). 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Experimental Cell Research*, 323(1), 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.017>
- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature*, 496(7446), 445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Zhang, C., Liu, J., Zhao, Y., Yue, X., Zhu, Y., Wang, X., Wu, H., Blanco, F., Li, S., Bhanot, G., Haffty, B. G., Hu, W., & Feng, Z. (2016). Glutaminase 2 is a novel negative regulator of small GTPase Rac1 and mediates p53 function in suppressing metastasis. *ELife*, 5(January), 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.10727>
- Zhu, J., & Thompson, C. B. (2019). Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0123-5>