



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Daniel Arthur Guimarães Bastos

**Efeito de microvesículas de melanoma na polarização de neutrófilos
humanos**

Rio de Janeiro

2016

Daniel Arthur Guimarães Bastos

Efeito de microvesículas de melanoma na polarização de neutrófilos humanos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. João Alfredo de Moraes Gomes Silva

Coorientadora: Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

B327 Bastos, Daniel Arthur Guimarães.
Efeito de microvesículas de melanoma na polarização de neutrófilos humanos / Daniel Arthur Guimarães Bastos – 2016.
77 f.

Orientador: João Alfredo de Moraes Gomes Silva.
Coorientadora: Thereza Christina Barja Fidalgo.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Neutrófilos - Teses. 2. Melanoma - Teses. 3. Vesículas Extracelulares. I. Moraes, João Alfredo. II. Barja-Fidalgo, Thereza Christina. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-006.81

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Daniel Arthur Guimarães Bastos

Efeito de microvesículas de melanoma na polarização de neutrófilos humanos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de setembro de 2016.

Orientador: Prof. Dr. João Alfredo de Moraes Gomes Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Coorientadora: Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira

Universidade Estadual da Zona Oeste

Prof. Dr. André Luiz Mencialha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que desde criança me ensinaram a importância de bons valores como honestidade, gentileza e respeito, e sempre me apoiaram nas minhas decisões.

À irmã mais “pentelha” do mundo, que apesar de todas as brigas estilo “Tom & Jerry” que sempre tivemos, sempre me mostrou direta ou indiretamente a importância de nunca se deixar abater.

À professora Thereza Christina pela chance e confiança depositadas em mim desde a época em que me aceitou em seu laboratório como estudante de Iniciação Científica, sempre compartilhando seus conhecimentos.

Ao professor João Alfredo de Moraes pela oportunidade de cursar sua disciplina na graduação que gerou o meu interesse na linha de pesquisa do laboratório, e posteriormente por ter aceito me orientar. Obrigado pela confiança, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelas broncas, pelos estímulos constantes a procurar sempre saber mais, pela paciência, pela amizade.

À minha amiga Vivian Giuliana Lima, que mesmo distante fisicamente, sempre se fez muito mais presente na minha vida que muita gente que sempre vejo, me ajudando várias vezes em diversos momentos difíceis da graduação com seus conselhos e amizade, e mesmo antes do começo da minha vida acadêmica.

À minha amiga Denyse Sales, presente da UERJ, parceira de trabalhos de grupo, que apesar de não ver mais com tanta frequência como antigamente continua mostrando a mesma cumplicidade e amizade de sempre.

À minha amiga Clara Frony, outro presente da UERJ, a qual após a minha entrada no laboratório rapidamente evoluiu de caloura que eu apenas conhecia de vista para irmã científica que sei que posso contar não apenas dentro, mas também fora do ambiente acadêmico.

Ao apoio técnico dos amigos Genilson Rodrigues e Gabriele Muniz, crucial para o andamento dos experimentos.

Ao pessoal do laboratório pelas experiências e ensinamentos divididos. Apreendi um pouquinho com cada um desde o começo da minha experiência no laboratório.

E por último, mas não menos importante, agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ pelas verbas sem as quais a realização deste trabalho não seria possível.

RESUMO

Bastos, Daniel Arthur Guimarães. *Efeito de microvesículas de melanoma na polarização de neutrófilos humanos*. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Para entender os mecanismos envolvidos no crescimento tumoral é necessária a compreensão detalhada do seu microambiente, formado por diferentes componentes de matriz extracelular, fatores de crescimento, citocinas e diversos tipos celulares. Células do sistema immune presentes no microambiente têm suas funções pró-inflamatórias modificadas de forma a auxiliar o crescimento tumoral. Estudos recentes mostram evidências de dois fenótipos distintos de neutrófilos associados ao tumor (TAN): um pró-tumoral, TAN N2, ou um anti-tumoral, TAN N1. Evidências também apontam que este microambiente é rico em microvesículas (MV), produzidas abundantemente pelo tumor. A maior parte das MV não apenas transporta informações moleculares de suas células de origem, mas também são capazes de modular a atividade de células alvo. Embora já tenha sido demonstrado que MV provenientes de tumores são capazes de interagir com diferentes tipos celulares no microambiente, não há dados na literatura sobre a sua contribuição na modulação de TAN. O objetivo deste estudo foi investigar se MV produzidas por uma linhagem de melanoma humano modulam a atividade de neutrófilos (PMN), alterando seu fenótipo para um tipo-N2. As MV foram obtidas de meio condicionado da linhagem celular de melanoma humano MV3 e quantificadas através de microscopia em tempo real ZetaView[®] e marcação para anexina-V. PMN humanos, isolados por Gradiente de Percoll, foram incubados na presença ou ausência de MV (10% v/v) ou LPS (10 µg/mL) em diferentes tempos. A quimiotaxia foi realizada em uma Câmara de Boyden de 48 poços modificada. A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo. A formação de armadilhas celulares neutrofílicas (NETs) foi avaliada pela quantificação de DNA e imunofluorescência. Os níveis de ROS intracelular, NO e peróxinitrito foram determinados através da oxidação das sondas CM-H2DCFDA, DAF-FM e HPF, respectivamente. A viabilidade de células MV3 co-cultivadas com PMN foi avaliada por ensaios de MTT. A expressão gênica de marcadores moleculares foi obtida por RT-PCR quantitativa. O conteúdo de CXCR4 e arginase foram obtidos por citometria de fluxo e Western blot, respectivamente. As MV induziram quimiotaxia de PMN, e este efeito foi inibido pela toxina pertussis e é dependente da ativação da via PI3K-AKT. Foi também observado que o efeito das MV na quimiotaxia de PMN depende da ativação de CXCR2, uma vez que seu inibidor, SB225002, anulou a migração de PMN. As MV retardaram a apoptose espontânea de PMN, estimularam a formação de NETs e induziram a produção de ROS intracelular. O tratamento com as MV diminuiu a produção basal de NO, e aumentou a expressão de CXCR4 e arginase, assim como o conteúdo de mRNA de vários marcadores moleculares de TAN N2, como arginase, CXCR4 e VEGF em PMN. Por ultimo, PMN tratados com MV não afetaram a viabilidade de células de melanoma em co-cultura. Esses dados indicam que MV derivadas do melanoma podem ter um importante papel na modulação do fenótipo dos TAN no microambiente tumoral em um fenótipo TAN N2, que apresenta expressão aumentada de marcadores moleculares pró-tumorais e baixa atividade citotóxica.

Palavras-chave: Neutrófilos. Neutrófilos-associados ao tumor. Câncer. Microvesículas.

ABSTRACT

Bastos, Daniel Arthur Guimarães. *Melanoma-derived microvesicles induce human neutrophils polarization*. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The understanding of the mechanisms involved in tumor growth runs through the acknowledgement on its microenvironment, formed by extracellular matrix components, growth factors, cytokines and different cell types. Immune cells present in tumor microenvironment have their pro-inflammatory functions modified to support tumor growth. Recent studies have provided evidence on two phenotypes of tumor-associated neutrophils (TAN): a protumoral, TAN N2, or an antitumoral, TAN N1. Evidence also show that tumor microenvironment is rich in microvesicles (MV), produced abundantly by the tumor. Most MV can not only carry molecular information from their cellular origin but can also modulate the activity of target cells. Although tumor-derived MV were shown to interact with different cells in the microenvironment, there are no reports on its contribution to modulate TAN. Now, we investigate whether MV produced by a human melanoma cell line modulate human neutrophil activity, shifting it to a N2-like phenotype. MV were obtained from conditioned media of human melanoma cell line MV3 cultures and quantified by ZetaView[®] real-time analyzes and annexin-V staining. Human neutrophils (PMN), isolated by Percoll gradient, were incubated in the presence or absence of MV (10% v/v) or LPS (10 µg/mL) at different times. Chemotaxis was assayed in a 48-wells modified Boyden Chamber. Apoptosis was assessed by flow cytometry. Neutrophil extracellular traps (NETs) formation was evaluated by DNA quantification and immunofluorescence. Intracellular ROS, NO and peroxynitrite production were measured through the oxidation of CM-H2DCFDA, DAF-FM and HPF probes, respectively. Viability of MV3 cells co-cultured with PMN was assessed by MTT assays. Molecular markers gene expression were obtained by qRT-PCR. CXCR4 and arginase contents were obtained by cytometry and immunoblotting, respectively. MV induce PMN chemotaxis, and this effect was inhibited by pertussis toxin and is dependent on PI3K-AKT pathway activation. It was also observed that MV effect on PMN chemotaxis relies on CXCR2, once its inhibitor, SB225002, abrogated PMN migration. MV delayed PMN spontaneous apoptosis, triggered NETs formation and induced intracellular ROS production. Treatment with MV decreased NO basal production, and increased CXCR4 and arginase expression, as well as augmented the mRNA content of several TAN N2 molecular markers, such as arginase, CXCR4 and VEGF in PMN. Finally, PMN treated with MV did not affect melanoma cells viability in co-culture. These data indicate that melanoma-derived MV may have an important role in shaping the phenotype of PMN in tumor microenvironments towards a TAN N2 phenotype, which shows an increased expression pro-tumor molecular markers and presents low cytotoxic properties.

Keywords: Neutrophils. Tumor-associated neutrophils. Cancer. Microvesicles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Hallmarks</i> envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral.....	15
Figura 2 – Fases de crescimento do melanoma.....	18
Figura 3 – Recrutamento de PMN da corrente sanguínea aos tecidos.....	21
Figura 4 – Mecanismos microbicidas dos PMN.....	22
Figura 5 – Polarização de PMN em TAN.....	27
Figura 6 – Origens das principais classes de vesículas extracelulares.....	30
Figura 7 – Obtenção de meio condicionado (MC) de melanócito NGM e MC, sobrenadante (SN) e MV de melanoma MV3.....	35
Figura 8 – Purificação de PMN humanos através de gradiente descontínuo de Percoll.....	36
Figura 9 – Representação esquemática de uma câmara de Boyden modificada.....	38
Figura 10 – Distribuição das dimensões das MV presentes no MC do melanoma MV3.....	46
Figura 11 – Quantificação de MP nos MC de melanócito NGM e MC de melanoma MV3.....	47
Figura 12 – As MV induzem a migração de PMN.....	49
Figura 13 – As MV retardam a apoptose espontânea de PMN.....	51
Figura 14 – As MV induzem a formação de <i>NETs</i> em PMN.....	52
Figura 15 – As MV induzem a formação de <i>ROS</i> intracelular em PMN.....	55
Quadro – As MV aumentam a expressão gênica de vários marcadores TAN N2 em PMN.....	57
Figura 16 – As MV aumentam a expressão do marcador CXCR4 e promovem o rearranjo de cromatina em PMN.....	58
Figura 17 – As MV aumentam o conteúdo proteico de arginase em PMN.....	59
Figura 18 – As MV diminuem a produção basal de <i>NO</i> em PMN.....	60
Figura 19 – PMN tratados com MV não afetam a viabilidade das células MV3.....	62
Figura 20 – PMN tratados com MV não aumentam a produção de $OONO^-$ em contato com células MV3.....	63

Figura 21 – Esquema representativo da conclusão do trabalho.....	71
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Aloficocianina
cDNA	DNA complementar
CXCR2	Receptor de quimiocina CXC tipo 2
CXCR4	Receptor de quimiocina CXC tipo 4
DAMPs	<i>Danger-associated molecular patterns</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Exo	Exossomos
FIT-C	Isocianato de fluoresceína dextrano
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GiPCR	Receptores acoplados à proteína G inibitória
IFN- β	Interferon beta
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MC	Meio condicionado
MMP-9	Metaloproteinase-9
MP	Micropartículas
MV	Microvesículas
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NOS	<i>Nitric oxide sintase</i>
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de propídio
PMA	Acetato miristato de forbol
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PSGL-1	<i>P-selectin ligand 1</i>
PS	Fosfatidilserina
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>

RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SN	Sobrenadante
TAN	<i>Tumor-associated neutrophil</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento vascular do endotélio

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
α	Alfa
κ	Kappa
β	Beta
nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
Ca^{+2}	Cálcio
nM	Nanomolar
mM	Milimolar
mg/L	Miligramas por litro
CO_2	Molécula de gás carbônico
x	Multiplificação
g	Gravidade
mL	Mililitro
v	Volume
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus celsius
μM	Micromolar
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Microgramas por mililitro
rpm	Rotações por minuto
H_2O_2	Molécula de peróxido de hidrogênio
Δ	Delta
NO	Molécula de óxido nítrico
OONO^-	Molécula de peróxido nitrito
p	Valor p
$\text{MP}/\mu\text{L}$	Micropartículas por microlitro
mRNA	RNA mensageiro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS	33
1.1	Geral	33
1.2	Específicos	33
2	MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1	Linhagens celulares	34
2.2	Obtenção de meio condicionado (MC) de melanócito NGM e MC, sobrenadante (SN) e MV de melanoma MV3	34
2.3	Quantificação de MV	35
2.4	Purificação de PMN	36
2.5	Quimiotaxia de PMN <i>in vitro</i>	37
2.6	Ensaio de apoptose	38
2.7	Ensaio de liberação de NETs	39
2.8	Ensaio de produção de ROS intracelular	40
2.9	Ensaio de atividade antioxidante “<i>cell-free</i>”	41
2.10	Obtenção de extratos de RNA	41
2.11	RT-PCR e PCR em tempo real	41
2.12	Expressão do marcador CXCR4 por citometria de fluxo	42
2.13	Obtenção de extratos totais	42
2.14	<i>Immunoblotting</i>	43
2.15	Ensaio de MTT em co-culturas de PMN e melanoma MV3	44
2.16	Ensaio de produção de NO	44
2.17	Ensaio de produção de peróxido nítrico	45
2.18	Análises estatísticas	45
3	RESULTADOS	46
3.1	Análise do tamanho das microvesículas liberadas por células de melanoma humano MV3	46
3.2	As células de melanoma humano MV3 produzem grande quantidade de micropartículas	47
3.3	As MV induzem a migração de PMN	48

3.4	As MV retardam a apoptose espontânea de PMN.....	50
3.5	As MV induzem a formação de <i>NETs</i> em PMN.....	52
3.6	As MV induzem a formação de <i>ROS</i> intracelular em PMN	54
3.7	As MV aumentam a expressão gênica de vários marcadores TAN N2 em PMN.....	56
3.8	As MV aumentam a expressão do marcador CXCR4 e promovem o rearranjo da cromatina em PMN.....	58
3.9	As MV aumentam o conteúdo proteico de arginase em PMN.....	59
3.10	As MV diminuem a produção basal de <i>NO</i> em PMN.....	60
3.11	PMN tratados com MV não afetam a viabilidade das células MV3.....	61
3.12	PMN tratados com MV não aumentam a produção de <i>OONO</i>⁻ em contato com células MV3.....	62
4	DISCUSSÃO	64
	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS	72

INTRODUÇÃO

Câncer

O termo câncer é utilizado genericamente para definir um conjunto de doenças com mais de 100 variedades, que afeta múltiplos órgãos (HANAHAN; WEINBERG, 2000). No câncer, as células normais do organismo evoluem progressivamente para um fenótipo neoplásico, através de mutações randômicas em seu genoma, afetando genes que controlam a proliferação e sobrevivência celular (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012).

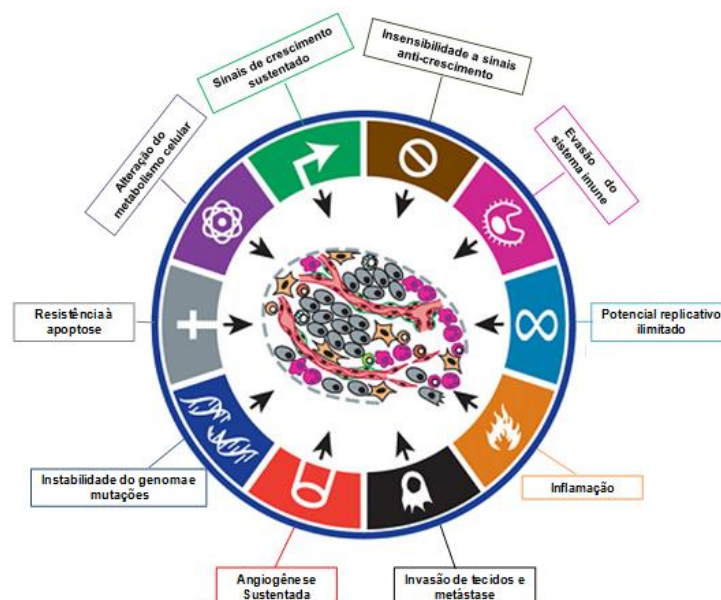
O processo de geração do câncer, ou carcinogênese, ocorre lentamente, podendo levar anos para que uma célula se torne cancerosa e prolifere para originar um tumor maligno (CIVETTA; CIVETTA, 2011). Esse processo pode ser dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, as células sofrem danos diretos em seu DNA pela ação de agentes químicos, físicos, virais ou ainda mutações geradas espontaneamente, levando à ativação de oncogenes e/ou supressão de genes supressores de tumor (KARIN; GRETEN, 2005). Na promoção, as células geneticamente alteradas são transformadas de forma lenta e gradual em células malignas. Na última etapa, a progressão, ocorre a multiplicação descontrolada e irreversível das células malignas (CIVETTA; CIVETTA, 2011), além da aquisição de capacidade invasiva (KARIN; GRETEN, 2005), invasão de tecidos adjacentes ou distantes (HANAHAN; WEINBERG, 2011), metástase e acúmulo de novas mutações, resultando em um fenótipo mais maligno (KARIN; GRETEN, 2005).

A elevada proliferação celular leva à formação de uma massa anormal de tecido, a massa tumoral, que excede os limites anatômicos do tecido normal (EL-BACHA; DE FREITAS; SOLA-PENNA, 2003). Essa massa tumoral pode ser benigna, caso permaneça em seu local de origem, ou pode se tornar maligna, caso invada outros tecidos. Conforme as células progressivamente evoluem a um estado neoplásico, adquirem uma série de alterações em sua fisiologia que as possibilitam se tornarem tumorigênicas e malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Inicialmente, Hanahan e Weinberg (2000) descreveram algumas “assinaturas” (*hallmarks*) relacionadas ao desenvolvimento e progressão tumoral, como auto-suficiência de sinais de crescimento celular, insensibilidade a sinais anti-crescimento, evasão da apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase. Recentemente, outras “assinaturas” foram acrescentadas à lista, incluindo alterações no metabolismo celular, escape das células tumorais do sistema imune, instabilidade genômica e mutação, e a inflamação (Figura 1). A aquisição destes múltiplos *hallmarks* depende em grande parte de sucessivas alterações no genoma das células neoplásicas (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As causas do câncer estão relacionadas a fatores de risco que podem ser ambientais ou externos, como tabagismo, alcoolismo, alimentos e exposição à radiação e também a fatores intrínsecos, como mutações herdadas e condições imunes. Esses fatores podem agir conjunta ou sequencialmente para iniciar o processo de carcinogênese. De todos os casos de câncer, 80% a 90% em média estão associados a fatores ambientais (JEMAL et al., 2007).

Figura 1 - *Hallmarks* envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral



Nota: As células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, no qual adquirem diversas características que as permitem tornar-se tumorigênicas.

Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011.

Melanoma

A exposição frequente à radiação ultravioleta (UV) é reconhecida como um importante fator de risco ambiental podendo provocar danos ao DNA e assim levar ao desenvolvimento do câncer de pele melanoma e não melanoma (MULLIKEN; RUSSAK; RIGEL, 2012).

A incidência do melanoma tem aumentado em populações brancas, sendo responsável por quase 60% das neoplasias de pele fatais. Sua epidemiologia é igual entre os sexos, sendo incomum em crianças. O perfil típico de um paciente é um caucasiano, na quarta década de vida (BANDARCHI et al., 2010). Apesar do câncer de pele não melanoma ser o mais comum, a mortalidade do melanoma pode atingir níveis até três vezes maiores (ILKOVITCH; LOPEZ, 2008). Para o biênio de 2016-2017, o INCA (Instituto Nacional de Câncer) estima cerca de 5670 (3000 em homens e 2670 em mulheres) novos casos no Brasil, sendo quase 50% (2260) na região Sudeste (INCA, 2016). Tal fato vem atraindo a atenção das autoridades de saúde pública para o desenvolvimento de campanhas de prevenção e diagnóstico precoce do câncer.

A pele humana é um órgão complexo composto por duas camadas: a epiderme e a derme, separadas por uma membrana basal. Os melanócitos encontram-se na epiderme, e a sua proliferação é regulada por sinais enviados pelos queratinócitos aos quais estão ligados através de projeções dendríticas (HSU; MEIER; HERLYN, 2002). Este órgão é a primeira barreira contra a ação externa do ambiente, com ação fotoprotetora e termorreguladora promovida pela melanina produzida pelos melanócitos (LIN; FISHER, 2007). Os pigmentos presentes nela são sintetizados em organelas especializadas, chamadas melanossomos (BANDARCHI et al., 2010), e são transportados aos queratinócitos adjacentes através de projeções dendríticas (HSU; MEIER; HERLYN, 2002). O nível de produção deste pigmento determina o fotótipo da pele (cor e facilidade em bronzeamento), sendo um fator importante para a avaliação do risco de câncer de pele na população (LIN; FISHER, 2007). Além da radiação solar, a melanina absorve espécies reativas de oxigênio (ROS - do inglês *reactive oxygen species*), geradas pela ação desta radiação na membrana e em outros componentes celulares (GILCHREST et al., 1999).

A grande maioria das mutações presentes no melanoma cutâneo ocorre em genes que regulam importantes vias de sinalização, como a via das Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK). Molecularmente, mais de 50% dos melanomas exibem mutações no gene BRAF; alterações no gene NRAS correspondem a 28% dos melanomas e o gene NF1 está alterado em cerca de 14% dos pacientes (RATNIKOV et al., 2016).

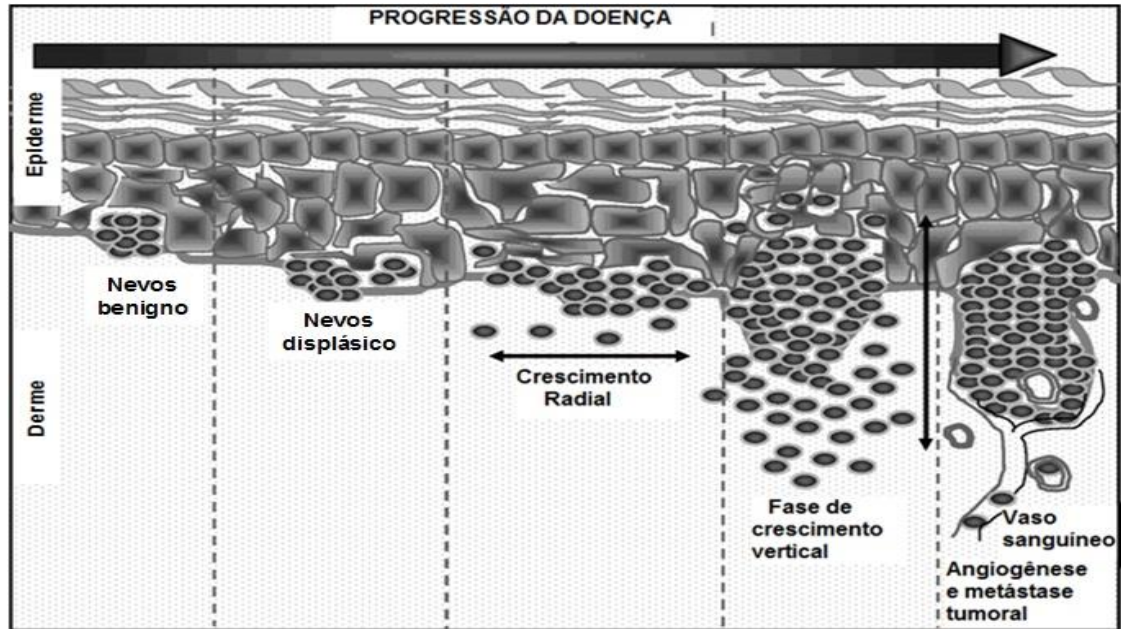
As mutações não corrigidas por sistemas de reparo fazem com que os melanócitos normais comecem a proliferar desordenadamente, formando o nevo benigno. A rápida proliferação dos melanócitos transformados forma o nevo displásico, assimétrico, com bordas irregulares, seguido por uma rápida fase de crescimento radial, caracterizada como intraepidermal, na qual o melanoma pode estar confinado na epiderme ou localmente invasivo, apesar de não apresentar metástase (MAHABELESHWAR; BYZOVA, 2007). Nesta fase, as células transformadas dependem de fatores de crescimento exógenos, provenientes dos queratinócitos, e são incapazes de crescerem independentemente (HSU; MEIER; HERLYN, 2002). A transição de lesões na pele de benignas para malignas geralmente ocorre por mudanças na expressão e funções de oncogenes ou genes supressores de tumor, assim como modificação da adesão entre os melanócitos e a matriz extracelular (MAHABELESHWAR; BYZOVA, 2007).

A última fase do crescimento do melanoma é a fase vertical, também chamada de fase de invasão da derme. Nesta fase, as células conseguem se desenvolver independentemente dos queratinócitos, apresentando propriedades metastáticas em pacientes e em modelos experimentais em animais (MAHABELESHWAR; BYZOVA, 2007), e expressam moléculas importantes para a invasão e metástase, sendo capazes de se disseminar para a derme e o tecido subcutâneo (HSU; MEIER; HERLYN, 2002). A capacidade invasiva das células transformadas se dá pela perda de contato entre o melanócito transformado e o queratinócito (SARRAY et al., 2009). Nesta última fase, as células apresentam alto potencial metastático (BANDARCHI et al., 2010), alcançando a circulação sanguínea (Figura 2) e disseminando-se para órgãos como o pulmão, fígado e cérebro (MAHABELESHWAR; BYZOVA, 2007).

Vale ressaltar que apesar de ser um tumor imunogênico, o melanoma pode desenvolver mecanismos de evasão do sistema imune, como *down-regulation* de

antígenos de superfície ou indução de tolerância imunológica, aumentando suas chances de sucesso de crescimento e metástase (KUBICA; BREWER, 2012).

Figura 2 - Fases de crescimento do melanoma



Nota: A proliferação aberrante de melanócitos normais leva a formação de nevos benignos. A rápida proliferação dos melanócitos transformados forma um nevo displásico, assimétrico, com bordas irregulares. Isso é seguido por uma rápida fase de crescimento radial, caracterizada como intraepidermal. A última fase do crescimento do melanoma é a fase vertical, também chamada de fase de invasão da derme.

Fonte: Adaptado de Mahabeleshwar; Byzova, 2007.

Inflamação

A inflamação é um mecanismo protetor do organismo saudável, envolvendo leucócitos, células endoteliais, proteínas e mediadores inflamatórios, visando a eliminação do agente causador da lesão celular, com posterior processo de reparo tecidual (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2010). A inflamação possui sinais cardinais bem descritos: o rubor da área inflamada, decorrente da vasodilatação; edema, resultante do acúmulo local de líquido e células; a percepção do calor, devido ao rápido acúmulo sanguíneo com temperatura mais elevada na região devido ao processo pirogênico; a dor origina-se de mecanismos mais complexos, como estímulo de fibras nervosas locais, devido ao acúmulo de líquidos e de células, além

da lesão tecidual direta pelo agente causador (CHANDRASOMA; TAYLOR, 1998). Estes sinais foram descritos há mais de 2000 anos, e no século XIX, o patologista Rudolf Virchow adicionou o quinto sinal a esta lista: a perda de função tecidual (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2010).

Em resposta ao dano tecidual, que pode ser causado por uma infecção, uma rede multifatorial de sinalização celular inicia e mantém uma resposta do hospedeiro de modo a reparar o tecido afetado, envolvendo a produção de citocinas e quimiocinas. Este processo envolve a ativação e migração direcionada de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) da corrente sanguínea para o foco infeccioso (COUSSENS; WERB, 2002). A inflamação aguda inicia-se rapidamente, durando poucos minutos ou dias, caracterizada pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, resultando em extravasamento de líquido rico em proteínas e acúmulo de leucócitos, predominantemente PMN, nos tecidos extravasculares. Estas células fagocitam os agentes infecciosos e, caso não contenham a infecção ou a resposta inflamatória seja exacerbada, a imunidade adaptativa é ativada, através da produção de citocinas e quimiocinas adicionais (CHEN; NUÑEZ, 2010). Quando o organismo falha em eliminar o agente lesivo, não ocorre ativação de mecanismos anti-inflamatórios para contrabalancear a inflamação aguda e esta pode progredir para um estado crônico, cuja duração pode variar de dias a anos (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2010).

Neutrófilos

Durante a inflamação, os PMN são as primeiras células a migrar do sangue para o tecido lesado. Estas células possuem núcleo multilobulado, no qual os lóbulos são conectados pela cromatina. São os leucócitos mais presentes no sangue humano (entre 50 e 70%) e são gerados em grande número na medula óssea, permanecendo na circulação sanguínea por poucas horas (SUMMERS et al., 2010).

A produção de PMN é a atividade principal da medula óssea, onde aproximadamente dois terços da hematopoiese são dedicados à mielopoiese, sendo produzidas de $1,0$ a $2,0 \times 10^{11}$ células diariamente em adultos humanos. Fatores como o G-CSF (do inglês *granulocyte colony stimulating factor*) são essenciais para

que a produção de PMN alcance o nível necessário durante infecções (BORREGAARD, 2010). Além disso, o tempo de vida dos PMN ativados aumenta significativamente, garantindo assim sua presença nos focos inflamatórios. Isso resulta da sua ativação por diversas citocinas e/ou produtos bacterianos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

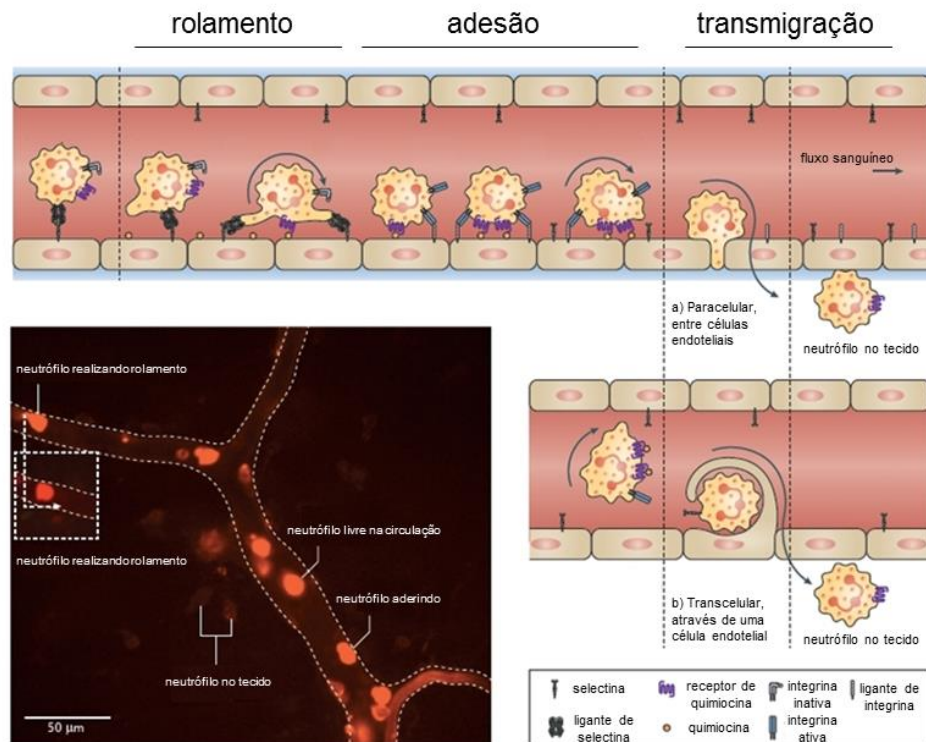
Caso microrganismos invasores consigam superar com sucesso as barreiras físicas da pele e membranas mucosas, ganhando acesso aos tecidos, sinais gerados pelos patógenos e macrófagos residentes nos sítios de inflamação ativam as células endoteliais locais, que capturam os PMN circulantes e os guiam através do revestimento endotelial (BORREGAARD, 2010). Para que isso aconteça, os PMN se movem na direção de um gradiente quimiotático formado por moléculas quimioatraentes liberadas a partir do sítio inflamado (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

O rolamento, interação iniciação inicial dos PMN com o endotélio, ocorre após a expressão de P-selectina e E-selectina na membrana das células endoteliais, devido a estímulos pró-inflamatórios, como TNF- α ou produtos bacterianos. Estas selectinas ligam-se ao receptor PSGL-1 (do inglês *P-selectin ligand 1*), constitutivamente expresso na membrana do PMN, estabelecendo o contato inicial entre PMN e endotélio ativado (BORREGAARD, 2010), guiando os PMN na direção do fluxo sanguíneo (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Inicialmente, esta ligação é fraca, desfazendo-se e refazendo-se constantemente, caracterizando assim o rolamento. Esta fraca adesão permite a posterior adesão ao endotélio (BORREGAARD, 2010). O rolamento dos PMN facilita o seu contato com as quimiocinas presentes no endotélio, ativando-os. Esta ativação resulta em mudança conformacional de suas integrinas, como LFA-1 e MAC-1, aumentando sua afinidade aos seus ligantes expressos pelo endotélio, como ICAM-1, caracterizando assim a adesão firme (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Uma vez que os PMN estejam firmemente aderidos ao endotélio, eles transmigram em direção ao foco da lesão. Dois caminhos podem ser tomados: transmigração paracelular (entre células endoteliais) ou transcelular (através de uma célula endotelial) (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013) (Figura 3). O contato dos PMN com o endotélio ocorre principalmente nas vênulas pós-capilares, onde a parede do vaso é fina e seu diâmetro suficiente pequeno de modo a permitir o contato do PMN,

mas larga o suficiente para não ser obstruída pelos PMN ao realizarem adesão firme com o endotélio (BORREGAARD, 2010).

Figura 3 - Recrutamento de PMN da corrente sanguínea aos tecidos



Nota: Duas possíveis formas de transmigração são conhecidas: paracelular e transcelular. O rolamento é dependente da expressão de selectinas, enquanto que a adesão firme e a transmigração dependem da ativação de integrinas. PMN ativados seguem um gradiente de quimiocinas através do endotélio, dirigindo-se a sítios preferenciais de transmigração. A imagem de microscopia intravital mostra uma vênula pós-capilar da pele com PMN.

Fonte: Adaptado de Kolaczowska; Kubes, 2013.

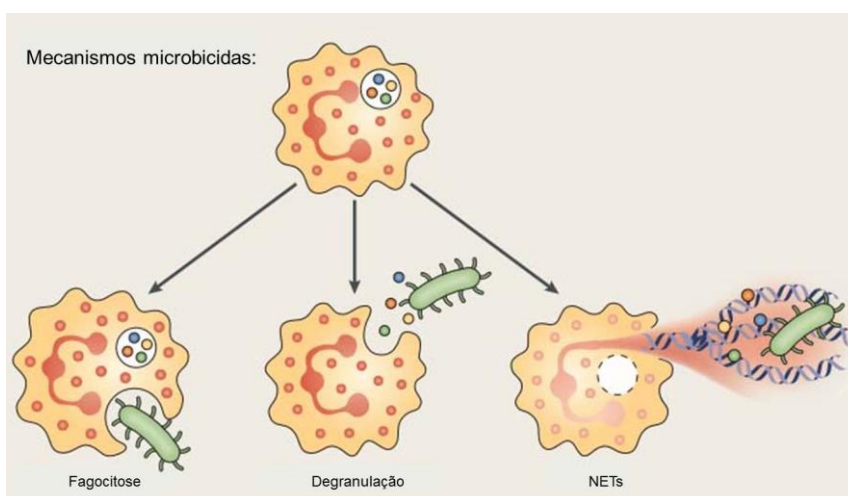
Os PMN são classicamente caracterizados pela sua habilidade fagocítica, liberação de enzimas líticas a partir de seus grânulos e produção de ROS com potencial microbicida (MANTOVANI et al., 2011). Porém, é importante haver um equilíbrio dinâmico entre a produção e eliminação destas moléculas, de modo que não ocorra dano aos próprios PMN e/ou aos tecidos em condições fisiológicas, e para isso, os PMN contam com diversas defesas antioxidantes, como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007). Por outro lado, quando em baixas concentrações, as ROS podem estar envolvidas na regulação de cascatas de sinalização, modulando sua migração, fagocitose, secreção de enzimas lisossomais, induzindo também mudanças na ativação de

fatores de transcrição que medeiam respostas imediatas ao estresse celular, como NF- κ B (Adler et al., 1999; FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007).

Além da fagocitose, produção de moléculas efetoras clássicas como ROS e enzimas com potencial microbicida, e uma vasta gama de citocinas pró- e anti-inflamatórias, os PMN podem liberar redes fibrilares chamadas armadilhas celulares neutrofílicas (*NETs* - do inglês *neutrophil extracellular traps*) (Figura 4), formadas por componentes nucleares (como DNA e histonas), associados a proteínas dos grânulos primários (como mieloperoxidase e elastase), secundários (como lactoferrina) e terciários (como metaloproteinase-9 (MMP-9)). Estas redes aprisionam microrganismos, facilitando a interação dos patógenos com as proteínas granulares e sua consequente remoção. Muitos PMN podem morrer neste processo – morte celular que recebeu a denominação de netose (MANTOVANI et al., 2011).

Os PMN não migram necessariamente em função de um gradiente quimiotático gerado por patógenos. Quando as células sofrem injúrias estéreis, como queimaduras, hipóxia ou produtos químicos, liberam para o meio extracelular moléculas endógenas conhecidas como DAMPs (do inglês *danger-associated molecular patterns*), como ATP ou colágeno, ativando a resposta inflamatória (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Além disso, PMN estão frequentemente presentes em tumores (SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014).

Figura 4 - Mecanismos microbicidas dos PMN



Nota: PMN são células com função primordial na defesa do organismo contra agentes estranhos. Entre seus diversos mecanismos microbicidas, destaca-se a fagocitose de microrganismos, liberação de enzimas a partir de seus grânulos e liberação de *NETs*, formadas por componentes nucleares (como DNA e histonas), além de proteínas granulares (como mieloperoxidase, elastase e MMP-9).

Fonte: Adaptado de Kolaczowska; Kubes, 2013.

Inflamação e Câncer

A relação entre inflamação e câncer não é recente. Em 1863, Virchow observou que os tumores frequentemente surgiam em sítios de inflamação crônica. Além disso, o conceito de que a inflamação crônica predispõe indivíduos a vários tipos de câncer já está bem consolidado na literatura (MANTOVANI, 2008).

A ligação entre a inflamação e o câncer consiste em duas vias: uma extrínseca, dirigida por condições inflamatórias que aumentam o risco de câncer; e uma intrínseca, dirigida por alterações genéticas que causam inflamação e neoplasia (tais como ativação de oncogenes e repressão de genes supressores de tumor). Estas vias convergem, resultando na ativação de fatores de transcrição (como STAT3 e HIF-1 α), coordenando a expressão de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e prostaglandinas, recrutando leucócitos para o foco tumoral. As citocinas, por sua vez, podem ativar os mesmos fatores nas células inflamatórias, resultando na produção adicional de mediadores de modo a manter um microambiente inflamatório (MANTOVANI, 2008).

Microambiente Tumoral

Os tumores não são massas homogêneas, formadas apenas por células cancerosas, mas sim tecidos complexos compostos por diversos tipos celulares que realizam interações heterotípicas entre si. A maior parte desse tecido é formada por células normais (sem alterações genéticas) que são recrutadas, formando o estroma associado ao tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O microambiente tumoral é indispensável no processo de carcinogênese, promovendo a sobrevivência, proliferação e migração das células tumorais (COUSSENS; WERB, 2002). As células inflamatórias são consideradas primordiais na promoção da progressão tumoral, devido à sua capacidade de liberar grande variedade de citocinas, quimiocinas, mediadores genotóxicos (como ROS) e enzimas remodeladoras de matriz extracelular (como MMP-9), promovendo assim a proliferação e invasão celular, induzindo a mutagênese e estimulando a

angiogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Devido a estas características, os mediadores inflamatórios levam à transformação e à iniciação de um fenótipo maligno e a partir de uma expressão sustentada promovem a progressão do tumor (COUSSENS; WERB, 2002).

Inicialmente, o sistema imune pode detectar e eliminar células tumorais. Caso essa eliminação seja parcial, as células tumorais podem permanecer dormentes ou acumular mutações adicionais que podem modular seus antígenos específicos, normalmente detectados pelo sistema imune. Caso o sistema imune continue falhando em eliminar completamente o tumor, pode ocorrer a seleção de variantes tumorais capazes de resistir ou suprimir a resposta imune antitumoral. A partir de então o sistema imune não é mais capaz de conter o crescimento tumoral (SWANN; SMYTH, 2007).

A inibição do crescimento tumoral pelo sistema imune é parte do processo denominado vigilância imune, no qual os leucócitos circulantes ou teciduais eliminam células tumorais. Por outro lado, os leucócitos podem secretar fatores que estimulam a angiogênese, remodelam a matriz extracelular e promovem crescimento celular, facilitando assim o crescimento e disseminação do tumor. O balanço entre essas ações opostas é coordenado por múltiplos fatores secretados pelas células tumorais, estroma tumoral e as próprias células do sistema imune. Os tumores frequentemente produzem fatores imunossupressores, como TGF- β (do inglês *transforming growth factor beta*) e IL-10, que agem em PMN e em outras populações do sistema imune. A imunossupressão progressiva é frequentemente observada em tumores em estágio avançado, o que pode ser parcialmente mediado por células como linfócitos Treg, macrófagos e PMN. PMN recrutados podem liberar citocinas e quimiocinas que contribuem para o recrutamento de mais PMN, além de outros leucócitos (SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014).

Em outro cenário, é possível que as células tumorais se desenvolvam em locais livres de inflamação. Neste caso, secretam uma ampla gama de citocinas e quimiocinas, que além de regular a atividade de outras células tumorais, recrutam e modulam as funções de leucócitos, como PMN e macrófagos. As células do infiltrado inflamatório, por sua vez, afetam a ativação de outras células do sistema imune, atraindo mais leucócitos para a massa tumoral. Dependendo do tipo de tumor, os leucócitos podem compor mais de 90% da massa tumoral total (SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014). Portanto, independentemente do tumor se formar

em local prévio de inflamação ou não, o seu desenvolvimento se caracterizará por um microambiente inflamatório contendo células do sistema imune.

Neutrófilos Associados ao Tumor

O possível envolvimento dos PMN na tumorigênese foi sugerido há mais de meio século atrás (SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014). No entanto, devido à sua meia-vida de poucas horas e seu fenótipo totalmente diferenciado, o papel destas células na biologia do câncer foi considerado insignificante por muito tempo (MANTOVANI et al., 2011). Apenas nos últimos anos começou-se a dar maior ênfase aos PMN no contexto da progressão tumoral.

Tradicionalmente, as células do sistema imune são consideradas protetoras do organismo, eliminando tanto infecções microbianas quanto células cancerígenas potenciais. Porém, no contexto da progressão tumoral, as células do sistema imune podem ter suas funções modificadas, sendo “alternativamente ativadas”, de modo a agir contra o organismo, em prol do tumor (SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014). Recentemente, Fridlender e colaboradores (2009) forneceram evidências à existência de dois fenótipos diferentes de PMN que podem estar presentes no foco tumoral. Estes fenótipos foram denominados TAN N1 (antitumoral) e TAN N2 (pró-tumoral), em analogia à polarização sofrida por macrófagos associados ao tumor (TAM), amplamente descrita na literatura (FRIDLENDER et al., 2009; HOUGHTON, 2010; GREGORY; HOUGHTON, 2011; MANTOVANI et al., 2011; FRIDLENDER; ALBELDA, 2012; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012; SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014).

Neutrófilos associados ao tumor, denominados TAN (do inglês *tumor-associated neutrophils*), são originados de PMN da corrente sanguínea, que são recrutados pelo foco tumoral através da liberação de fatores quimiotáticos, como a quimiocina IL-8 em humanos, por exemplo (GREGORY; HOUGHTON, 2011). Esta quimiocina tem um forte poder de atração sobre PMN, ligando-se no receptor CXCR2 expresso na superfície destas células (WAUGH; WILSON, 2008). Outros fatores com ação quimiotática sobre os PMN normalmente produzidos por células tumorais são as quimiocinas humanas MIP-1 α (CCL3) e huGCP-2 (CXCL6); assim

como as quimiocinas murinas MIP-1 α e KC (CXCL1) (PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012). Em camundongos, os TAN são identificados pela expressão dos marcadores CD11b e Ly6G, possuindo baixa expressão de marcadores de macrófagos, como F4/80 (FRIDLENDER; ALBELDA, 2012).

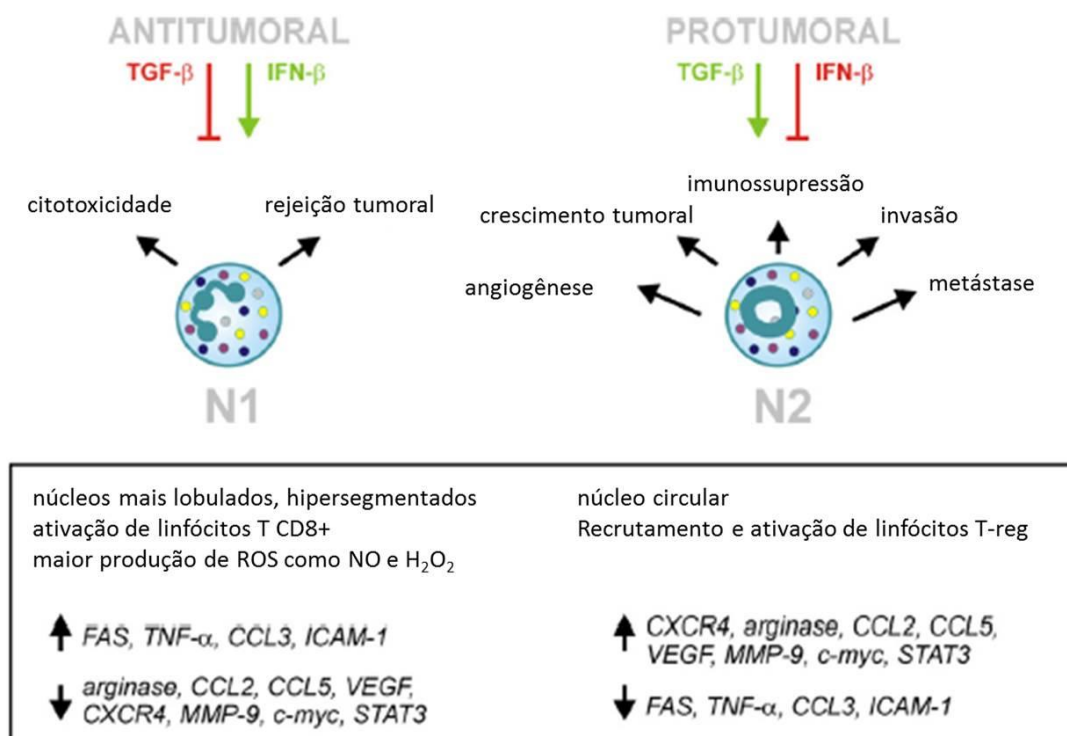
De um modo geral, a presença de TAN em tumores variados tem sido correlacionada a um mau prognóstico em estudos clínicos (GREGORY; HOUGHTON, 2011). Além de reduzir a expectativa de vida dos pacientes com câncer, a presença ou a maior densidade de TAN tem sido associada, por exemplo: à maior capacidade de crescimento de carcinomas renais e elevação do risco de recidivas (JENSEN et al., 2009); ao aumento do número de nódulos em pacientes com carcinoma hepatocelular (LI et al., 2011); ao caráter mais metastático da doença em pacientes com adenocarcinoma gástrico (ZHAO et al., 2012). Entretanto, essas observações não são ubiqüitárias, uma vez que também há relatos correlacionando o aumento do número de TAN com um bom prognóstico em portadores de câncer, no caso, em pacientes do sexo feminino portadores de carcinoma gástrico avançado de uma região do norte da Itália (CARUSO et al., 2002).

Evidências mostram que em modelos tumorais murinos não tratados, os TAN geralmente possuem um fenótipo N2 (GREGORY; HOUGHTON, 2011). Apesar de todos os mecanismos por trás dessa polarização ainda não serem conhecidos (FRIDLENDER; ALBELDA, 2012), esta plasticidade do PMN é regulada por moléculas presentes no microambiente tumoral (PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012). Estudos recentes mostram que a presença de sinais como a citocina TGF- β no microambiente tumoral (FRIDLENDER et al. 2009), assim como a ausência da citocina interferon-beta (IFN- β) em animais nocaute (JABLONSKA et al., 2010; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012) são responsáveis pela indução da polarização N2 em TAN, explicando parcialmente este fenômeno (Figura 5).

No microambiente tumoral, os TAN podem afetar o tecido neoplásico em diferentes aspectos. Estudos em modelos murinos demonstram que os TAN, de acordo com seu estado de ativação e repertório de citocinas, podem favorecer ou inibir a proliferação de células tumorais (HOUGHTON, 2010). Entretanto, os estudos que mostram atividade tumoricida dos TAN geralmente envolvem manipulação no microambiente tumoral, como por exemplo, inibição da via de sinalização do TGF- β (FRIDLENDER et al., 2009) ou utilização de modelos tumorais geneticamente

modificados para superexpressar citocinas específicas, modulando artificialmente o microambiente (HOUGHTON, 2010). A depleção destes TAN atenua os efeitos anti-tumorais de tratamentos imunológicos ou permite o crescimento do tumor (FRIDLENDER et al., 2009; FRIDLENDER; ALBELDA, 2012). Por outro lado, os TAN podem contribuir para o crescimento tumoral através da expressão de diversos fatores, como arginase (FRIDLENDER et al., 2009), ou para a metástase e angiogênese, através da liberação de fatores como MMP-9 e VEGF (JABLONSKA et al., 2010). Além disso, os TAN (pró-tumorais) também podem inibir a ativação de linfócitos T CD8⁺ (FRIDLENDER et al., 2009) e recrutar linfócitos Treg, contribuindo ainda mais para a manutenção de um microambiente supressor (MISHALIAN et al., 2014). A depleção destes TAN reduz o crescimento tumoral, aumentando a atividade citotóxica dos linfócitos (FRIDLENDER et al., 2009).

Figura 5 - Polarização de PMN em TAN



Nota: TAN podem exercer tanto funções anti- quanto pró-tumorais na progressão e desenvolvimento do câncer. Este fenômeno é denominado "polarização", e já se sabe que as citocinas TGF-β e IFN-β influenciam neste processo. Os PMN quando polarizados para o fenótipo N1 podem induzir citotoxicidade e mediar rejeição tumoral. Por outro lado, quando polarizados para o fenótipo N2, podem contribuir à progressão tumoral ao induzirem angiogênese, invasão, metástase e imunossupressão.

Fonte: Adaptado de Piccard; Muschel; Opdenakker, 2012.

A funcionalidade dos TAN também pode ser influenciada pelo estágio do desenvolvimento tumoral. Estas células tendem a se concentrar nas periferias do tumor em estágios iniciais da carcinogênese, possuindo um fenótipo mais citotóxico (N1) e produzindo níveis maiores de NO e H₂O₂; enquanto que em tumores estabelecidos, os TAN progressivamente diminuem sua citotoxicidade, adquirindo um perfil mais pró-tumorigênico (N2), espalhando-se ao longo do centro tumoral e produzindo menos ROS nocivas ao tumor (MISHALIAN et al., 2013).

Além dos diferentes níveis de citotoxicidade sobre os tumores, os TAN também podem ser definidos por níveis diferenciais de expressão de marcadores moleculares definidos. Os TAN N1, além da maior produção de ROS, são caracterizados molecularmente pela expressão de altos níveis de ICAM-1 e iNOS, assim como das citocinas CCL3 e TNF- α (FRIDLENDER et al., 2009; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012; MISHALIAN et al., 2013; SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014). Por outro lado, estão aumentados nos TAN N2 os níveis de marcadores como CCL2, CCL5, CCL17, arginase (FRIDLENDER et al., 2009; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012; MISHALIAN et al., 2013; SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014), CXCR4, MMP-9 e VEGF (JABLONSKA et al., 2010; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012; SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014), o que lhes confere a capacidade de suporte ao tumor.

Diante destas evidências, os TAN presentes no microambiente tumoral são de extrema importância em diversas etapas da carcinogênese, tornando-os importantes alvos para a terapia contra o câncer. Outra questão importante é desvendar qual ou quais seriam os componentes do microambiente tumoral que poderiam estar atuando de modo a modificar o fenótipo dos TAN, polarizando-os para um fenótipo N2.

Microvesículas

Há mais de meio século atrás, estudos preliminares analisando o efeito de diferentes velocidades de centrifugação do plasma sobre a coagulação do mesmo, mostraram aumento no seu tempo de coagulação quando submetido a forças de centrifugação maiores, tanto em voluntários sadios quanto em pacientes hemofílicos.

Na época, foi atribuída como justificativa a esse fenômeno a explicação que “o fator coagulante presente no plasma é retirado pelo processo de centrifugação a altas velocidades, estando presente no pellet cuja sedimentação é causada por esta operação” (CHARGAFF; WEST, 1946). Duas décadas depois, foi identificado no plasma humano um material particulado, medindo entre 20 nm e 50 nm, isolado a partir de inúmeras centrifugações diferenciais, recebendo o nome de poeira plaquetária ou “platelet dust”, por conter fosfolípidios e apresentar atividade coagulante semelhante à de plaquetas. Suspensões desse material restauravam o tempo de coagulação em plasmas desprovidos de “platelet dust”, complementando assim as observações de Chargaff e West (WOLF, 1967).

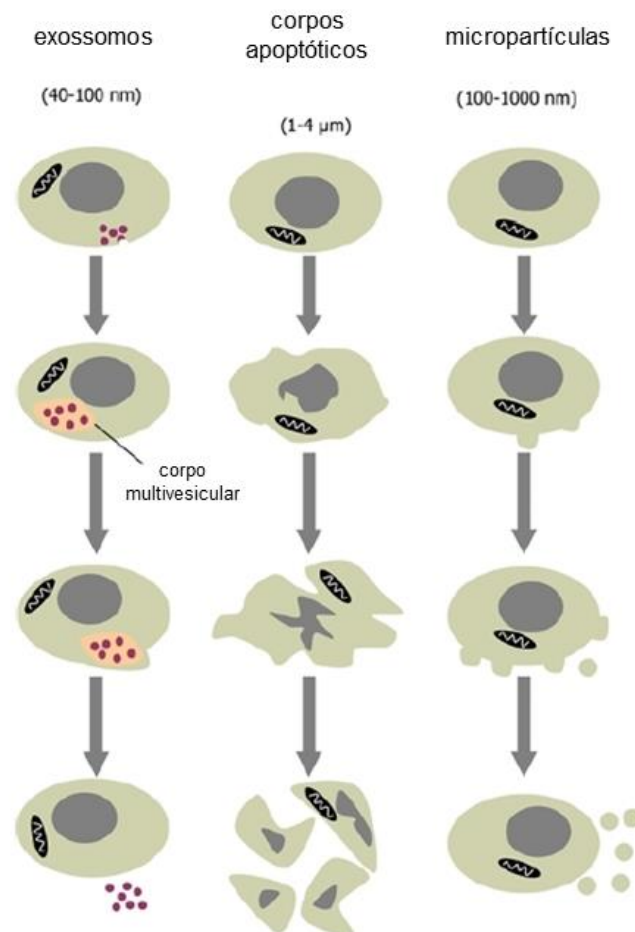
A homeostase de organismos multicelulares resulta de um balanço sutil entre proliferação celular e degeneração. As células diferenciam-se, expandem-se e realizam suas funções especializadas, até sofrerem morte celular programada e serem, conseqüentemente, removidas por fagocitose. Em cada estágio de sua vida, a célula é sujeita a vários estímulos, que culminam na liberação de minúsculos fragmentos derivados da membrana plasmática, que recebem a denominação geral de microvesículas (MV) (HUGEL et al., 2005). As MV originam-se preferencialmente de regiões específicas da membrana plasmática, onde há distribuição diferencial de lipídios, como o colesterol, chamadas *lipid rafts* (RAK, 2010).

As MV são importantes agentes de sinalização celular e transferência de moléculas biologicamente ativas de uma célula para outra, podendo modular o metabolismo das células-alvo (COCUCCI; RACCHETTI; MELSOLESI, 2009). Este processo de comunicação celular é único, pois permite à célula de origem transferir diversas moléculas de uma só vez, como moléculas normalmente insolúveis no meio extracelular ou no estado ativo (como receptores fosforilados) para outra célula, protegendo-as assim da degradação extracelular. O conteúdo das MV depende em grande parte do seu tipo celular de origem. Porém, o estado de ativação celular também tem influência sobre o conteúdo das MV liberadas, inclusive o seu destino. Além disso, a composição da MV pode variar como resultado de sua possível fusão com outra (RAK, 2010).

Ainda não há um consenso geral na literatura referente ao estabelecimento de uma nomenclatura oficial para os vários tipos de MV liberados pelas células, devido aos vários tipos celulares que podem liberá-las, diferentes procedimentos de purificação ou mecanismos diferentes de geração (SHIFRIN et al., 2013). No

entanto, muitos autores consideram duas categorias principais, diferenciadas pela morfologia, moléculas de superfície, conteúdo, e mecanismos pelos quais são geradas: as micropartículas (MP), também chamadas de ectossomos, cujas dimensões variam entre 0,1-1 μm ; e exossomos (Exo), que possuem dimensões menores, da ordem de 0,05-0,1 μm (BURGER et al., 2013; SHIFRIN et al., 2013). Corpos apoptóticos, formados exclusivamente durante os estágios finais da apoptose celular, também são considerados por alguns autores como um tipo de vesícula extracelular (BURGER et al., 2013) (Figura 6).

Figura 6 - Origens das principais classes de vesículas extracelulares



Nota: Existem vários tipos de vesículas extracelulares, sendo as mais estudadas os exossomos, micropartículas e corpos apoptóticos. Exossomos são formados primeiramente através de brotamento da membrana, responsável pela formação de vesículas intracelularmente, que se acumulam em corpos multivesiculares, e conseqüente se fundem com a membrana plasmática, liberando os exossomos maduros. Micropartículas, por sua vez, são formadas diretamente a partir do brotamento da membrana plasmática. Já os corpos apoptóticos são formados durante os estágios finais da apoptose, após o encolhimento da célula, podendo conter DNA e/ou organelas.

Fonte: Adaptado de Burger et al., 2013.

A membrana plasmática possui uma composição e distribuição lipídica altamente específica: fosfatidilcolina e esfingomielina localizados na camada externa, enquanto que fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanol-amina são compartimentalizadas na membrana interna. A preservação desta assimetria, mantida por um complexo enzimático transmembranar, é essencial à manutenção da integridade da célula. Quando os níveis de Ca^{+2} intracelulares aumentam, esse estado de assimetria dinâmico é desfeito, resultando na externalização de PS na membrana (PICCIN; MURPHY; SMITH, 2006). Esta externalização causa um desbalanço de massa na membrana, e de modo a corrigi-lo, a célula emite a MP. Além disso, vias proteolíticas dependentes de Ca^{+2} resultando na reorganização do citoesqueleto celular também estão envolvidas nessa emissão (CASTELLANA; TOTI; FREYSSUNET, 2010).

As MP apresentam altos níveis de PS em sua membrana (RAK, 2010). Embora os mecanismos responsáveis pela vesiculação de MP ainda não sejam totalmente elucidados, estudos mostram que a reorganização do citoesqueleto e da membrana plasmática sejam eventos cruciais para a emissão dessas vesículas (BURGER et al., 2013; SHIFRIN et al., 2013).

Já os Exo apresentam menores níveis de PS em sua membrana (RAK, 2010). Ao contrário das MP, são sintetizados pela via endocítica. Inicialmente, ocorre a invaginação da membrana, formando um corpo multivesicular, que pode ser degradado por lisossomos ou se fundir com a membrana plasmática, com a consequente liberação de Exo maduros (SHIFRIN et al., 2013; KOWAL; TKACH; THÉRY, 2014). Exo podem ser identificados também por marcadores específicos, como TSG101 e CD63 (BURGER et al., 2013).

A produção de MV ocorre em diversos processos fisiológicos, como diferenciação ou ativação celular. Além disso, essa produção também pode ser deflagrada em condições patológicas, como trombose, infecções, desordens cardiovasculares, assim como o câncer, onde a ativação de oncogenes mutantes, como K-ras, assim como a perda de função de genes supressores de tumor, como p53, pode estimular a liberação destas estruturas em grandes quantidades (RAK, 2010). A proporção de MV circulantes no sangue periférico também pode se elevar nestas condições (CASTELLANA; TOTI; FREYSSUNET, 2010), podendo inclusive ser detectadas em outros fluidos biológicos como o líquido cérebro-espinhal e urina

(COCUCCI; RACCHETTI; MELSOLESI, 2009). Estudos correlacionam a presença de MV a vários aspectos da tumorigênese, como progressão tumoral, invasão, angiogênese e metástase (RAK, 2010). Portanto, sabendo que as células tumorais geram grande quantidade de MV e que os TAN no microambiente tumoral apresentam predominantemente um fenótipo pró-tumoral, se torna interessante investigar a importância das MV de células tumorais na polarização de PMN. Além disso, a inibição do efeito das MV em PMN poderia se tornar uma importante estratégia no tratamento do câncer.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho foi investigar a contribuição das microvesículas (MV) liberadas pelas células MV3, uma linhagem de melanoma humano altamente invasivo, na polarização de PMN humanos.

1.2 Objetivos Específicos

Este trabalho teve como seguintes objetivos específicos:

- a) caracterizar o conteúdo do meio condicionado de MV3 determinando a presença de MV neste meio;
- b) analisar os efeitos das MV sobre funções de PMN humanos, tais como quimiotaxia, produção de *ROS*, liberação de *NET* e apoptose, avaliando também a sua capacidade de ativar vias de sinalização e induzir alterações na expressão de mediadores pró- e anti-inflamatórios;
- c) caracterizar fenotipicamente os PMN tratados com MV, através da expressão diferencial de marcadores moleculares;
- d) investigar os efeitos dos PMN tratados com MV na sobrevivência de células tumorais de melanoma humano, MV3.

2 MATERIAL E MÉTODOS

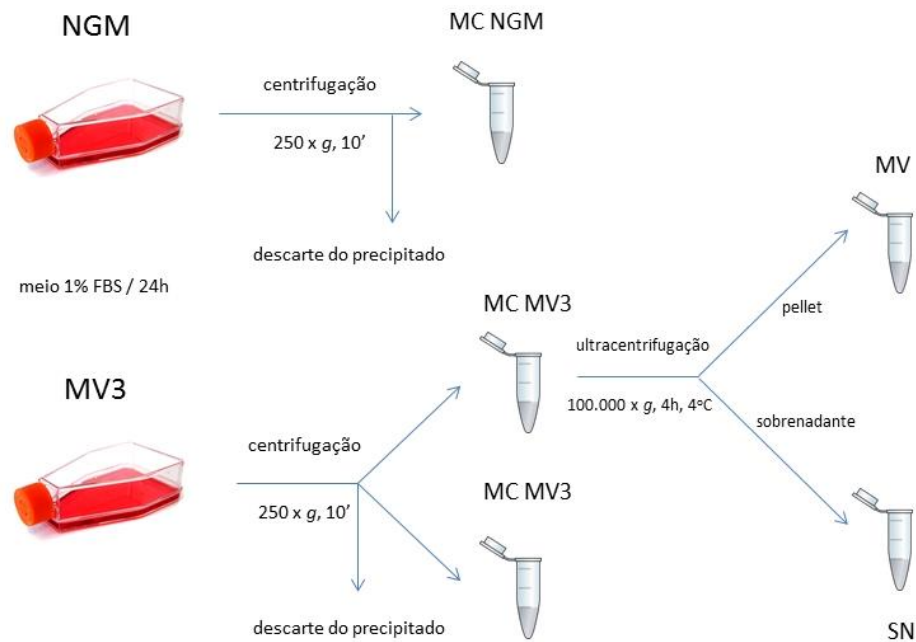
2.1 Linhagens celulares

Em nossos ensaios, utilizamos a linhagem celular de melanócitos humano NGM, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro; e a linhagem celular de melanoma humano com alto potencial metastático MV3, doada pelo Dr. Cezary Marcienkevickz da Temple University PA, EUA (VAN MUIJEN et al., 1991).

2.2 Obtenção de meio condicionado (MC) de melanócito NGM e MC, sobrenadante (SN) e MV de melanoma MV3

As células NGM e MV3 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Gibco, Life Technologies, Calrsbad, California, EUA), suplementado com 23 mM de NaHCO_3 (Merck), 21,8 mM de HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 60 mg/L de penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100 mg/L de streptomina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e com 10% de FBS (Cultilab, Campinas, Brasil), em pH 7,2. As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO_2 e as células regularmente testadas e mantidas negativas para contaminação com micoplasma. Após as células atingirem confluência de 100%, a suplementação do meio de cultura foi alterada para 1% de FBS e após 24 horas, o meio condicionado (MC) liberado pelas células foi coletado. Para eliminação de possíveis debris celulares, o MC foi centrifugado a 250 x g por 10 minutos e o sobrenadante coletado. As MV foram obtidas após ultracentrifugação do MC da célula tumoral a 100.000 x g por 4 horas, sendo posteriormente ressuspensas em meio de cultura DMEM sem suplementação de FBS, em volume equivalente ao volume do MC (Figura 7). Em alguns ensaios, o MC sem as MV (sobrenadante, SN), também foi utilizado.

Figura 7 - Obtenção de meio condicionado (MC) de melanócito NGM e MC, sobrenadante (SN) e MV de melanoma MV3



Fonte: O autor, 2016.

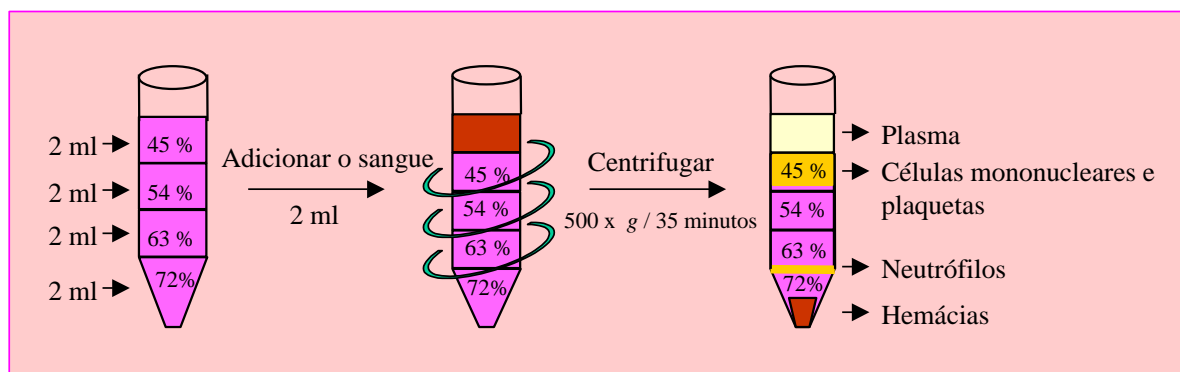
2.3 Quantificação de MV

Após a purificação das MV, as amostras foram quantificadas através de duas metodologias: **A)** Tecnologia Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), utilizando-se o equipamento de análise de partículas por real time Zetaview, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de MV foram diluídas em 1 mL de PBS e injetadas na câmara de amostra em diluições adequadas (aproximadamente 100 amostras por campo) com uma seringa hipodérmica. Onze campos diferentes da câmara de amostra foram registrados em vídeo digital e analisados pelo software Particlemetrix usando uma sensibilidade de 85%; **B)** Por citometria de fluxo, através da marcação positiva para anexina-V (Abcam, Cambridge, Inglaterra) (Camus e col., 2013). Para delimitação do tamanho da MV foi utilizada *bead* de 1 μm , em leitura prévia. Paralelamente à leitura de MV foi adicionada *bead* de 2 μm em concentração determinada para se estimar a quantidade precisa de MV.

2.4 Purificação de PMN

PMN foram isolados de sangue periférico de doadores saudáveis (aprovado pelo comitê de ética CAAE:38257914.7.0000.5259), na presença de ácido etileno diamina tetra acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) 5% em PBS estéril, através de gradiente descontínuo de Percoll (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), diluído em Hank's (Gibco, Life Technologies, Calrsbad, California, EUA), (Saldanha-Gama e col., 2010) como mostra a Figura 8. O sangue é dispensado cuidadosamente sobre o Percoll e posteriormente submetido à centrifugação (500 x g, 35 minutos, aceleração 2/desaceleração 2, temperatura ambiente). Posteriormente, as camadas superiores contendo células mononucleares são descartadas e a camada de PMN, contendo hemácias é coletada. Posteriormente as hemácias são removidas por lise hipotônica, seguida de centrifugação (250 x g, 10 minutos, aceleração 2/desaceleração 2) e os PMN ressuspensos em meio RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, Calrsbad, California, EUA), suplementado com 23 mM de NaHCO_3 , 21,8 mM de Hapes, 60 mg/L de penicilina e 100 mg/L de streptomina ou em meio HBSS, conforme o experimento a ser realizado posteriormente. A contagem do número de PMN/mL foi realizada em Câmara de Neubauer através do uso de solução de Turk para corar o núcleo dos PMN.

Figura 8 - Purificação de PMN humanos através de gradiente descontínuo de Percoll



Fonte: Moraes, 2003.

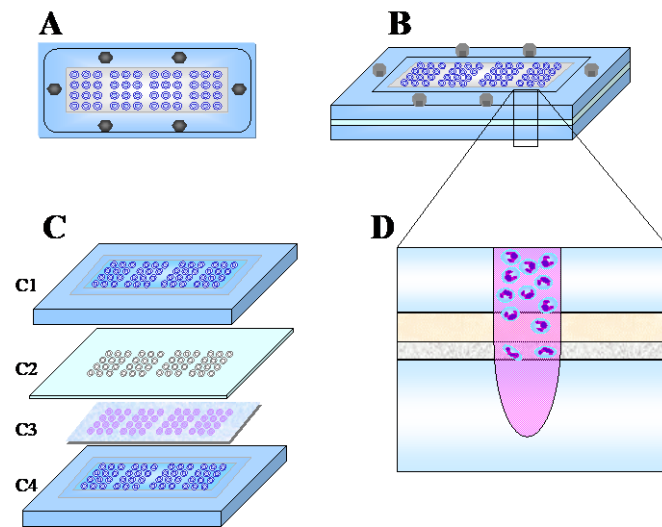
2.5 Quimiotaxia de PMN *in vitro*

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados na Câmara de Boyden modificada (Figura 9) de 48 poços (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, Maryland, EUA). Os agentes quimiotáticos N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) – 100 nM; interleucina-8 (IL-8) – 30 nM; MV (10% v/v); MC de melanoma MV3 (10% v/v), sobrenadante de MV3 (SN; 10% v/v), MC de melanócito NGM (10% v/v); em um volume final de 28,5 µL) foram inseridos no compartimento inferior da câmara, e os PMN (10^4 células em 50 µL – 10^6 cels/mL) foram inseridos no compartimento superior da câmara, sendo incubados durante 1 hora a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂, para migrar em direção aos estímulos, isolados por uma membrana de policarbonato de 5 µm (GE Healthcare).

Após este período, a quimiotaxia foi avaliada por uma série de diferentes ensaios experimentais: **A)** Inicialmente, foi investigado se as MV teriam potencial quimiotático e qual o melhor percentual que desencadearia este efeito. Para isso, os PMN foram colocados para migrar em direção a MV nos percentuais de 1% v/v, 10% v/v e 50% v/v; **B)** Investigamos, em seguida, se além das MV, o MC de melanoma MV3 rico ou isento de MV também apresentaria propriedades quimiotáticas na concentração 10% v/v; **C)** De modo a investigar possíveis vias de sinalização que poderiam estar envolvidas no efeito de migração das MV, os PMN foram pré-tratados ou não com apocinina (100 µM), genisteína (5 µM), LY294002 (10 µM, Calbiochem), toxina pertussis (10 µM, Sigma) ou SB225002 (1 µM, Calbiochem) por 5 minutos antes de inseridos no compartimento superior da câmara para migrar em direção as MV purificadas (10% v/v).

Para avaliar a migração, foi realizada a raspagem das células que não migraram e as membranas foram coradas com o kit Diff-Quik® (Dade Behring, Dudingen, Suíça), conforme fabricante, para a visualização dos PMN. As membranas foram lavadas para a retirada do excesso de corante, montadas em lâminas e os PMN foram contados em microscópio óptico Olympus BX41 (Tokyo, Japão), em aumento de 100x.

Figura 9 - Representação esquemática de uma câmara de Boyden modificada



Legenda: **A)** Vista superior; **B)** Vista lateral; **C)** Compartimentos da câmara: C1 – Compartimento superior, C2 – Silicone que separa os compartimentos, C3 – Filtro de policarbonato e C4 – Compartimento inferior da câmara; **D)** Representação em maior aumento de um poço da câmara.

Fonte: Moraes, 2003.

2.6 Ensaio de apoptose

Amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram incubadas durante 20 horas em meio RPMI contendo MV (10% v/v), MC de melanoma MV3 (10% v/v), MC de melanócito NGM (10% v/v) ou LPS (10 μ g/mL) a 37°C em uma atmosfera 5% de CO₂. Após esse período, a apoptose foi avaliada por duas metodologias: **A)** Morfologia celular, na qual as células foram centrifugadas em lâminas por 6 minutos a 500 x g e coradas com o kit Diff-Quik® e contadas por microscopia ótica (Olympus BX41) em aumento de 100x, levando em consideração as células que possuíam núcleo picnótico e volume diminuído; **B)** Exposição de fosfatidilserina, na qual onde as células foram incubadas com tampão de ligação para anexina V, contendo Hepes 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM e MgCl₂ 0,75 mM em pH 7,4 e marcadas com anexina V conjugada a isotiocianato de fluoresceína-dextrano (FITC) (1:50) por 20 minutos, à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, foi

adicionado iodeto de propídio (PI, 10 µg/mL em tampão de ligação) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), para descartar a hipótese de necrose, e em seguida analisadas por citometria de fluxo (Accuri C6[®], BD Bioscience, San Jose, California, EUA) para a identificação de células com eventos positivos para anexina V (células anexina V⁺/PI⁻ e anexina V⁺/PI⁺). A fluorescência da anexina e do PI foram detectadas nos canais FL1 e FL3, respectivamente.

2.7 Ensaio de liberação de *NETs*

Amostras de PMN (10⁶ cels/mL) foram incubadas durante 3 horas em meio RPMI contendo MV (10% v/v), MC de melanoma MV3 (10% v/v), MC de melanócito NGM (10% v/v) ou LPS (10 µg/mL) a 37°C em uma atmosfera 5% de CO₂. Após este período, a liberação de *NETs* foi avaliada por três metodologias: **A)** Dosagem de DNA extracelular, na qual as amostras foram tratadas durante 20 minutos com DNase a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂ para a desvinculação da NET ligada ao PMN e centrifugadas em seguida por 10 minutos a 400 x g, 4°C e o sobrenadante contendo DNA extracelular coletado. A quantificação e pureza do DNA foram determinadas através do espectrofotômetro NanoVue[®] Plus (GE Healthcare) (NEL et al., 2016). De modo a descartar a possibilidade de contaminação das MV por LPS, foi utilizada polimixina (25 µg/mL); **B)** Imunofluorescência para histona e elastase, na qual as células foram centrifugadas em lâminas por 6 minutos a 500 x g e fixadas por paraformaldeído 4%, contendo 4% de sacarose durante 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram bloqueadas com BSA 5% diluída em PBS durante 30 minutos e incubadas *overnight* a 4°C na presença de anticorpo primário policlonal de cabra IgG anti-histona (subunidade H3) humana (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Após três lavagens, as lâminas foram incubadas com anticorpo murino anti-IgG de cabra conjugado a PE (ficoeritrina) (1:200, Santa Cruz Biotechnology) durante uma hora. Após três lavagens, as lâminas foram incubadas *overnight* na presença de anticorpo primário policlonal de cabra IgG anti-elastase humana (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Após três lavagens, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário murino anti-IgG de cabra conjugado a FITC (1:200, Santa Cruz Biotechnology) durante uma hora. Finalmente, após três lavagens, as lâminas foram

incubadas com DAPI Prolong (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante e então lamínulas foram montadas nas lâminas, utilizando-se-esmalte para selá-las. As imagens foram adquiridas em microscopia de fluorescência (Olympus), em aumento de 600x, em comprimentos de onda de emissão e excitação de 555 nm e 580 nm, respectivamente para o PE; 485 nm e 530 nm, respectivamente para o FITC; e 365 nm e 440 nm, respectivamente, para o DAPI; **C)** Dosagem da atividade de elastase, a qual foi realizada utilizando-se o substrato fluorogênico elastase V (100 μ M, Calbiochem), conforme descrito pelo fabricante. A atividade da elastase liberada através de *NET* foi monitorada no leitor de placas EnVision[®] (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA), através da fluorescência emitida pela sonda quando hidrolisada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 nm e 460 nm, respectivamente.

2.8 Ensaio de produção de ROS intracelular

Amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram ressuspensas em solução HBSS e carregadas por 30 minutos com a sonda intracelular CM-H₂DCFDA (5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetil-ester) (DCF-DA) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) (10 μ M) antes dos ensaios. Após a incubação, as células foram lavadas para a remoção da sonda não internalizada, e tratadas durante 3 horas com MV (10% v/v), MC de melanoma MV3 (10% v/v), SN (10% v/v), MC de melanócito NGM (10% v/v) ou LPS (10 μ g/mL) a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂. O tratamento com acetato miristato de forbol (PMA) foi utilizado como controle positivo para a produção de ROS intracelular. Durante o tratamento, a oxidação da sonda DCF-DA foi monitorada no leitor de placas EnVision[®], através da fluorescência emitida pela sonda, quando oxidada, em comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 nm e 530 nm, respectivamente.

2.9 Ensaio de atividade antioxidante “cell-free”

A atividade antioxidante das MV (10% v/v), MC de melanoma MV3 (10% v/v) ou SN (10% v/v) foi determinada incubando-se tais amostras com H₂O₂ (100 µM) por 30 minutos a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂. O antioxidante Trolox[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizado a 100 µM como controle positivo de atividade antioxidante. Após 30 minutos, a oxidação da sonda Luminol (Invitrogen, Carlsbad, EUA) pelo H₂O₂ foi monitorada no leitor de placas EnVision[®] através da luminescência emitida pela sonda, quando oxidada, e o grupo apenas com H₂O₂ foi considerado como 0% de atividade antioxidante, isto é, a luminescência obtida com H₂O₂ foi considerada como 100% de oxidação.

2.10 Obtenção de extratos de RNA

Amostras de PMN ($5,0 \times 10^6$ cels/mL) foram incubadas durante 1 hora e meia em meio RPMI contendo MV (10% v/v), MC de melanoma MV3 (10% v/v), ou LPS (10 µg/mL) em uma atmosfera de 5% de CO₂. Ao final do tratamento, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 800 x g, 4°C e ressuspensas em Trizol[®] (Life Technologies). A purificação dos extratos de RNA totais foi realizada através da separação por coluna através do kit RNeasy Mini Spin Column (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação e pureza do RNA total foram determinadas através do espectrofotômetro NanoVue[®] Plus.

2.11 RT-PCR e PCR em tempo real

A partir dos extratos de RNA totais foram sintetizadas moléculas de DNA complementar (cDNA) no termociclador Verity 96-Well (Applied Biosystems) através de uma reação de transcriptase reversa, utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo do

fabricante. Esta reação foi realizada por 10 minutos a 25 °C, seguida de 120 minutos a 37°C, seguida de 5 minutos a 85 °C, seguida por resfriamento das amostras a 4°C até o seu armazenamento. A amplificação do cDNA utilizando-se primers específicos para as sequências humanas referentes aos genes para ICAM-1, iNOS, CCL3, arginase, CXCR4, MMP-9, VEGF, CCL2, CCL5, CXCR2, IL-10 e TGF- β e do controle endógeno (actina) foi realizada no Rotor Gene Q utilizando-se o kit SybrGreen® PCR Kit em uma reação de PCR em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante. Todos os primers, o Rotor Gene Q e o SybrGreen® PCR Kit foram obtidos da Qiagen. Os níveis de expressão de cada gene candidato foram normalizados internamente em relação aos níveis de actina. A quantidade relativa foi expressa através do método $-2^{\Delta\Delta Ct}$. A reação de PCR em tempo real foi realizada por 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 5 segundos a 95°C e 10 segundos a 60°C, seguidos por uma curva padrão de desnaturação.

2.12 Expressão do marcador CXCR4 por citometria de fluxo

Amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram incubadas durante 3 horas em meio RPMI contendo MV (10% v/v), MC de melanoma MV3 (10% v/v), SN (10% v/v), MC de melanócito NGM (10% v/v) ou LPS (10 μ g/mL) a 37°C em uma atmosfera 5% de CO₂. Ao final do tratamento, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 400 x g, 4°C e ressuspensas em tampão FACS (PBS contendo 2% FBS, EDTA 5 mM) e incubados por 15 minutos com anticorpo anti-CD184 (anti- CXCR4) conjugado à APC (aloficocianina) (Biolegend) e a expressão do marcador CXCR4 nos PMN foi verificada por citometria de fluxo, no canal FL4. Foram capturados aproximadamente 50000 eventos/amostra.

2.13 Obtenção de extratos totais

Amostras de PMN ($5,0 \times 10^6$ cels/mL) foram incubadas durante 3 horas em meio RPMI contendo MV (10% v/v), MC de melanoma MV3 (10% v/v), MC de

melanócito NGM (10% v/v) ou LPS (10 µg/mL) a 37°C em uma atmosfera 5% de CO₂. Ao final do tratamento, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 800 x g, 4°C e lisadas em tampão de lise Hepes (10 mM), EDTA (5 mM), Sacarose (250 mM) (HES), contendo DNase (2 mg/mL), coquetel de inibidores de proteases (1:500), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 2 µM, e ortovanadato de sódio 1 mM, em pH 7,2. A concentração de proteína de cada amostra foi determinada utilizando-se o kit de dosagem de proteína BCA (Thermo Scientific, Rockford, EUA) e após a determinação do conteúdo proteico, as amostras de lisado celular foram ressuspensas em tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-ME, 10% glicerol, 0.001% azul de bromofenol) e fervidas por 5 minutos para a sua desnaturação. Nos experimentos foram aplicados aproximadamente 30 µg de proteínas por poço.

2.14 *Immunoblotting*

As amostras de extrato total celular foram submetidas à eletroforese em géis de SDS-PAGE a 12%, onde ocorreu a separação das proteínas de acordo com o peso molecular. As proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) no sistema Trans-Blot Turbo[®] (Bio-Rad) durante 30 minutos. As membranas foram então bloqueadas em solução Tween-TBS (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7.5, 0,1% Tween-20) contendo 5% de BSA durante 1 hora. Após algumas lavagens consecutivas com Tween-TBS, as membranas foram incubadas com anticorpos primários de coelho: anti-actina (1:1000, Millipore) e anti-arginase (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Após algumas lavagens consecutivas com Tween-TBS, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à biotina (1:10000, Invitrogen). Após algumas lavagens consecutivas com Tween-TBS, as membranas foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) (1:10.000) por 1 hora. Para a revelação das bandas imunorreativas foi utilizado um kit de quimiluminescência (ECL – Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate) (Thermo Scientific, Rockford, EUA). As membranas foram fotografadas

utilizando o ChemiDoc[®] Imaging System (Bio-Rad) e a densitometria das bandas foi quantificada no programa ImageJ.

2.15 Ensaio de MTT em co-culturas de PMN e melanoma MV3

Células de melanoma MV3 (10^5 por poço) foram previamente plaqueadas em placas de 96 poços (volume final de 100 μ L). Ao atingirem confluência próxima de 100%, a purificação de PMN foi iniciada. PMN (10^6 cels/mL) foram incubados durante 3 horas em meio RPMI contendo MV (10% v/v), MC de melanoma MV3 (10% v/v), SN (10% v/v) ou LPS (10 μ g/mL) a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂. Após a incubação, os PMN foram lavados e ressuspensos em meio HBSS e iniciou-se a co-cultura de PMN com células MV3 em confluência durante 24 horas. Após 20 horas, as células foram incubadas com MTT (5 mg/mL – 10 μ L) por 4 horas e após este período, a metabolização do composto em cada grupo foi monitorada no leitor de placas EnVision[®], em comprimento de onda de absorbância de 570 nm. A dissolução dos cristais de formazan produzidos pelo metabolismo mitocondrial das células foi realizada adicionando-se 100 μ L de álcool isopropílico por poço.

2.16 Ensaio de produção de NO

Amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram carregadas por 30 minutos com a sonda DAF-FM DA (4-Amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato) (DAF) (Invitrogen, Carlsbad, EUA) (10 μ M) antes dos ensaios. Após a incubação, as células foram lavadas para a remoção da sonda não internalizada e tratados durante 3 horas com MV (10% v/v), MC de melanoma MV3 (10% v/v), SN (10% v/v), MC de melanócito NGM (10% v/v) ou LPS (10 μ g/mL) a 37°C em uma atmosfera 5% de CO₂. Ao final do tratamento, a oxidação da sonda DAF foi monitorada pelo fotomultiplicador FL1 por citometria de fluxo (Accuri C6; BD).

2.17 Ensaio de produção de peróxido nitrito

Células de melanoma MV3 (10^5 por poço) foram previamente plaqueadas em placas de 96 poços. Ao atingirem confluência próxima de 100%, a purificação de PMN foi iniciada. PMN (10^6 cels/mL) foram incubados durante 3 horas em meio RPMI contendo MV (10% v/v), MC de melanoma MV3 (10% v/v), SN (10% v/v) ou LPS (10 μ g/mL) a 37°C em uma atmosfera 5% de CO₂. Durante a última hora da polarização, os PMN foram incubados com a sonda HPF (10 μ M). Após este período, os PMN foram lavados para a remoção da sonda não internalizada, ressuspensos em HBSS e postos em contato com células de melanoma MV3. Durante a co-cultura a produção de OONO⁻ pelos PMN foi monitorada no leitor de placas EnVision[®], através da fluorescência emitida pela sonda quando oxidada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 nm e 515 nm, respectivamente.

2.18 Análises estatísticas

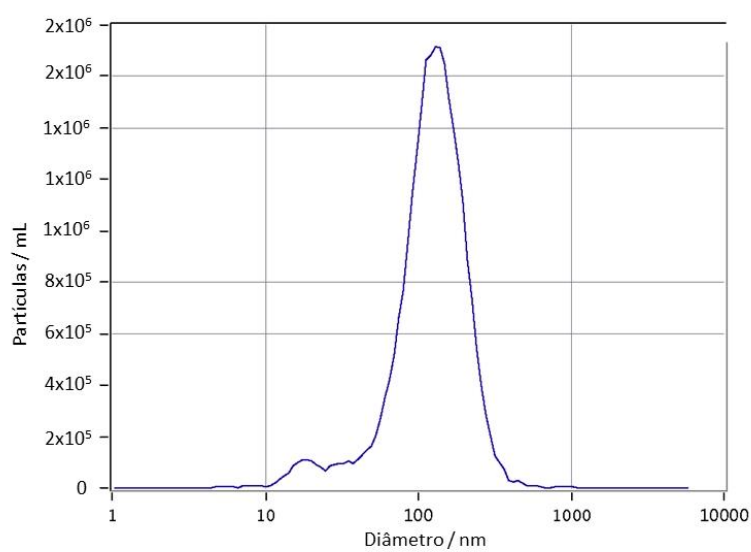
Os resultados foram analisados através do teste one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Alguns ensaios foram analisados através do teste *t* de Student diretamente. Foi determinada como significância estatística $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Análise do tamanho das microvesículas liberadas por células de melanoma humano MV3

De modo a avaliar o perfil das MV liberadas pela célula de melanoma MV3, foi investigado através de real time Zetaview®, o tamanho das diferentes populações de MV presentes no meio condicionado de MV3 após 24 de cultura (Figura 10). Desta forma, foi observado que existe grande quantidade não somente de Exo (10 – 100 nm) como também de MP (100 nm – 1 µm) neste meio.

Figura 10 - Distribuição das dimensões das MV presentes no MC do melanoma MV3



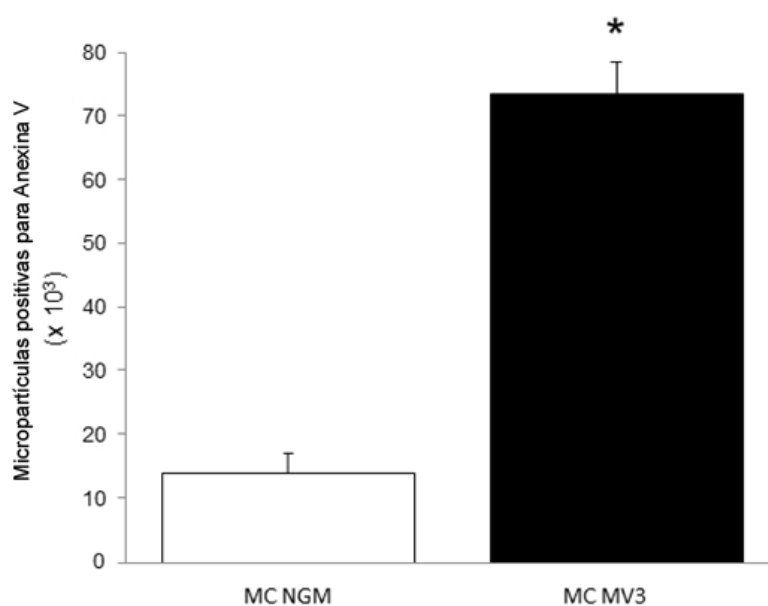
Nota: As amostras de MV purificadas foram ressuspensas em PBS, e através do real time Zetaview® foi investigada a distribuição de diferentes tamanhos das MV presentes em meio.

Fonte: O autor, 2016.

3.2 As células de melanoma humano MV3 produzem grande quantidade de micropartículas

Uma vez que foram detectadas no meio condicionado das células MV3 vesículas com tamanho compatível ao de MP, investigamos nesse meio a presença de MP e comparamos com a produção de MP por melanócitos humanos NGM. Foi observado através da marcação com anexina V, por citometria de fluxo, que após 24 horas em cultura as células de melanoma MV3 liberam altas quantidades de MP (Figura 11), quando comparadas às células de melanócito NGM. O cálculo do número de MP produzidas foi feito utilizando-se para correção *beads* de 2 μm de diâmetro, conforme descrito na sessão de métodos.

Figura 11 - Quantificação de MP nos MC de melanócito NGM e MC de melanoma MV3



Nota: Através da marcação para anexina V e do uso de *beads* de 2 μm de diâmetro, foi realizada a quantificação de MP dos MC de melanócito NGM e MC de melanoma MV3, obtidos de células NGM e MV3 ao atingirem 100% de confluência em cultura e após 24 horas com suplementação de 1% de FBS. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes (* $p < 0,05$, comparado ao grupo controle).

Fonte: O autor, 2016.

3.3 As MV induzem a migração de PMN

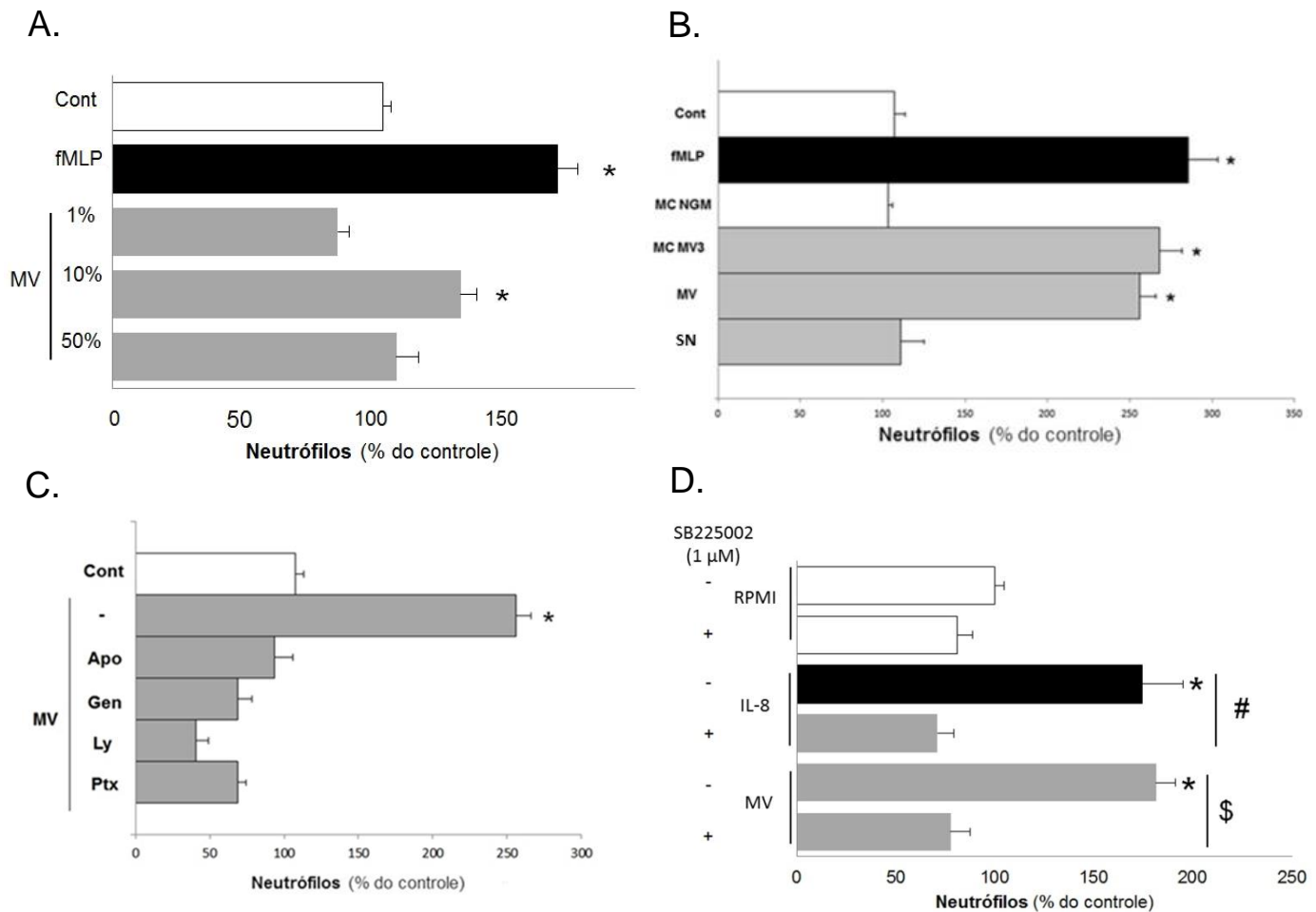
Primeiramente, foi testado o percentual de MV que induziria o melhor efeito quimiotático. O estímulo com MV no percentual de 10% v/v foi o que melhor induziu a migração de PMN (Figura 12.A). A partir de então, apenas este percentual foi utilizado em outros experimentos de quimiotaxia.

Posteriormente, foi observado que assim como as MV, o meio condicionado rico em MV também tem efeito quimiotático sobre os PMN. No entanto, ao se retirar as MV deste meio, este efeito não é mais observado, sugerindo que somente as MV seriam as responsáveis pelo efeito quimiotático do meio condicionado sobre os PMN (Figura 12.B).

Complementando os resultados anteriores, foram realizados outros ensaios de quimiotaxia de modo a verificar os mecanismos responsáveis pelos efeitos das MV sobre os PMN. Após o pré-tratamento das células com apocinina (inibidor da subunidade p47 da NADPH oxidase), genisteína (inibidor de tirosinas quinases), LY4002 (inibidor da PI3K) ou toxina pertussis (inibidor de receptores acoplados à proteína Gi- GiPCR), inibiu-se a migração dos PMN em direção às MV, evidenciando a importância de todas essas vias em seu efeito quimiotático (Figura 12.C).

Por último, suplementando o dado anterior, investigamos o papel dos receptores CXCR2, um GiPCR para quimiocinas CXC no efeito quimiotático das MV. O pré-tratamento das células com SB225002, potente inibidor seletivo deste receptor, inibiu a migração dos PMN em direção às MV, sugerindo que a ativação desta via influencia no efeito quimiotático (Figura 12.D).

Figura 12 - As MV induzem a migração de PMN



Nota: Amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram incubadas no compartimento superior da Câmara de Boyden para migrar em direção aos estímulos inseridos no compartimento inferior, isolados por uma membrana de policarbonato ($5\ \mu\text{m}$), durante 1 hora: (A) Curva de migração em direção ao estímulo por MV em diferentes percentuais. fMLP 100 nM foi usado como controle positivo. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes ($*p < 0,05$, comparado ao grupo controle); (B) MC de melanócito NGM ou MC de melanoma MV3 ou MV ou SN. fMLP 100 nM foi usado como controle positivo. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes ($*p < 0,05$, comparado ao grupo controle); (C) De modo a avaliar os mecanismos por trás do efeito quimioatraente das MV, PMN (10^6 cels/mL) foram pré-tratados ou não por 5 minutos com apocinina ($100\ \mu\text{M}$), genisteína ($5\ \mu\text{M}$), LY294002 ($10\ \mu\text{M}$) e toxina pertussis ($10\ \mu\text{M}$) antes da incubação no compartimento superior da Câmara de Boyden para migrar em direção ao estímulo das MV. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes ($*p < 0,05$, comparado ao grupo controle); (D) De modo a investigar a ativação específica da via regulada pelo receptor CXCR2, PMN (10^6 cels/mL) foram pré-tratados ou não por 5 minutos com SB225002 ($1\ \mu\text{M}$) antes da incubação no compartimento superior da Câmara de Boyden para migrar em direção ao estímulo das MV. IL-8 30 nM foi usada como controle positivo. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes ($*p < 0,05$, comparado ao grupo controle; $\$p < 0,05$, comparado ao grupo IL-8; $\#p < 0,05$, comparado ao grupo MV).

Fonte: O autor, 2016.

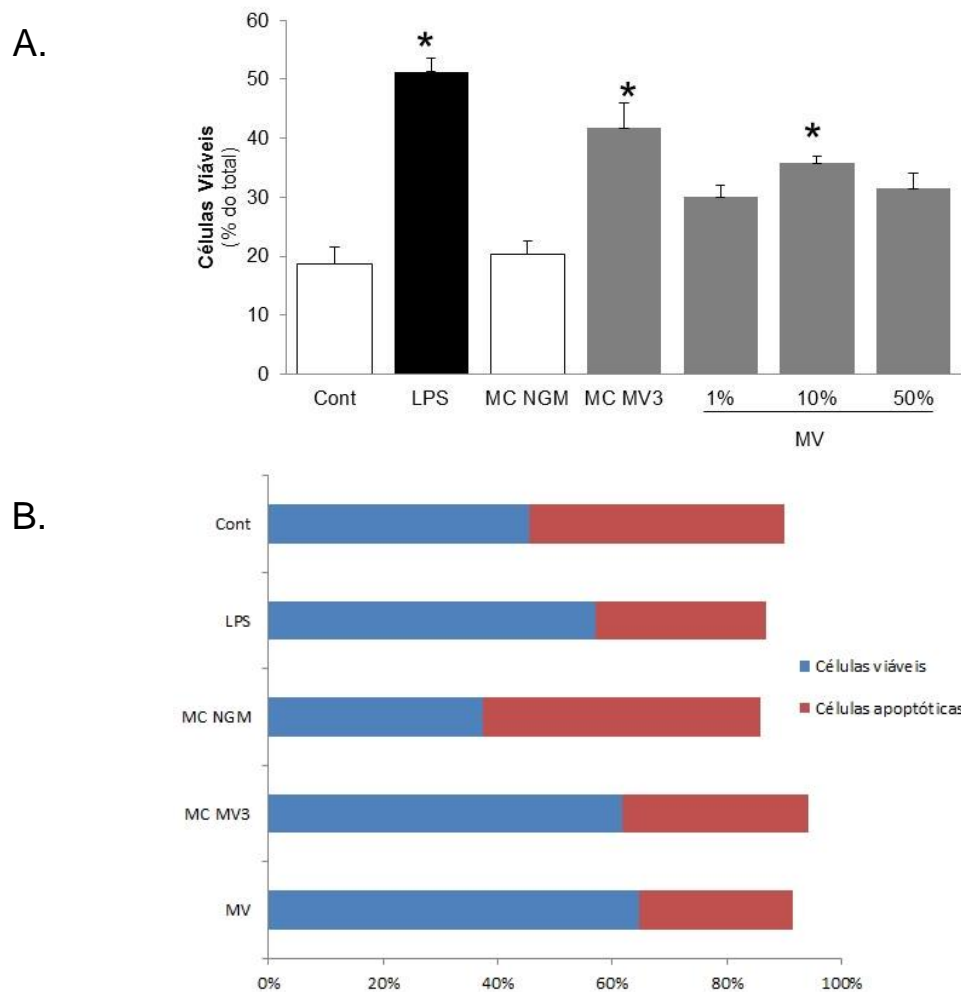
3.4 As MV retardam a apoptose espontânea de PMN

Outro efeito bastante comum em PMN polarizados tanto para o N1 quanto N2 é a proteção contra a apoptose (ANDZINSKI et al., 2014), refletida pelo aumento de sua meia-vida no microambiente tumoral. Por isso, foi avaliado o efeito das MV na apoptose espontânea de PMN analisando as células tratadas tanto morfológicamente, por microscopia óptica, quanto por citometria de fluxo.

A análise morfológica mostrou que tanto o estímulo com as MV (10% v/v), como a incubação com o meio condicionado das células tumorais, assim como o tratamento com LPS (controle positivo), aumentaram o tempo de sobrevivência dos PMN (Figura 13.A).

Células em processo de apoptose deslocam para a membrana externa as moléculas de fosfatidilserina (PS) presentes na camada interna da membrana plasmática, em condições basais. Complementando o resultado anterior, foi investigado por citometria de fluxo a marcação para anexina V, um ligante de PS, em células tratadas com as MV. A Figura 13.B sugere que as MV, assim como o meio condicionado de MV3, inibem a apoptose dos PMN.

Figura 13 - As MV retardam a apoptose espontânea de PMN



Nota: Amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram incubadas durante 20 horas com LPS 10 μ g/mL ou MC de melanócito NGM ou MC de melanoma MV3 ou MV, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram (A) centrifugadas, fixadas em lâminas e marcadas com Diff-Quik® e as células apoptóticas (aquelas com núcleo picnótico e volume reduzido) foram contadas através de microscopia óptica. Os resultados representam a média \pm SEM de dois experimentos independentes (* $p < 0,05$, comparado ao grupo controle); (B) centrifugadas e marcadas com anexina V e iodeto de propídio (PI) e então analisadas através de citometria de fluxo para identificação de células apoptóticas (células anexina V⁺/PI⁻ e anexina V⁺/PI⁺). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Fonte: O autor, 2016.

3.5 As MV induzem a formação de *NETs* em PMN

Outro efeito característico de PMN que assumem o perfil TAN é a produção de *NETs* (COOLS-LARTIGUE et al., 2014). Estas estruturas, compostas por DNA associado a proteínas são liberadas quando os PMN são ativados por estímulos como infecções ou durante o estabelecimento do tumor (ZAWROTNIAK; RAPALA-KOZIK, 2013).

Através da quantificação do DNA extracelular, foi observado que as MV induziram a produção de *NET*, de forma similar ao controle positivo LPS. O meio condicionado da célula tumoral também apresentou o mesmo efeito. (Figura 14.A).

Complementando o resultado anterior, foi observada através de microscopia de fluorescência a presença de duas proteínas essenciais à composição das *NETs*: histona e elastase, e comprovado que as MV e o meio condicionado da célula tumoral induziram a formação e liberação de *NETs* contendo estas proteínas (Figura 14.B).

Em seguida foi investigada a atividade da elastase nessas *NETs* e foi constatado que os PMN tratados com meio condicionado da célula tumoral apresentaram aumento da atividade elastásica, enquanto que as MV não induziram nenhum efeito (Figura 14.C).

Figura 14 - As MV induzem a formação de *NETs* em PMN (continua)

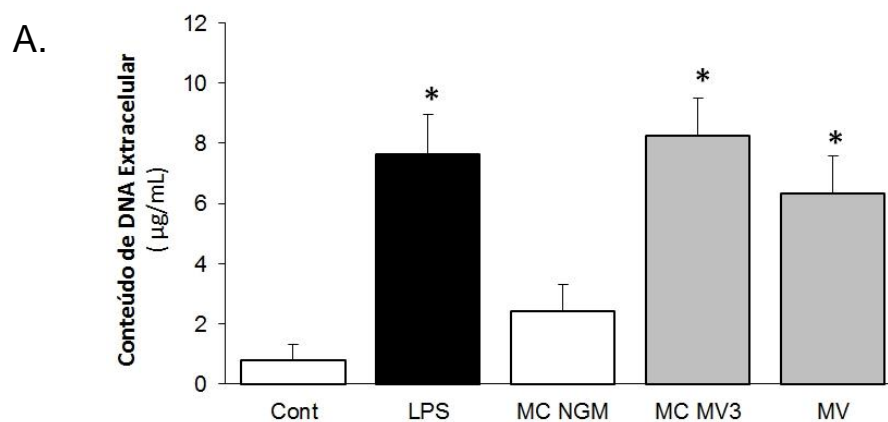
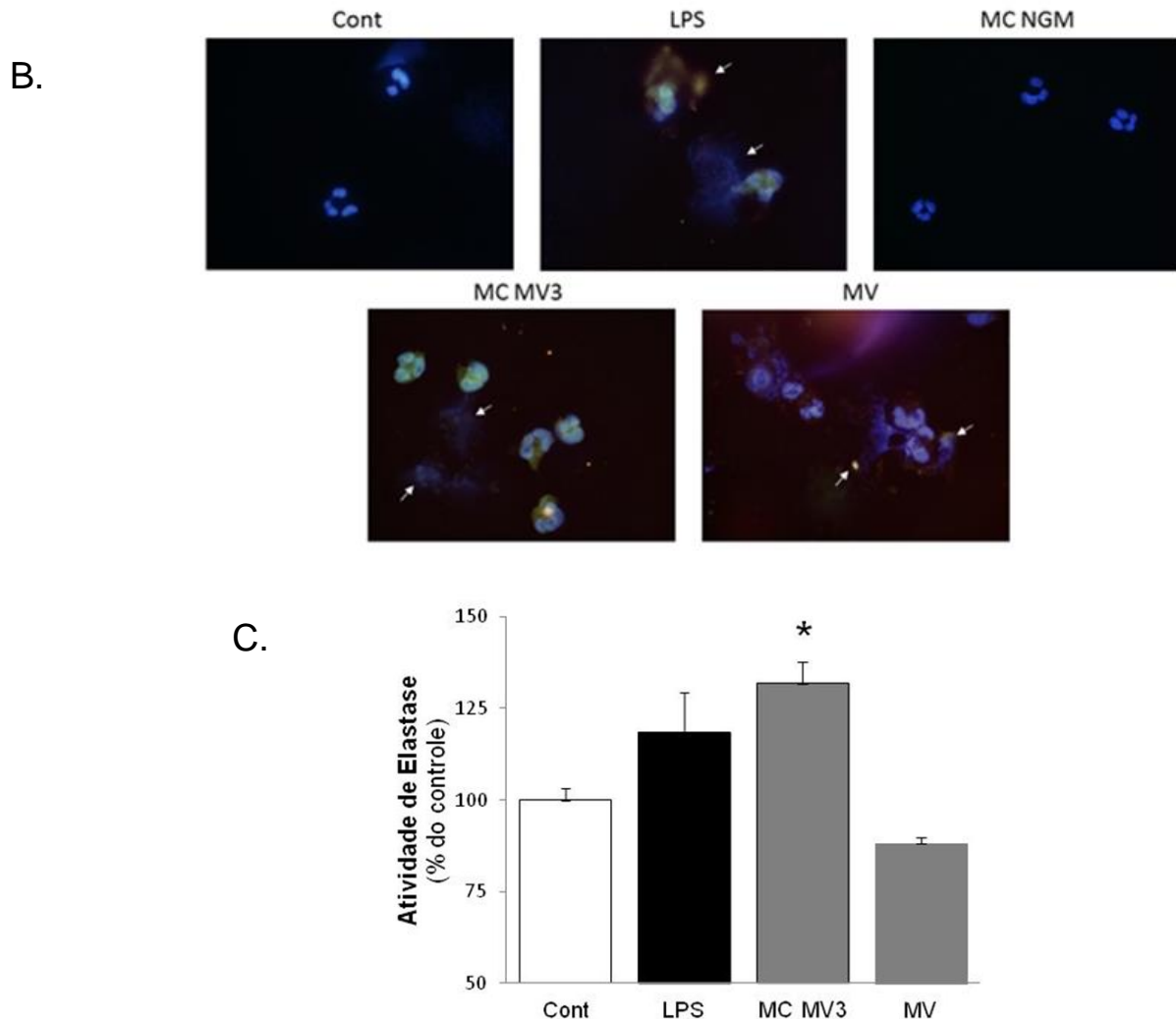


Figura 14 - As MV induzem a formação de *NETs* em PMN (conclusão)



Nota: Amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram incubadas durante 3 horas com LPS 10 $\mu\text{g/mL}$ ou MC de melanócito NGM ou MC de melanoma MV3 ou MV, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Após a incubação, (A) o DNA extracelular foi removido dos PMN após adição de DNase e o sobrenadante das amostras foi coletado e analisado no NanoVue[®]. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes (* $p < 0,05$, comparado ao grupo controle); (B) PMN foram centrifugados, fixados em lâminas e marcados com anticorpos primários anti-histona e anti-elastase, e secundários conjugados aos fluorocromos PE (detecção de histona – fluorescência vermelha) e FITC (detecção de elastase – fluorescência verde). O núcleo dos PMN foi marcado com DAPI Prolong e as lâminas foram analisadas através de microscopia de fluorescência em aumento de 600x para identificação de *NET* (indicadas pelas setas). Experimento representativo; (C) PMN foram incubados com o substrato fluorogênico elastase V por 30 minutos. A atividade da elastase liberada através de *NET* foi monitorada pela análise de fluorescência no leitor de placas EnVision[®], através da fluorescência liberada pela sonda, quando hidrolisada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 nm e 460 nm, respectivamente. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes (* $p < 0,05$, comparado ao grupo controle).

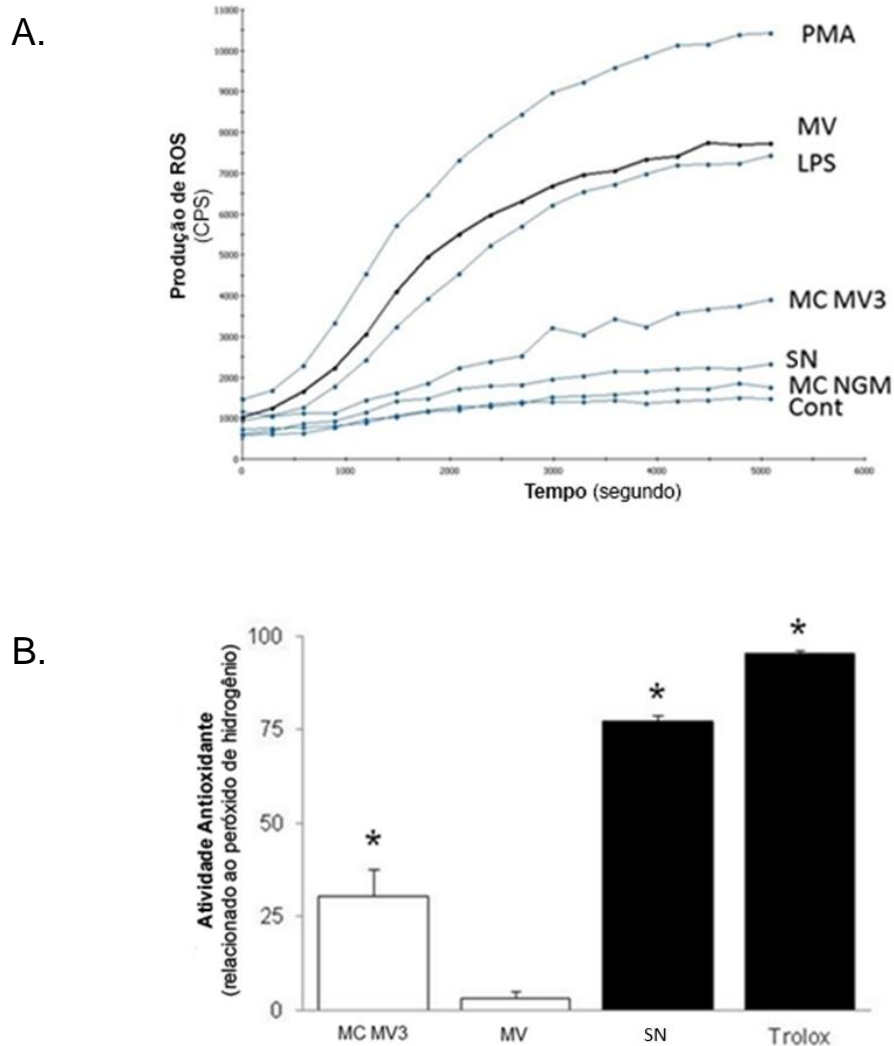
Fonte: O autor, 2016.

3.6 As MV induzem a formação de ROS intracelular em PMN

Quando polarizados para um fenótipo N1, PMN têm ação citotóxica sobre tumores de origens variadas, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*, através da produção de ROS, como H₂O₂ e superóxido (FRIDLENDER et al., 2009; HOUGHTON, 2010; GREGORY; HOUGHTON, 2011; MANTOVANI et al., 2011; FRIDLENDER; ALBELDA, 2012; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012; SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014). Por outro lado, conforme os tumores vão se estabelecendo e os TAN são polarizados para o perfil N2, sua produção de ROS é diminuída progressivamente (MISHALIAN et al., 2013).

A produção de ROS intracelular pelos PMN estimulados com as MV foi avaliada através da utilização da sonda DCF, que detecta uma série de ROS produzidas no meio intracelular. Neste ensaio, foi observado que as MV induziram a produção de ROS pelos PMN de forma similar ao LPS, já o meio condicionado rico em MV induziu a produção de baixas quantidades de ROS (Figura 15.A). Este resultado sugeriu que o meio condicionado poderia ter componentes anti-oxidantes que inibiriam o efeito pró-oxidante das MV. Corroborando esta ideia, observamos que o meio condicionado da célula tumoral contendo ou não MV apresentou propriedades antioxidantes em ensaios “*cell-free*” (Figura 15.B).

Figura 15 - As MV induzem a formação de ROS intracelular em PMN



Nota: (A) Antes do ensaio, amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram incubadas durante 30 minutos com a sonda intracelular DCF-DA ($10 \mu\text{M}$). Após a incubação, PMN foram lavados para a remoção da sonda não internalizada e incubados durante 3 horas com LPS $10 \mu\text{g/mL}$ ou MC de melanócito NGM ou MC de melanoma MV3 ou MV ou SN, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . O tratamento com acetato miristato de forbol (PMA) foi utilizado como controle positivo para a produção de ROS intracelular. Os experimentos foram analisados no leitor de placas EnVision[®], através da fluorescência emitida pela sonda, quando oxidada, em comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 nm e 520 nm, respectivamente. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes; (B) H_2O_2 ($100 \mu\text{M}$) foi incubada por 30 minutos com MC de melanoma MV3 ou MV ou SN, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . O antioxidante Trolox[®] ($100 \mu\text{M}$) foi utilizado como controle positivo de atividade antioxidante. Após 30 minutos, a oxidação da sonda Luminol pelo H_2O_2 foi monitorada no leitor de placas EnVision[®], através da luminescência emitida pela sonda quando oxidada, e o grupo apenas com H_2O_2 foi considerado como atividade antioxidante de 0%. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes (* $p < 0,05$, comparado ao grupo controle).

Fonte: O autor, 2016.

3.7 As MV aumentam a expressão gênica de vários marcadores TAN N2 em PMN

TAN polarizados apresentam diferenças na expressão de certos marcadores moleculares. TAN N2 tem elevada expressão de arginase, CXCR4, (FRIDLENDER et al., 2009; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012; MISHALIAN et al., 2013), MMP-9 e VEGF (JABLONSKA et al., 2010; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012). De forma a caracterizar molecularmente os PMN tratados com MV, investigamos por RT-PCR a expressão gênica destas moléculas. Investigamos também a expressão de marcadores TAN N1, como FAS e ICAM-1 (FRIDLENDER et al., 2009; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012; MISHALIAN e col., 2013), além da expressão do receptor CXCR2, da citocina anti-inflamatória IL-10 e da citocina imunossupressora TGF- β .

Foi observado que as MV aumentaram a expressão dos marcadores presentes em TAN N2, à exceção da MMP-9, e diminuíram a expressão de ICAM-1, sugerindo novamente a modulação dos PMN para um fenótipo tipo N2. Além disso, o meio condicionado da célula tumoral induziu os mesmos efeitos, em maior intensidade. Por outro lado, apesar do LPS ter levado ao aumento na expressão gênica dos marcadores de N1, a expressão gênica dos marcadores de N2 não foi alterada (Quadro).

Quadro - As MV aumentam a expressão gênica de vários marcadores TAN N2 em PMN

	Marcadores N1			Marcadores N2						Outros		
	ICAM-1	iNOS	CCL3	Arginase	CXCR4	MMP-9	VEGF	CCL2	CCL5	CXCR2	IL-10	TGF-β
LPS	+++	ND	+	=	=	=	=	=	-	-	=	=
MC MV3	+	ND	=	++++	+	++	+	=	=	=	+	=
MV	-	ND	=	++++	+	=	+	++	-	=	=	=

PA > 3	++++
2,5 < PA < 3	+++
2 < PA < 2,5	++
1 < PA < 2	+
PA < 0,5	-

Nota: Amostras de PMN ($5,0 \times 10^6$ cels/mL) foram incubadas durante 1 hora e meia com LPS 10 μ g/mL ou MC de melanoma MV3 ou MV, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lisadas e os extratos de RNA totais foram submetidos a RT-PCR para a síntese de DNA complementar (cDNA). O cDNA foi amplificado em PCR em tempo real para verificar o perfil de expressão gênica dos PMN através do uso de *primers* específicos. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, feitos em duplicata por gene. Percentual de aumento (PA): +++++ > 3; 3 > +++ > 2,5; 2,5 > ++ > 2; 2 > + > 1; - < 0,5, quando p < 0,05; ND, não detectado.

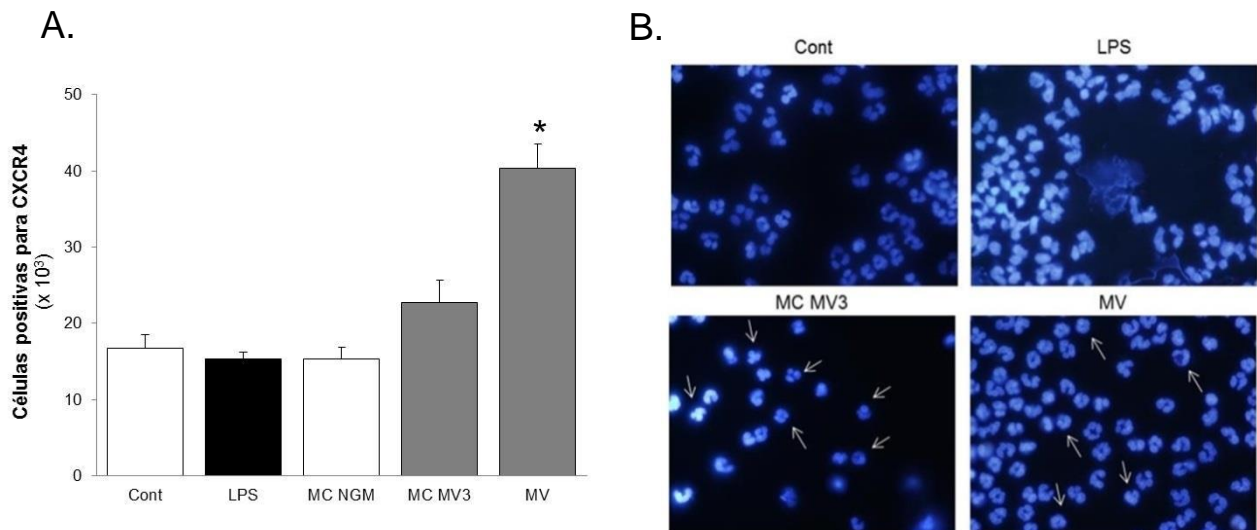
Fonte: O autor, 2016.

3.8 As MV aumentam a expressão do marcador CXCR4 e promovem o rearranjo da cromatina em PMN

Sabendo que TAN N2 têm maior expressão de CXCR4 (JABLONSKA et al., 2010; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012), resolvemos avaliar a expressão da molécula CD184 (CXCR4) na superfície dos PMN, através de citometria de fluxo.

Os PMN tratados com MV apresentaram aumento na expressão de CXCR4 (Figura 16.A). Além disso, as MV induziram também o rearranjo da cromatina nos PMN, que apresentaram núcleo circular, morfologia típica de TAN N2 (FRIDLENDER et al., 2009; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012; MISHALIAN et al., 2013) (Figura 16.B).

Figura 16 – As MV aumentam a expressão do marcador CXCR4 e promovem o rearranjo da cromatina em PMN



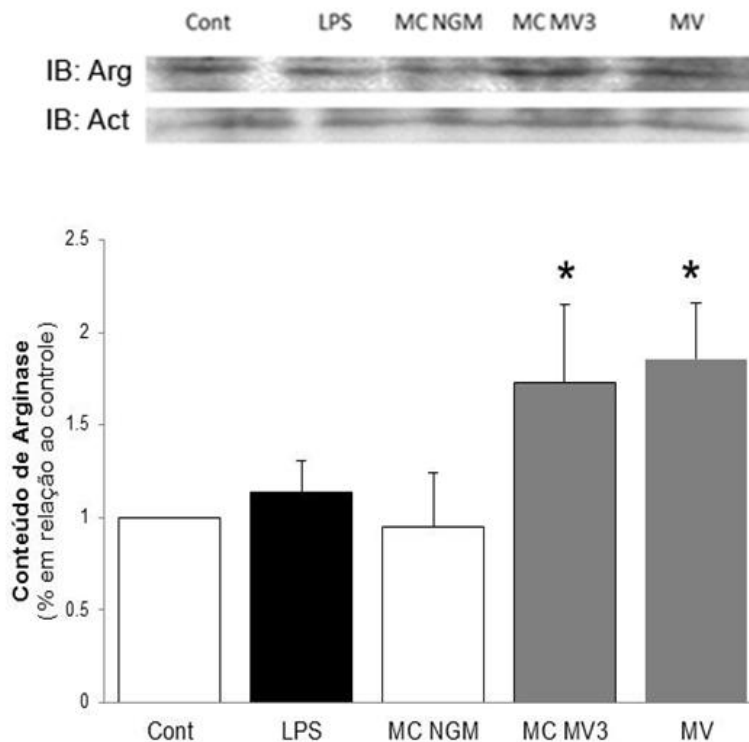
Nota: Amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram incubadas durante 3 horas com LPS 10 μ g/mL ou MC de melanócito NGM ou MC de melanoma MV3 ou MV, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após o tratamento, as células foram (A) incubadas por 15 minutos com anti-CD184 (CXCR4) conjugado a APC e a expressão deste marcador específico de superfície foi analisada através de citometria de fluxo. Os resultados representam a média \pm SEM de dois experimentos independentes (* $p < 0,05$, comparado ao grupo controle); (B) centrifugadas, fixadas em lâminas e marcadas com DAPI. As lâminas foram visualizadas em microscopia de fluorescência no aumento de 600x. Experimento representativo. A presença de células com núcleo celular está sendo indicada por setas brancas.

Fonte: O autor, 2016.

3.9 As MV aumentam o conteúdo proteico de arginase em PMN

Como os TAN N2 apresentam, caracteristicamente, um aumento na expressão de arginase (FRIDLENDER et al., 2009; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012; MISHALIAN et al., 2013), a expressão proteica desta proteína foi analisada através de Western Blotting. Foi observado que os PMN incubados com MV apresentam maior expressão de arginase, quando comparados ao controle, sugerindo uma alteração do fenótipo dos PMN a um perfil tipo N2. O meio condicionado da célula tumoral induziu os mesmos efeitos (Figura 17).

Figura 17 - As MV aumentam o conteúdo proteico de arginase em PMN



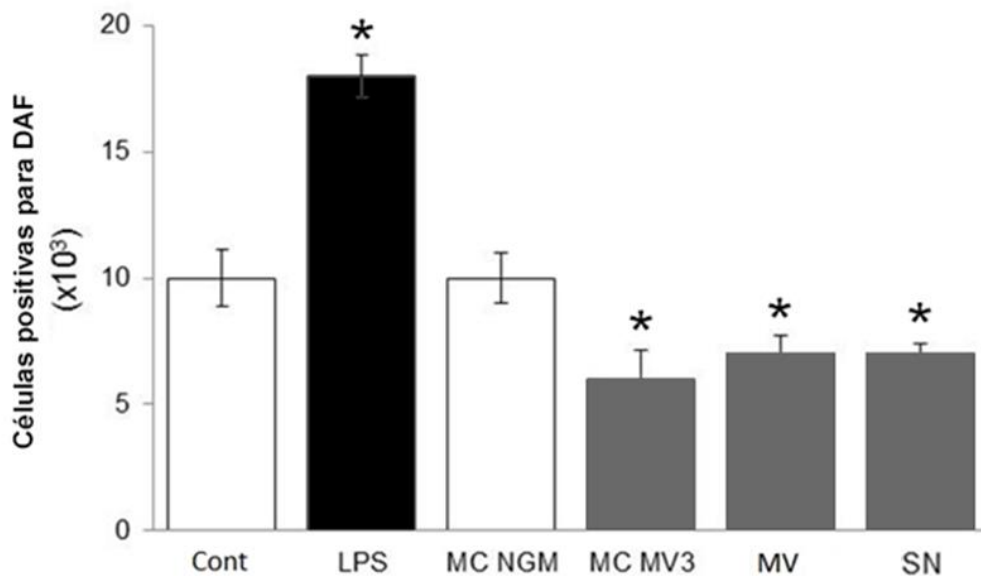
Nota: Amostras de PMN ($5,0 \times 10^6$ cels/mL) foram incubadas durante 3 horas com LPS 10 μ g/mL ou MC de melanócito NGM ou MC de melanoma MV3 ou MV, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram lisadas e os extratos totais foram submetidos à eletroforese em gel (SDS-PAGE) e *immunoblotting* para verificar a expressão proteica de arginase e actina (*load*). Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes.

Fonte: O autor, 2016.

3.10 As MV diminuem a produção basal de NO em PMN

A arginase é uma enzima que degrada a arginina, também substrato para a produção de óxido nítrico (NO) pela NO sintase (NOS) (WU; MORRIS, 1998). Os TAN N2 apresentam alta expressão de arginase, modulando assim, negativamente, a produção de NO, diminuindo sua atividade citotóxica anti-tumoral (FRIDLENDER et al., 2009). O incubação PMN com MV diminuiu a produção basal de NO, avaliada por sonda intracelular DAF-FM DA em citometria de fluxo. Por outro lado, PMN incubados com estímulo pró-inflamatório do LPS aumentaram sua produção de NO (Figura 18).

Figura 18 - As MV diminuem a produção basal de NO em PMN



Nota: Antes do ensaio, amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram incubadas com a sonda DAF ($10 \mu\text{M}$) por 30 minutos. Após a incubação, PMN foram lavados para a remoção da sonda não internalizada e incubados durante 3 horas com LPS $10 \mu\text{g/mL}$ ou MC de melanócito NGM ou MC de melanoma MV3 ou MV ou SN, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Após o tratamento, a oxidação da sonda DAF foi observada através de citometria de fluxo. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes (* $p < 0,05$, comparado ao grupo controle).

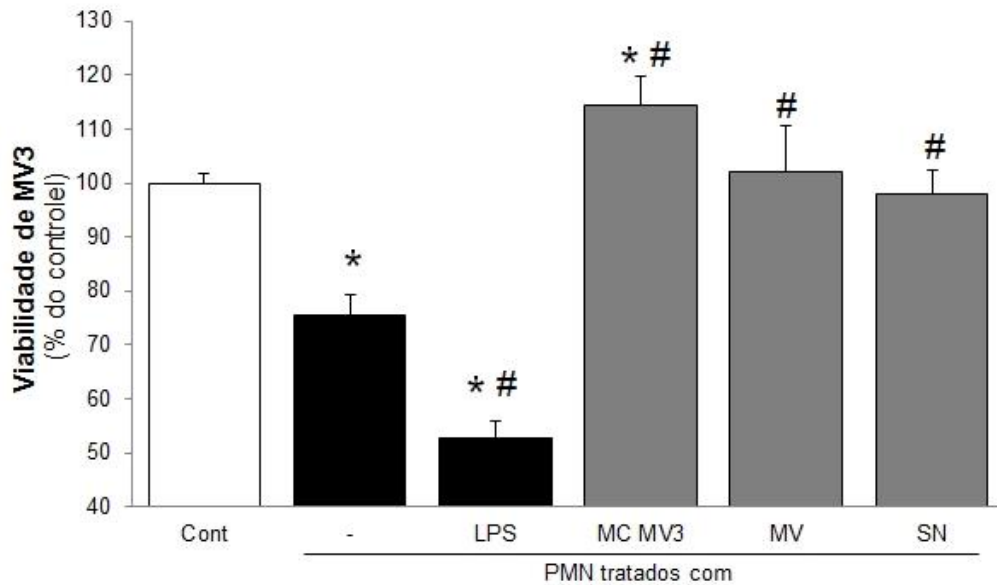
Fonte: O autor, 2016.

3.11 PMN incubados com MV não afetam a viabilidade das células MV3

De modo a simular *in vitro* a proteção que os TAN N2 poderiam exercer sobre as células tumorais, foram investigados diretamente os efeitos dos PMN sobre as células MV3. Os PMN foram polarizados, durante 3 horas, com as MV, com o meio condicionado rico em MV (MC), ou com o sobrenadante do meio condicionado, depletado de MV (SN). Em seguida esses PMN foram colocados em co-cultura com as células tumorais MV3.

Inicialmente, foi avaliado através do ensaio de MTT se os PMN incubados com MV seriam capazes afetar a viabilidade de células tumorais. Após 24 horas de co-cultura com os PMN foi observado que os PMN incubados com MV ou com o meio condicionado de MV3 (contendo ou não MV) aumentaram a viabilidade das células tumorais, quando comparados aos PMN sem incubação. Por outro lado, os PMN que adotaram um perfil N1-*like* (incubação com LPS) apresentaram grande citotoxicidade, diminuindo consideravelmente a viabilidade das células tumorais (Figura 19). Vale ressaltar que os PMN incubados com meio condicionado foram capazes de aumentar a proliferação de MV3 quando comparado ao grupo de MV3 que não teve co-cultura com PMN, evidenciando assim um papel pró-proliferativo do meio condicionado.

Figura 19 – PMN incubados com MV não afetam a viabilidade das células MV3



Nota: Amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram incubadas durante 3 horas com LPS 10 μ g/mL ou MC de melanoma MV3 ou MV ou SN, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação, PMN foram co-cultivados com células MV3 previamente plaqueadas. Após 20 horas de co-cultura, as células foram tratadas com MTT por 4 horas e após este período, a metabolização do composto em cada grupo foi monitorada pela absorbância no leitor de placas EnVision®, em comprimento de onda de 570 nm. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes (* p <0,05, comparado ao grupo controle (células MV3); # p <0,05, comparado ao grupo de células MV3 co-cultivadas com PMN que sem incubação).

Fonte: O autor, 2016.

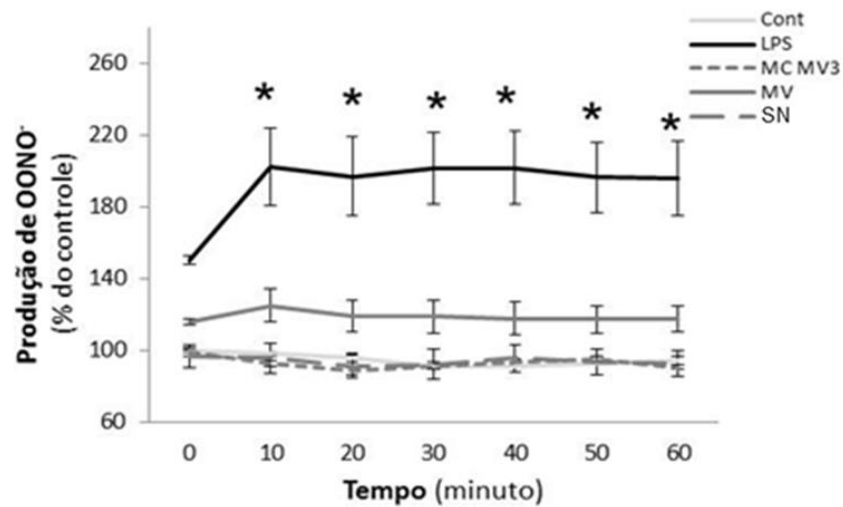
3.12 PMN incubados com MV não aumentam a produção de ONOO⁻ em contato com células MV3

De modo a verificar a atividade citotóxica dos PMN após contato com as células tumorais, foi avaliada sua produção de peróxido nítrico (ONOO⁻) através da sonda intracelular HPF. Neste ensaio os PMN foram polarizados, durante 3 horas, com as MV, com o meio condicionado rico em MV (MC), ou com o sobrenadante do MC, depletado de MV (SN), e carregados com a sonda HPF por 1 hora. Em seguida esses PMN foram colocados em co-cultura com as células tumorais MV3.

Foi observado que os PMN polarizados para um fenótipo citotóxico durante 3 horas de tratamento com LPS (10 μ g/mL), ao entrarem em contato com células tumorais da linhagem MV3 iniciam rapidamente a produção de ONOO⁻ em grandes quantidades, o que poderia justificar sua atividade citotóxica avaliada pelo ensaio de

MTT. Por outro lado, PMN incubados com MV não apresentaram diferença estatística significativa na produção de OONO^- ($p < 0,05$) em relação ao controle (Figura 20).

Figura 20 - PMN tratados com MV não aumentam a produção de OONO^- em contato com células MV3



Nota: Amostras de PMN (10^6 cels/mL) foram incubadas durante 3 horas com LPS $10 \mu\text{g/mL}$ ou MC de melanoma MV3 ou MV ou SN, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Durante a polarização, PMN foram carregados com a sonda HPF ($10 \mu\text{M}$) por 1 hora. Após a incubação, PMN foram lavados para a remoção da sonda não internalizada e colocados em contato com as células MV3. Durante a co-cultura, a produção de OONO^- pelos PMN foi monitorada no leitor de placas EnVision®, através da fluorescência emitida pela sonda, quando oxidada, em comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 nm e 515 nm, respectivamente. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes ($*p < 0,05$, comparado ao grupo controle).

Fonte: O autor, 2016.

4 DISCUSSÃO

Atualmente, as células tumorais não são mais vistas como “ilhas isoladas” dentro dos tecidos. Portanto, a compreensão dos mecanismos envolvidos no crescimento de tumor está ligada ao conhecimento do seu microambiente, formado por diversos componentes de matriz extracelular, fatores de crescimento, citocinas e inúmeros tipos celulares (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Existem evidências de que o microambiente tumoral libera MV, secretadas abundantemente pelas células tumorais, podendo modular a fisiologia das células-alvo (RAK, 2010). Entretanto, não existem na literatura estudos que mostrem a contribuição dessa interação na modulação dos PMN presentes no tumor ou na circulação sanguínea. Portanto, resolvemos estudar a hipótese da modulação do comportamento dos PMN em um fenótipo tipo N2 pelas MV de melanoma da linhagem MV3.

Para abordarmos essa questão, estabelecemos um modelo *in vitro* de purificação de MV, produzidas a partir das próprias células de melanoma, com o objetivo de estudar a interação dessas MV com os PMN. Por ser um modelo *in vitro* e os PMN não serem expostos a outros componentes normalmente presentes no microambiente tumoral, investigamos se as MV *per se* seriam capazes de polarizar os PMN para um fenótipo TAN tipo N2.

Vale ressaltar também que em boa parte dos protocolos de isolamento de MV presentes na literatura são utilizadas centrifugações fracionadas, consistindo na adoção, em um primeiro momento, de velocidades menores, da ordem de 10.000 x g - 20.000 x g para sedimentar partículas maiores (nas quais as MP de diversos tamanhos estão presentes), aumentando-as gradativamente, alcançando-se valores superiores a 200.000 x g, de forma a obter populações menores, como os Exo (HEIJNEN et al., 1999; VAN DER POL et al., 2010, 2012; BERCKMANS et al., 2011). Entretanto, ainda não há um protocolo padrão-ouro estabelecido que garanta 100% de purificação, uma vez que mesmo com a adoção desses passos ainda é observado certo grau de contaminação de vesículas maiores com Exo e/ou vice-versa (HEIJNEN et al., 1999; VAN DER POL et al., 2010; BERCKMANS et al., 2011). O protocolo de isolamento de MV utilizado neste estudo adota uma velocidade

(100.000 x g), capaz de sedimentar tanto populações de MV maiores, como MP (entre 0,1 e 1 μm), quanto populações de MV menores, como Exo (menores que 0,1 μm). Esperamos que os efeitos observados sejam em decorrências destas duas populações em conjunto, apesar de detectarmos, através da microscopia Zetaview[®], uma alta quantidade de vesículas no meio condicionado da célula tumoral utilizada (MV3), compreendendo tamanhos correspondentes a Exo e também a MP não visualizadas por citometria (<0,3 μm). Nossa leitura por citometria de fluxo foi realizada através da marcação para anexina V, que foi capaz de quantificar apenas MP, já que os Exo possuem dimensões menores que o limite do citômetro. Portanto, resolvemos adotar o termo MV em nosso trabalho, uma vez que vimos que nosso protocolo foi capaz de isolar partículas correspondentes aos tamanhos tanto de Exo quanto de MP.

Existem protocolos de purificação de Exo, que em geral seguem todas as etapas realizadas na purificação de MV presentes em nosso trabalho, com adição de uma filtração na última etapa (VAN DER POL, 2012). O racional para a filtração em filtros com poros de 0,2 μm é reter as MP com dimensões superiores a este tamanho. Contudo, este procedimento pode levar ao fracionamento das MP em tamanhos menores, o que invalidaria este protocolo.

Além de peptídios bacterianos, quimiocinas (como a IL-8), secretadas tanto pelo tumor quanto por células estromais, incluindo os próprios PMN, também têm poder de atração sobre os PMN, atuando em receptores como CXCR2 (WAUGH; WILSON, 2008; HOUGHTON, 2010). Sabendo que as MV liberadas a partir do tumor podem alcançar a circulação (CASTELLANA; TOTI; FREYSSUNET, 2010), nos perguntamos se as MV de nosso modelo possuíam propriedades quimiotáticas para PMN. Em nossos resultados, observamos que as MV (10% v/v) possuem efeitos quimiotáticos sobre os PMN, porém quando em maior percentual (50% v/v), não houve este efeito (Figura 12.A). Por outro lado, o MC da célula tumoral não possui componentes quimiotáticos, uma vez que quando desprovido de MV não induziu a migração dos PMN (Figura 12.B). Além disso, através do pré-tratamento com inibidores específicos, observamos que as MV ativam uma complexa rede de sinalização em PMN para que ocorra seu efeito quimiotático. Observamos que as MV ativam vias dependentes da sinalização por NADPH oxidase, receptores tirosina quinase, PI3K (enzima upstream da via de ativação de AKT, proteína com papel bem descrito na migração celular) e receptores GPCR, indicando a dependência da

ativação destas proteínas para o efeito sobre a quimiotaxia de PMN. Além disso, estudos destacam a importância do receptor CXCR2 (um tipo de GPCR) no recrutamento de PMN aos tumores em modelos murinos (GONG et al., 2013; JABLONSKA et al., 2014), sendo o melanoma uma fonte de citocinas capazes de ativar esta via, como a IL-8 (ILKOVITCH; LOPEZ, 2008). Nossos dados mostram que o efeito das MV sobre a quimiotaxia de PMN é altamente dependente da ativação desta via, uma vez que o inibidor seletivo de CXCR2 anulou este efeito. No entanto, maiores investigações precisariam ser feitas para se identificar a hierarquia desta complexa rede de sinalização induzida pelas MV em PMN.

Quando o organismo sofre algum tipo de injúria e o processo inflamatório é desencadeado, os PMN rapidamente migram para o sítio lesado. Para combater o agente causador exercem suas funções defensivas clássicas, como degranulação, produção de ROS e liberação de mediadores lipídicos. Estas atividades efetoras são potencializadas por citocinas, produtos bacterianos (no caso de infecções) e ácidos nucleicos livres, os quais aumentam o tempo de vida dos PMN ao inibir vias relacionadas à apoptose (WITKO-SARSAT et al., 2011). Em nosso trabalho, investigamos se as MV teriam o mesmo efeito sobre estas células e observamos que as MV foram capazes de aumentar a sobrevivência dos PMN, porém este efeito foi observado apenas quando os PMN foram desafiados com MV no percentual de 10% v/v, mostrando que além do recrutamento, as MV também são capazes de ativar os PMN, retardando o processo de apoptose espontânea.

A formação de NETs não está apenas relacionada a processos infecciosos, mas também a processos inflamatórios estéreis, como doenças autoimunes, aterosclerose, trombose e câncer (ZAWROTNIAK; RAPALA-KOZIK, 2013). Além disso, observa-se que estas estruturas são liberadas em maiores quantidades no câncer (DEMERS et al., 2012). Apesar de citotóxicas a microorganismos (BRINKMANN et al., 2004), no contexto da tumorigênese estas estruturas parecem ter efeito prejudicial ao organismo, e estudos sugerem que elas desempenham o papel de transporte de células tumorais para sítios distantes (COOLS-LARTIGUE et al., 2013), também tendo influência na trombose associada ao câncer (DEMERS et al., 2012). Observamos que além do estímulo com LPS, já descrito na literatura como indutor de formação de NETs (BRINKMANN et al., 2004), as MV também foram capazes de induzir a liberação destas estruturas pelos PMN, e que não houve contaminação com LPS, uma vez que o uso de polimixina, inibidor específico do

receptor do LPS, não diminuiu o efeito da MV sobre a indução de NET de PMN (dado não-mostrado). Corroborando dados da literatura, observamos por microscopia de fluorescência a presença de histona e elastase nessas *NETs* liberadas pelos PMN (PAPAYANNOPOULOS et al., 2010). Embora trabalhos mostrem a morte celular do PMN como consequência da liberação de *NETs* (BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2007), essa morte não é imediata e os PMN são capazes de manter certas funções efetoras como quimiotaxia e fagocitose imediatamente após a liberação (YIPP et al., 2012). Além disso, o DNA destas redes também pode ter origem mitocondrial, e neste caso, os PMN podem permanecer viáveis após a liberação destas estruturas, sem sofrerem alteração em seu tempo de vida (YOUSEFI et al., 2009). Outra questão a ser levada em conta é que evidências também mostram a importância da produção de *ROS*, culminando na liberação de *NETs* pelos PMN (BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2007).

Como discutido anteriormente, as MV protegeram os PMN contra a apoptose, apesar de terem induzido a liberação de *NETs*, sugerindo assim, com base em dados da literatura, que este processo desencadeado pelas MV ative vias de sinalização que não culminam na morte celular imediata do PMN. No entanto, ainda não está totalmente claro se, no contexto do câncer, estas estruturas desempenham um papel anti- ou pró-tumoral, ou se estas ações opostas dependem da presença ou ausência de estímulos no microambiente tumoral (ZAWROTNIAK; RAPALA-KOZIK, 2013). Por último, em nosso estudo mostramos que a MV é capaz de induzir a liberação de *NETs* que, de forma interessante, não possuem atividade elástica (Figura 14.C), o que pode sugerir que as MV modulem a formação de *NETs* que sejam menos agressivas às células tumorais. É possível que moléculas presentes na MV inibam a atividade catalítica da elastase, uma vez que foi descrito na literatura que, enquanto níveis baixos desta proteína promovem proliferação de células tumorais *in vitro*, maiores quantidades levam à morte destas células (HOUGHTON et al., 2010). A relação entre atividade de elastase nas *NETs* e a sua expressão como um todo no PMN, no entanto, ainda não está clara na literatura, portanto maiores estudos são necessários.

Em nossos ensaios, observamos que as MV induziram uma grande produção de espécies reativas pelos PMN em níveis equiparáveis ao do estímulo pró-inflamatório LPS. Para nossa surpresa, o meio condicionado contendo MV induziu baixa produção de *ROS* pelos PMN, indicando que outras moléculas presentes

neste meio poderiam estar contra-regulando o efeito das MV. Quando as MV foram retiradas do meio condicionado da célula tumoral, esta produção foi ainda menor. Em conjunto, esses dados nos sugeriram que o meio condicionado poderia conter antioxidantes. Para esclarecer este ponto, avaliamos a capacidade antioxidante das MV através de ensaios “*cell-free*” que mostraram que o meio condicionado apresenta atividade antioxidante, provavelmente através da ação das enzimas catalase ou glutathione peroxidase, uma vez que utilizamos peróxido de hidrogênio em nosso modelo “*cell free*”.

Uma vez que mostramos que as MV são capazes de ativar os PMN, recrutando-o, retardando sua apoptose e induzindo a liberação de *ROS* e *NET*, o próximo passo foi investigar se as MV polarizariam os PMN para um fenótipo tipo N2. A expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1, é crucial para que haja interação entre os PMN e o endotélio, permitindo a acumulação de PMN nos focos inflamatórios, e a ICAM-1 é considerada um marcador de PMN ativado (MISHALIAN et al., 2013). TAN com fenótipo anti-tumoral têm maior expressão desta molécula, definida como um marcador de N1 (FRIDLENDER et al., 2009; MISHALIAN et al., 2013). Em nosso trabalho, observamos que o tratamento com LPS aumentou a expressão gênica desta molécula. Apesar do tratamento com as MV ter diminuído essa expressão, o tratamento com o meio condicionado contendo estas MV teve efeito semelhante ao do LPS, sugerindo que o meio condicionado possui componentes que contrabalanceiam e superam o efeito supressor das MV.

Estudos recentes destacam outras importantes características que distinguem os estados de ativação dos TAN, como por exemplo, as enzimas envolvidas no metabolismo da L-arginina. TAN N1 têm maior expressão de iNOS, que cataboliza a L-arginina em óxido nítrico e citrulina, enquanto TAN N2 têm maior expressão de arginase-1, responsável pelo metabolismo da L-arginina em ornitina e ureia, diminuindo assim a produção de *NO* pela célula (FRIDLENDER et al., 2009; MISHALIAN et al., 2013). Por esta razão, resolvemos investigar a expressão destes marcadores pelos PMN. Em nosso trabalho, vimos que os PMN tratados com MV aumentaram a expressão gênica e proteica de arginase, enquanto que o tratamento com LPS aumentou a expressão gênica de iNOS. Estes dados corroboram o ensaio de produção de *NO* (Figura 18), no qual os PMN tratados com LPS apresentaram maior produção de *NO*, enquanto que os PMN tratados com MV apresentaram diminuição de sua produção basal.

No microambiente tumoral os TAN podem desenvolver propriedades pró-angiogênicas, apresentando elevada expressão de MMP-9 e VEGF (JABLONSKA et al., 2010) e apesar de possuírem alta expressão de CXCR4, a expressão de CXCR2 sofre *down-regulation*, diminuindo conforme o PMN se aproxima do foco tumoral (JABLONSKA et al., 2014). Corroborando esses estudos, vimos que os PMN tratados com MV apresentaram aumento na expressão gênica de VEGF. Por outro lado, não observamos mudanças no padrão de expressão de MMP-9 e CXCR2.

Vários tumores expressam altos níveis de TGF- β , e elevados níveis séricos desta citocina estão correlacionados a prognósticos desfavoráveis de vários tipos de câncer, incluindo o melanoma (KRSTIC; SANTIBANEZ, 2014). Sabe-se que o TGF- β é capaz de inibir a degranulação de PMN em resposta a peptídios formilados e LPS, além de prevenir a produção de ROS e espécies reativas de nitrogênio (SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014). No microambiente tumoral, esta citocina tem a capacidade de polarizar os PMN em TAN N2 (FRIDLENDER et al., 2009), e não apenas células cancerígenas, mas também células do sistema imune, como PMN e macrófagos, podem produzi-la (KRSTIC; SANTIBANEZ, 2014). Apesar de sua função primordial na modulação do fenótipo dos TAN já comprovada na literatura, em nosso estudo nenhum tratamento modificou seu padrão de expressão gênica nos PMN.

Dados recentes da literatura mostram que o receptor CXCR4 está mais expresso (a nível de mRNA) nos TAN N2 (JABLONSKA et al., 2010; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012). Corroborando e estendendo esses dados, observamos em nossos ensaios que as MV induziram aumento tanto na expressão gênica quanto na proteica de CXCR4. Além da expressão diferencial de moléculas de superfície e citocinas, os TAN podem ser diferenciados morfológicamente pela forma do núcleo. TAN N1 costumam se apresentar mais lobulados e hipersegmentados, enquanto que os TAN N2 podem assumir um formato circular (FRIDLENDER et al., 2009; PICCARD; MUSCHEL; OPDENAKKER, 2012; MISHALIAN et al., 2013). Em nosso trabalho, vimos que o tratamento com as MV foi capaz de induzir alterações no formato nuclear de parte dos PMN. Os mecanismos por trás deste rearranjo da cromatina, porém, ainda não foram documentados na literatura.

Por último, de modo a investigar a funcionalidade destes PMN polarizados, investigamos se os PMN estimulados com estas MV teriam ou não ação citotóxica

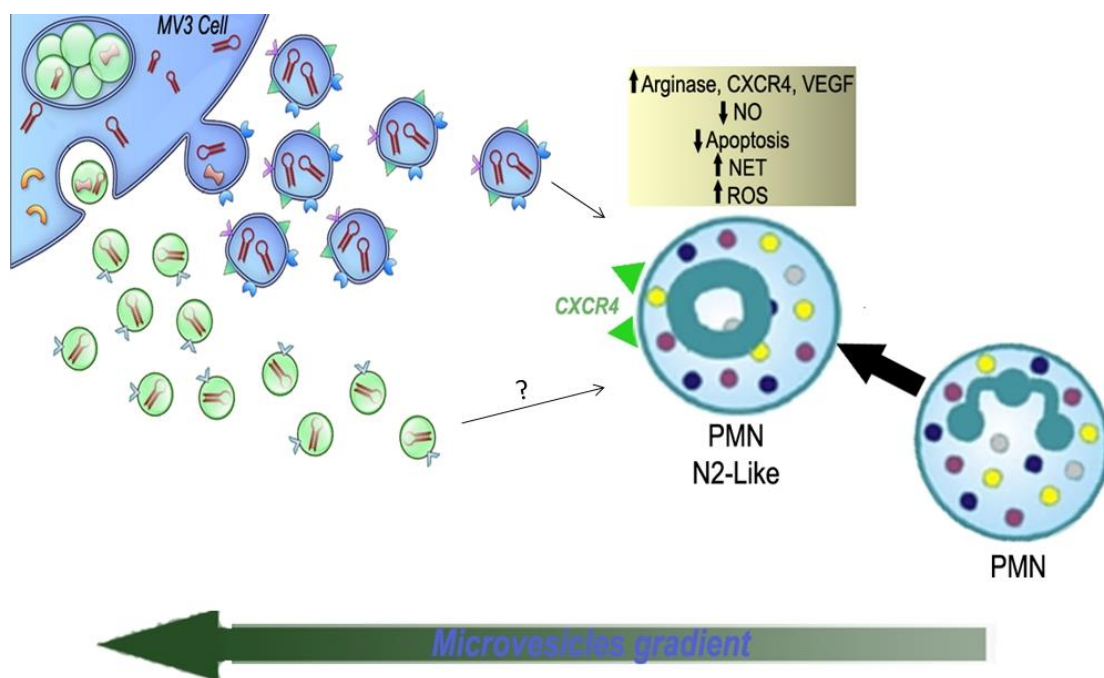
sobre células tumorais em co-cultura. Investigamos, então, os efeitos dos PMN desafiados com diferentes estímulos sobre a viabilidade das células MV3. Observamos que os PMN incubados previamente com MV levam a um aumento na taxa de sobrevivência das células tumorais presentes na co-cultura (Figura 19). Além disso, as células MV3 que foram co-cultivadas com esses PMN, reprogramados pelo tratamento com o meio condicionado, tiveram sua viabilidade aumentada em comparação ao grupo que não foi posto em contato com PMN. PMN que foram pré-tratados com LPS produziram elevadas quantidades de peróxido nítrico, confirmando assim dados da literatura (GAGNON; LEBLONG; FILEP, 1998), apresentando alta toxicidade contra células MV3, diminuindo sua viabilidade. Embora tenha havido aumento significativo da produção de peróxido nítrico pelos PMN tratados com MV, essas proporções foram muito inferiores em comparação ao estímulo pró-inflamatório do LPS, o que pode explicar a perda de citotoxicidade do PMN estimulado com a MV sobre a célula tumoral em co-cultura. Entretanto, a alta produção de ROS por PMN também pode contribuir ao aparecimento de mutações em células normais, o que poderia deflagrar o processo de carcinogênese (GÜNGNOR et al., 2009).

Nosso estudo demonstra que as MV produzidas a partir das células de melanoma da linhagem MV3 ativam os PMN, induzindo sua migração, protegendo-os da apoptose e induzindo a liberação de NETs e ROS. Vimos também que os PMN tratados com MV não afetaram a viabilidade de células MV3, possivelmente pela sua capacidade em polarizar os PMN para um fenótipo TAN tipo N2. Dentre as características que contribuem à progressão tumoral observamos aumento do marcador CXCR4, aumento da expressão de arginase, CXCR4 e VEGF, e diminuição da produção basal de NO. Além disso, mostramos que o tratamento com LPS *in vitro* foi capaz de polarizar os PMN para um fenótipo tipo N1. Entretanto, o presente estudo foi realizado em um modelo *in vitro* e os efeitos das MV de melanoma na polarização de PMN *in vivo* ainda precisam ser elucidados.

CONCLUSÕES

Os resultados presentes neste estudo demonstram que as MV de melanoma humano da linhagem MV3 são capazes de ativar PMN humanos, modulando diferentes efeitos e induzindo sua polarização para um fenótipo tipo N2 (Figura 21).

Figura 21 - Esquema representativo da conclusão do trabalho



Nota: As MV de melanoma MV3 formam um gradiente quimioatraente, recrutando e ativando PMN, protegendo-o da apoptose, induzindo-o a produzir ROS e a liberar NET. Apesar de ativado, este PMN não é citotóxico, visto que produz menos NO e perde a citotoxicidade sobre células tumorais em co-cultura. Além disso, as MV reprogramam molecularmente o PMN para um fenótipo tipo N2, sendo capazes de aumentar sua expressão de arginase, CXCR4 e VEGF.

Fonte: O autor, 2016.

REFERÊNCIAS

ADLER, V. et al. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene**, v. 18, n. 45, p. 6104-6111, Nov 1999.

ANDZINSKI, L. et al. Delayed apoptosis of tumor associated neutrophils in the absence of endogenous IFN- β . **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 3, p. 572-583, May 2014.

BANDARCHI, B. et al. From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. **Dermatology Research and Practice**, v. 2010, Article ID 583748, 8 pages, Aug 2010.

BERCKMANS, R.J. et al. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. **Blood** v. 117, n. 11, p. 3172-3180, Mar 2011.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity** v. 33, n.5, p. 657-670, Nov 2010.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, Mar 2004.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. **Nature Reviews – Microbiology** v. 5, n. 8, p. 577-582, Aug 2007.

BURGER, D. et al. Microparticles: biomarkers and beyond. **Clinical Science (London, England: 1979)** v. 124, n. 7, p. 423-441, Apr 2013.

CAMUS, S.M. et al. Erythrocyte microparticles can induce kidney vaso-occlusions in a murine model of sickle cell disease. **Blood**, v. 120, n.25, p. 5050-5058, Dec 2012.

CARUSO, R.A. et al. Prognostic Value of Intratumoral Neutrophils in Advanced Gastric Carcinoma in a High-Risk Area in Northern Italy. **Modern Pathology**, v. 15, n. 8, p. 831-837, Aug 2012.

CASTELLANA, D.; TOTI, F.; FREYSSINET, J.M. Membrane microvesicles: Macromessengers in cancer disease and progression. **Trombosis Research**, v. 125, p. 84-88, Apr 2010.

CHANDRASOMA, P.; TAYLOR, C.R. **Concise Pathology**, 3rd Edition, Appleton & Lange, 1998.

CHARGAFF, E.; WEST, R. The Biological Significance of the Thromboplastic Protein of Blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 166, n.1, p. 189-197, Nov 1946.

CHEN, G.Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews – Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826-837, Dec 2010.

CIVETTA, M.T.M.; CIVETTA, J.D. Carcinogénesis, **Salud Publica de Mexico**, v. 53, n. 5, p. 405-414, Sep-Oct 2011.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELSOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 43-51, Feb 2009.

COOLS-LARTIGUE, J. et al. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 21, p. 4179-4194, Nov 2014.

COOLS-LARTIGUE, J. et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, p. 3446-3458, Jul 2013.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, Dec 2002.

DEMERS, M. et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 32, p. 13076–13081, Aug 2012.

EL-BACHA, T.; DE FREITAS, M.S.; SOLA-PENNA, M. Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 79, n.4, p. 294-299, Aug 2003.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; Downey, G. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, n. 12, p. 153-164, Jan 2007.

FRIDLENDER, Z.G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 183-194, Sep 2009.

FRIDLENDER, Z.G.; ALBELDA, S.M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? **Carcinogenesis**, v. 33, n.5, p. 949-955, May 2012.

GAGNON, C.; LEBLONG, F.A.; FILEP, J.G. Peroxynitrite production by human neutrophils, monocytes and lymphocytes challenged with lipopolysaccharide. **FEBS Letters**, v. 431, n.1, p. 107-110, Jul 1998.

GILCHREST, B.A. et al. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 17, p. 1341-1348, Apr 1999.

GONG, L. et al. Promoting effect of neutrophils on lung tumorigenesis is mediated by CXCR2 and neutrophil elastase. **Molecular Cancer**, v. 12, n.1, p. 154-167, Dec 2013.

GREGORY, A.D.; HOUGHTON, A.M. Tumor-Associated Neutrophils: New Targets for Cancer Therapy. **Cancer Research**, v. 71, n. 7, p. 2410-2416, Apr 2011.

GÜNGNOR, N. et al. Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. **Mutagenesis**, v. 25, n.12, p. 149-154, Nov 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011.

HEIJNEN, H.F.G. et al. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules. **Blood**, v. 94, n. 11, p. 3791-3799, Dec 1999.

HOUGHTON, A.M. et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. **Nature Medicine**, v. 16, n.2, p. 219-223, Feb 2010.

HOUGHTON, A.M. The paradox of tumor-associated neutrophils: Fueling tumor growth with cytotoxic substances. **Cell Cycle**, v. 9, n. 9, p. 1732-1737, May 2010.

HUGEL, B. et al. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. **Physiology**, v. 20, n. 1, p. 21-27, Feb 2005.

HSU, M.Y.; MEIER, F.; HERLYN, M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. **Differentiation**, v. 70, n. 9-10, p. 522-536, Dec 2002.

ILKOVITCH, D.; LOPEZ, D.A. Immune modulation by melanoma-derived factors. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 977-985, Dec 2008.

JABLONSKA, J. et al. CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN- β . **International Journal of Cancer**, v. 134, n.6, p. 1346-1358, Mar 2014.

JABLONSKA, J. et al. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 4, p. 1151-1164, Apr 2010.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 57, n.1, p. 43-66, Jan-Feb 2007.

JENSEN, H.K. et al. Presence of Intratumoral Neutrophils Is an Independent Prognostic Factor in Localized Renal Carcinoma. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 28, p. 4709-4717, Oct 2009.

KARIN, M.; GRETEN, F.R. NF- κ B: Linking Inflammation and Immunity to Cancer Development and Progression. **Nature Reviews – Immunology**, v. 5, n.10, p. 749-759, Oct 2005.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews – Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, Mar 2013.

KOWAL, J.; Tkach, M.; Théry, C. Biogenesis and secretion of exosomes. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 29, p. 116-125, Aug 2014.

KRSTIC, J.; SANTIBANEZ, J.F. Transforming Growth Factor-Beta and Matrix Metalloproteinases: Functional Interactions in Tumor Stroma-Infiltrating Myeloid Cells. **The Scientific World Journal**, Article ID 521754, 14 pages, Jan 2014.

KUBICA, A.W.; BREWER, J.D. Melanoma in Immunosuppressed Patients. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 87, n. 10, p. 991-1003, Oct 2012.

KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A. **Robbins and Cotran – Pathologic Basis of Disease**, 8th Edition. Saunders Company, 2010.

LI, Y.W. et al. Intratumoral neutrophils: A poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma following resection. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 3, p. 497-505, Mar 2011.

LIN, J.Y.; FISHER, D.E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843-850, Feb 2007.

MAHABELESHWAR, G.H.; BYZOVA, T.V. Angiogenesis in melanoma. **Seminars in Oncology**, v. 34, n. 6, p. 555-565, Dec 2007.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-444, Jul 2008.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews – Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519-531, Jul 2011.

MISHALIAN, I. et al. Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17 – A new mechanism of impaired antitumor immunity. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 5, p. 1178-1186, Sep 2014.

MISHALIAN, I. et al. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. **Cancer Immunology, Immunotherapy: CII**, v. 62, n. 11, p. 1745-1756, Nov 2013.

MULLIKEN, J.S.; RUSSAK, J.E.; RIGEL, D.S. The effect of sunscreen on melanoma risk. **Dermatologic Clinics**, v. 30, n. 3, p. 369-376, Jul 2012.

NEL, J.G. et al. Pneumolysin activates neutrophil extracellular trap formation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 184, n. 3, p. 358-67, Jun 2016.

PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **The Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 3, p. 677-91, Nov 2010.

PICCARD, H.; MUSCHEL, R.J.; OPDENAKKER, G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 82, n. 3, p. 296-309, Jun 2012.

PICCIN, A.; MURPHY, W.G.; SMITH, O.P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. **Blood Reviews**, v. 21, n. 3, p. 157-171, Nov 2006.

RAK, J. Microparticles in Cancer. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 36, n. 8, p. 888-906, Nov 2010.

RATNIKOV, B.I. et al. Metabolic rewiring in melanoma. **Oncogene**, v. 36, n.12, p. 147-157, Jun 2016.

SALDANHA-GAMA, R.F. et al. Alpha(9)beta(1) integrin engagement inhibits neutrophil spontaneous apoptosis: involvement of Bcl-2 family members. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, n. 7, p. 848-857, Jul 2010.

SARRAY, S. et al. Lebectin increases n-cadherin-mediated adhesion through PI3K/AKT pathway. **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p. 174-181, Nov 2009.

SHIFRIN, D.A. et al. Extracellular vesicles: communication, coercion and conditioning. **Molecular biology of the cell**, v. 24, n. 9, p. 1253-1259, May 2013.

SIONOV, R.V.; FRIDLENDER, Z.G.; GRANOT, Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. **Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society**, v. 8, n. 3, p. 125-158, Jun 2014.

SUMMERS, C. et al. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 8, p. 318-324, Aug 2010.

SWANN, J.B.; SMYTH, M.J. Immune surveillance of tumors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1137-1146, May 2007.

VAN DER POL, E. et al. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p. 676-705, Jul 2012.

VAN DER POL, E. et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH**, v. 8, n. 12, p. 2596-607, Dec 2010.

VAN MUIJEN, G.N. et al. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *International Journal of Cancer*, v. 48, n.1, p. 85-91, Apr 1991.

VENDRAMINI-COSTA, V.B.; CARVALHO, J.E. Molecular Mechanisms between Inflammation and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 26, p. 3831-3852, 2012.

WAUGH, D.J.J.; WILSON, C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 6735-6741, Nov 2008.

WITKO-SARSAT, V. et al. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 3, p. 117-124, Mar 2011.

WOLF, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology* 13, n. 3, p 269-88, May 1967.

WU, G; MORRIS, S.M. Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **The Biochemical Journal**, v. 336, n. 1, p. 1-17, Nov 1998.

YIPP, B.G. et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. **Nature Medicine**, v. 18, n. 9, p. 1386-1393, Sep 2012.

YOUSEFI, S. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 11, p. 1438-1444, Nov 2009.

ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. Neutrophil extracellular traps (NETs) – formations and implications. **ACTA Biochimica Polonica**, v. 60, n. 3, p. 277-284, Jul 2013.

ZHAO, J.J. et al. The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Neutrophils in Gastric Adenocarcinoma after Resection. **PLoS One**, v. 7, n. 3, Mar 2012.