



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

Hayandra Cunha da Costa

Análise dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos antitumorais da lipoxina em macrófagos associados ao tumor

Rio de Janeiro

2021

Hayandra Cunha da Costa

**Análise dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos antitumorais da lipoxina
em macrófagos associados ao tumor**

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Loureiro Simões

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C837 Costa, Hayandra Cunha.
Análise dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos antitumorais da lipoxina em macrófagos associados ao tumor / Hayandra Cunha Costa. - 2021.
97 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Loureiro Simões

Doutorado (Tese) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Lipoxinas – Teses. 2. Macrófagos – Teses. 3. Tumores - Teses. 4. Microambiente Tumoral. I. Fidalgo, Thereza Christina Barja. II. Simões, Rafael Loureiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-006.8

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Hayandra Cunha da Costa

Análise dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos antitumorais da lipoxina em macrófagos associados ao tumor

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

Aprovada em 24 de setembro de 2021.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Loureiro Simões

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Edward Helal Neto
Instituto de Engenharia Nuclear

Prof^a Dra. Tatiana Simão
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a Dra. Marcia Cristina Paes
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Giselma e Hernandes por toda dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo, pela oportunidade e confiança de desenvolver este trabalho, e nesta fase final estar sempre disposta a elucidar minhas dúvidas e dar novas sugestões a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Rafael Simões, por orientar o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela motivação constante, por todos os ensinamentos e por ser um exemplo profissional a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Edward Helal Neto, por revisar esta tese, além de contribuir em muito para o meu desenvolvimento como aluna ao longo de toda a pós-graduação.

À Dra. Natália Mesquita que me auxiliou em todas as fases do desenvolvimento desse trabalho.

À MsC Julia Moretti por todo apoio experimental em todas as separações de monócitos, western blotting e pela amizade além da bancada.

À Prof^a Dra. Mariele Souza por nunca me deixar diminuir e sempre cuidar de mim.

A todos os amigos do laboratório por toda a ajuda e por fazerem a bancada um excelente lugar para se trabalhar.

À equipe técnica do LFCM, indispensável e fundamental para a realização desse projeto.

A todos os professores que contribuíram para o meu desenvolvimento nesta jornada da pós-graduação.

A todos os meus amigos, que durante esses 4 anos, tiveram muita paciência e me acolheram em todos os momentos.

Às amigas Gabi e Karine, por toda amizade, apoio, desde a graduação.

À amiga Gabi Werneck e sua família pela compreensão em todos os períodos da minha vida.

Aos meus amados pais, Giselma e Hernandes, por principalmente nutrirem todos os meus sonhos. Por se dedicarem incansavelmente a mim, por todo amor. Nada teria acontecido sem vocês. Amo absurdamente vocês!

Ao apoio financeiro CAPES, CNPq e FAPERJ.

Seja como for, a grandiosa Revolução Humana de uma única pessoa irá um dia impulsionar a mudança total do destino de um país e, além disso, será capaz de transformar o destino de toda a humanidade.

Daisaku Ikeda

RESUMO

COSTA, Hayandra Cunha da . *Análise dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos antitumorais da lipoxina em macrófagos associados ao tumor*. 2021. 97 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Macrófagos são células inflamatórias que podem adquirir perfis pró-inflamatórios (M1) ou anti-inflamatórios (M2). Em microambientes tumorais, a população de macrófagos pode adquirir características promotoras de tumor, sendo assim denominados macrófago associado a tumores (TAM) que exibem um perfil semelhante aos M2. Nosso grupo demonstrou que a lipoxina (LX), um importante mediador lipídico com características anti-inflamatórias, possui efeitos antitumorais ao inibir o perfil M2 em TAMs. Essas ações são seletivas e específicas para a modulação do perfil M2 de TAMs uma vez que a lipoxina não altera o perfil de macrófagos com outros fenótipos M2. Esta regulação seletiva sugere que a LX modula esses efeitos por diferentes vias de sinalização que ainda não foram estudadas. Assim, o objetivo deste estudo é investigar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na polarização diferencial de macrófagos, bem como os efeitos da LX na modulação destes mecanismos. Para obtenção de TAMs, os macrófagos derivados de monócitos humanos foram incubados por 72 horas com meio condicionado de MV3, uma linhagem de melanoma humano. Através de *western blotting* investigamos as principais vias de sinalização nos diferentes perfis de macrófagos. Primeiramente, vimos que LX diminui a ativação de ERK em TAMs e macrófagos M2 e não tem efeito nos macrófagos com perfil M1. Além disso, a LX aumenta a fosforilação de AKT em TAMs. Vimos também que a LX mantém a fosforilação de STAT3, um importante fator de transcrição ativado nos TAMs. Analisamos, ainda, a participação do VEGF, um clássico fator pró-angiogênico, sobre a polarização de TAMs induzida pela lipoxina. Vimos que os TAMs secretam altos níveis de VEGF, mas o tratamento com a LX não interfere nesta liberação. Vimos que o efeito da lipoxina na indução de um perfil M1-like em TAMs é dependente das ações do VEGF. Além disso, a LX diminui a fosforilação de VEGFR-1 e aumenta a expressão de SHP-1, uma das principais fosfatases encontradas em tumores, sugerindo que o efeito da lipoxina na modulação de VEGF em TAMs pode ser por regulação negativa de VEGFR pela SHP-1. Nossos resultados sugerem que a lipoxina modifica seletivamente a polarização de TAMs modulando importantes vias de sinalização ativadas por macrófagos no microambiente tumoral.

Palavras-chave: Microambiente tumoral. Macrófagos. Lipoxina. Sinalização.

ABSTRACT

COSTA, Hayandra Cunha da. *Analysis of the molecular mechanisms involved in the antitumor effects of lipoxin on tumor-associated macrophages*. 2021. 97 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Macrophage population is heterogeneous, being able to acquire pro-inflammatory (M1) or anti-inflammatory (M2) profiles. In tumor microenvironments, macrophages can acquire tumor-promoting characteristics. These tumor-associated macrophages (TAM) exhibit an M2-like profile. Our group demonstrated that lipoxin (LX), an important lipid mediator, has antitumor effects by inhibiting the M2 profile in TAM. These actions are selective and specific in the modulation of the M2 profile of TAMs, since lipoxin does not alter other M2 phenotypes, suggesting that LX modulates these effects by different signaling pathways not yet studied. Thus, the objective of this study was to investigate the cellular and molecular mechanisms involved in the differential polarization of Mphi, as well as the effects of LX in the modulation of these mechanisms. To obtain TAMs, Mphi derived from human monocytes were incubated for 72 hours with conditioned medium of MV3, a human melanoma cell lineage. By western blotting assay we investigated the signaling pathways involved in Mphi polarization. Firstly, we have seen that LX decreases activation ERK pathway activation in TAMs and M2 and have no effect in M1 mphi. Besides that, LX enhances AKT phosphorylation in TAMs. We next analyze the involvement of VEGF, a classic pro-angiogenic factor, on the polarization of TAMs triggered by LX. We observed that LX does not interfere in the release of VEGF in TAMs. Interestingly, our results shown that lipoxin effect on the induction of an M1-like profile in TAMs is dependent on the actions of VEGF. We also observed that LX decreases VEGFR-1 phosphorylation and increases SHP-1 expression in TAMs, one of the major phosphatases found in tumors, suggesting that the effect of LX on modulation of VEGF effects in TAMs may be through down-regulation of VEGFR phosphorylation by SHP-1. Our results suggest that lipoxin, selectively, modifies the polarization of TAMs by modulating important macrophage-activated signaling pathways in the tumor microenvironment.

Keywords: Tumor. Macrophages. Lipoxin. Signaling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Número de novos casos de câncer em 2020.....	13
Tabela 1 - Estimativa do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária	19
Figura 2 - Os principais eventos da progressão tumoral	16
Figura 3 - Visão geral da progressão do melanoma.....	18
Figura 4 - Relação entre a inflamação e a carcinogênese	22
Figura 5 - Os principais componentes do microambiente tumoral e sua contribuição para a progressão tumoral	24
Figura 6 - Os dois principais perfis de macrófagos	27
Figura 7 - Funções pró-tumorais dos TAMs	30
Figura 8 - Membros da família do VEGF e seus receptores	39
Figura 9 - Biossíntese das Lipoxinas e “aspirin-triggered-lipoxins” (ATL)	42
Figura 10 - Lipoxinas e seus efeitos.....	44
Figura 11 - Obtenção do Meio Condicionado.....	54
Figura 12 - Envolvimento da ERK no efeito da lipoxina em macrófagos.....	58
Figura 13 - Envolvimento da AKT no efeito da lipoxina em macrófagos	60
Figura 14 - Envolvimento da STAT3 no efeito da lipoxina.....	62
Figura 15 - Envolvimento do VEGF sobre o efeito da lipoxina sobre os TAMs	64
Figura 16 - O efeito da lipoxina nos TAMs é dependente das ações do VEGF durante a polarização de TAMs.....	65
Figura 17 - Participação da STAT3 na indução da polarização TAMs pelo VEGF	67
Figura 18 - Participação da lipoxina sobre a expressão VEGFR-1 nos macrófagos .	69
Figura 19 - Participação da lipoxina sobre a expressão de SHP-1 em macrófagos..	70
Figura 20 - O efeito de diferentes vias de sinalização envolvidas na polarização dos TAMs.....	78
Figura 21 - Padronização do meio condicionado	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido araquidônico
AKT	proteína quinase B
ATL	<i>aspirin triggered lipoxins</i> (lipoxina-induzidas por aspirina)
BMDC	<i>bone marrow-derived myeloid cells</i> <i>braf: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (albumina do soro bovino)
CCL	<i>chemokine ligand</i> (quimiocina CC)
CFS	<i>macrophage colony-stimulating factor</i> (fator estimulador de colônia de macrófagos)
COX	Ciclooxigenase
CXCL	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i> (quimiocina C-X-C)
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etileno diamina tetra-acético)
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epidérmico ou epidermal)
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> (quinase regulada por sinal extracelular)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> (fator de crescimento de fibroblasto)
FPR	<i>formylpeptide receptor</i> (receptor para peptídeo formilados)
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (fator estimulador de colônia de granulócito e macrófagos)
GPCR	receptor acoplado à proteína G
HIF	<i>hypoxia-inducible factors</i> (fator de transcrição induzido por hipóxia)
IFN	interferon
IL	inteleucina
INOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> (óxido nítrico sintase induzida)
JAK	janus quinase
JNK	c-Jun N-terminal quiinase
LOX	lipoxigenase
LPS	lipopolissacarídeo bacteriano
LTA	leucotrieno A
LX	lipoxina

MAM	macrófagos associados à metástase
MAPK	<i>mitogen activated protein kinases</i> (proteína quinase ativada por mitógeno)
MaRs	maresina
MC-MV3	meio condicionado da MV3
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i> (proteína quimiotática de monócitos-1)
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i> (fator estimulador de colônia de macrófagos)
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i> (células mielóides supressoras)
MEC	matriz extracelular
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i> (proteína inflamatória de macrófago)
MØ	macrófago
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i> (metaloproteinase de matriz)
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i> (alvo mecanístico da rapamicina)
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i> (célula-tronco mesenquimal)
MV3	linhagem celular de melanoma humano
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i> (fator nuclear-kappa B)
NGM	linhagem celular de melanócitos humanos
NO	<i>nitrite oxide</i> (óxido nítrico)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (salina tamponada com fosfato)
PDGF	<i>human platelet-derived growth factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i> (fator de crescimento placentário)
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i> (fosfatidil inositol-3 quinase)
PKC	proteína quinase C
PKN2	<i>protein kinase N2</i>
PMN	<i>polymorphonuclear leukocytes</i> (leucócitos polimorfonucleares)
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PTEN	<i>phosphatase And Tensin Homolog</i> (fosfatase homóloga à tensina)
PTP	<i>protein tyrosine phosphatase</i> (proteína tirosina fosfatase)
PTK	proteína tirosina quinase

RvS	Resolvina
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> (espécies reativas de nitrogênio)
SDF	<i>stromal cell-derived factor</i> (fator derivado do estroma da medula óssea)
SN	sobrenadante
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i> (fator de tradução de sinal e ativador de transcrição)
TAM	<i>tumor-associated macrophages</i> (macrófagos associados ao tumor)
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> (fator de crescimento transformante beta)
Th	<i>T-helper</i>
Tyr	<i>tyrosin kinase receptor</i> (receptor tirosina quinase)
TLR	<i>toll-like receptors</i> (receptores do tipo Toll)
TNBC	<i>triple-negative breast cancer</i> (câncer de mama triplo negativo)
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
TSC	complexo de esclerose tuberosa
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento do endotélio vascular)
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i> (receptor do fator de crescimento do endotélio vascular)

SUMÁRIO

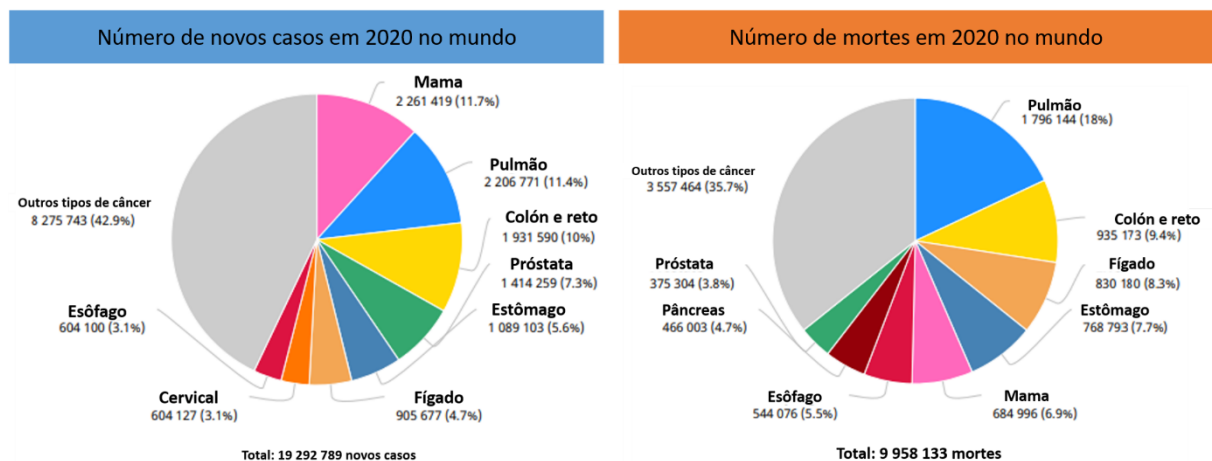
INTRODUÇÃO	13
1 OBJETIVOS	45
1.1 Objetivo geral	45
1.2 Objetivos específicos	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1 Materiais e protocolos	46
2.2 Metodologia	51
2.2.1 <u>Linhas celulares</u>	51
2.2.2 <u>Cultura de Células</u>	51
2.2.3 <u>Obtenção do meio condicionado da MV3</u>	52
2.2.4 <u>Obtenção de Macrófagos Humanos</u>	52
2.2.5 <u>Obtenção de TAMs</u>	53
2.2.6 <u>Tratamento com a Lipoxina</u>	53
2.2.7 <u>Citometria de Fluxo</u>	54
2.2.8 <u>Western Blotting</u>	55
2.2.9 <u>Multiplex</u>	55
2.2.10 <u>Análise estatística</u>	56
3. RESULTADOS	57
3.1 Envolvimento da via da MAPK-ERK 1/2 no efeito da lipoxina	57
3.2 Envolvimento da AKT no efeito da lipoxina em macrófagos	59
3.3 Envolvimento da STAT3 no efeito da lipoxina	61
3.4 Envolvimento do VEGF sobre o efeito da lipoxina sobre os TAMs	63
3.5 Participação da STAT3 na modulação da polarização à TAM pelo VEGF	66
3.6 Participação da lipoxina sobre a expressão VEGFR-1 nos macrófagos	68
3.7 Participação da lipoxina sobre a expressão de SHP1 em macrófagos	68
4 DISCUSSÃO	71
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE - Figuras da metodologia	103

INTRODUÇÃO

Dados populacionais/Prevalência do câncer e melanoma

Câncer é um termo utilizado para designar mais de 100 tipos diferentes de doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células malignas. A partir da divisão desordenada, estas células podem migrar para os outros tecidos e espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2020). A mais recente estimativa feita pela Organização Mundial da Saúde (OMS), aponta aproximadamente 19,3 milhões de novos casos de câncer em 2020, sendo o câncer de mama o mais incidente na população, seguido pelo câncer de pulmão, cólon e reto, próstata, estômago, fígado, cervical e esôfago. O câncer é a principal causa de morte das pessoas antes dos 70 anos de idade, ocupando a primeira ou segunda causa em 112 países de 183 países investigados. Ainda segundo a OMS, o câncer de pulmão é o que mais mata no mundo, com aproximadamente 1,8 milhões de mortes, seguido pelo câncer de cólon e reto, fígado, estômago, mama, esôfago e pâncreas (OMS, 2020; Sung e col., 2021) (figura 1).

Figura 1 - Número de novos casos de câncer em 2020



Legenda: Números de novos casos de câncer e de mortes em 2020 em todo o mundo.
Fonte: Adaptado de Sung e col., 2021.

No Brasil, a mais recente estimativa aponta que surgirão 625 mil novos casos de câncer no país para cada ano do triênio 2020-2022, sendo o câncer de pele não melanoma o mais incidente na população (INCA, 2020) (tabela 1). Segundo o INCA (2020), um terço dos casos de câncer pode ser evitado, aumentando a importância do controle da doença a partir de políticas públicas e da melhora dos hábitos de vida decorrentes do desenvolvimento da sociedade. Em todo o mundo, o câncer é um dos principais problemas de saúde pública e sua incidência e a mortalidade vêm aumentando por diversas causas, como envelhecimento, crescimento populacional e o desenvolvimento socioeconômico (INCA, 2020).

Tabela 1 - Estimativa do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	2.770	29,39	47,78	800	28,07	64,30	-	-	-	-	-	-
Mama feminina	-	-	-	-	-	-	1.970	21,34	31,39	990	32,91	38,81
Colo do útero	-	-	-	-	-	-	1.940	21,20	26,24	950	31,82	35,70
Traqueia, brônquio e pulmão	870	9,24	15,98	270	10,00	20,55	590	6,47	9,53	210	7,23	10,72
Cólon e reto	490	5,27	7,69	230	7,99	11,57	590	6,48	8,71	220	7,66	11,34
Estômago	1.110	11,75	18,22	420	14,87	21,73	550	6,03	8,46	270	9,01	8,47
Cavidade oral	340	3,80	6,44	150	5,32	9,19	170	1,69	2,22	170	4,28	2,60
Laringe	240	2,68	4,42	130	3,87	4,97	90	0,54	0,71	70	0,89	0,97
Bexiga	180	1,81	2,90	100	2,81	5,24	90	0,69	1,09	70	1,10	1,35
Esôfago	250	2,69	3,55	130	3,95	5,09	90	0,73	0,92	70	0,78	0,93
Ovário	-	-	-	-	-	-	310	3,28	3,72	160	5,20	5,44
Linfoma de Hodgkin	120	1,05	1,33	80	1,84	1,86	70	0,28	0,29	60	0,50	0,47
Linfoma não Hodgkin	210	2,23	2,93	100	3,28	4,29	170	1,95	3,04	130	3,73	5,42
Glândula tireoide	80	0,50	0,72	70	0,76	1,26	260	2,84	3,62	120	3,28	3,22
Sistema nervoso central	300	3,20	4,87	140	4,53	6,45	280	3,03	3,95	160	4,50	4,99
Leucemias	410	4,45	5,55	160	5,63	6,47	320	3,55	3,95	150	4,81	4,85
Corpo do útero	-	-	-	-	-	-	230	2,41	3,85	130	3,90	5,08
Pele melanoma	100	0,83	1,56	70	1,34	2,07	90	0,78	0,80	70	1,02	1,00
Outras localizações	2.190	23,23	39,04	970	34,29	52,19	1.590	17,29	23,63	600	20,00	25,27
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	9.660	102,80	168,73	3.820	135,43	212,91	9.400	102,33	131,62	4.600	154,58	159,85
Pele não melanoma	2.010	21,28	-	630	22,28	-	3.600	39,24	-	730	25,00	-
Todas as neoplasias	11.670	124,19	-	4.450	157,77	-	13.000	141,52	-	5.330	179,12	-

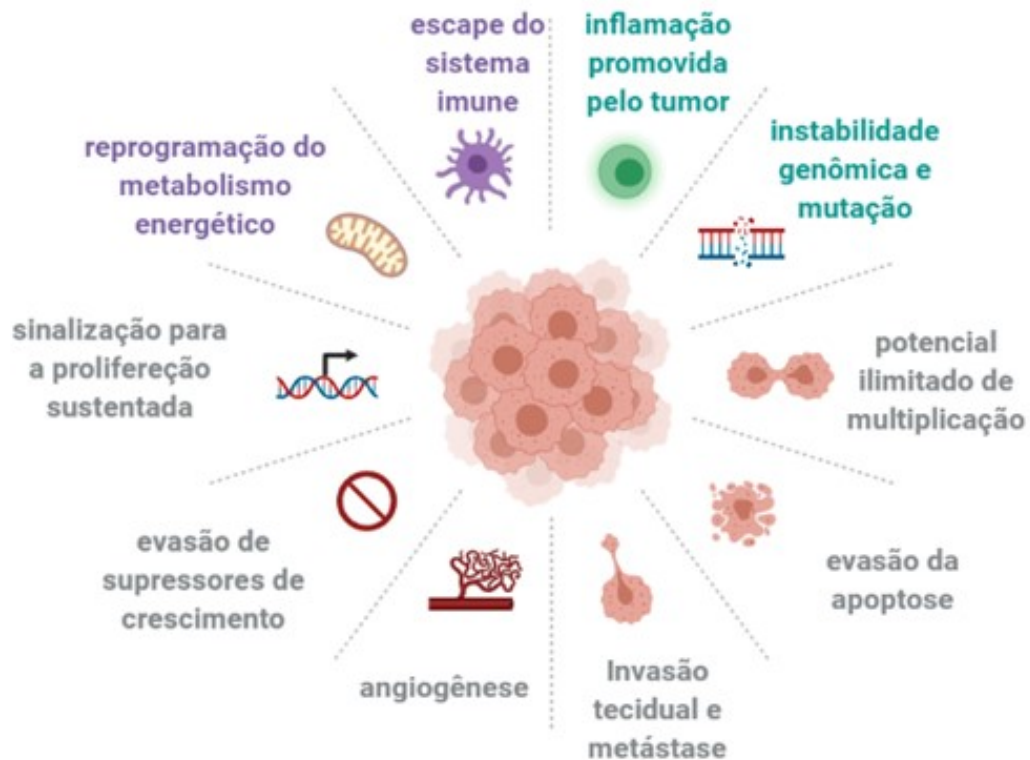
Fonte: INCA, 2020.

Carcinogênese

A carcinogênese, processo de formação do câncer, é composta por três etapas: iniciação, promoção e progressão. Na etapa de iniciação, as células sofrem alterações genéticas, causadas por mutações pontuais, amplificações ou deleções nos genes. Na etapa de promoção, as células geneticamente alteradas sofrem efeito dos agentes carcinogênicos, classificados como oncopromotores, transformando-as de forma lenta e gradual em células malignas. Na terceira e última etapa, a progressão, ocorre a multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas (Civetta e Civetta, 2011).

Para iniciar o desenvolvimento de um tumor, ocorrem várias alterações essenciais na fisiologia da célula neoplásica, denominadas por Hanahan e Weinberg (2000) como "*Hallmarks of cancer*". Neste primeiro artigo foram descritos seis características principais: 1) autossuficiência em sinais estimuladores de crescimento; 2) insensibilidade para fatores que inibem o crescimento; 3) invasão em outros tecidos e capacidade de fazer metástases; 4) potencial ilimitado de multiplicação; 5) estímulo ao desenvolvimento de novos vasos sanguíneos; e 6) bloqueio dos mecanismos naturais de morte celular (Hanahan e Weinberg, 2000). Uma década depois, foram acrescentadas mais quatro características: 7) evasão do sistema imune; 8) promoção de processos inflamatórios; 9) reprogramação do metabolismo energético; 10) e a instabilidade genômica e mutação (Hanahan e Weinberg, 2011) (figura 2).

Figura 2 - Os principais eventos da progressão tumoral



Legenda: Proposta de dez alterações para o desenvolvimento tumoral por Hanahan e Weinberg
 Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011; criado com o site BioRender.com

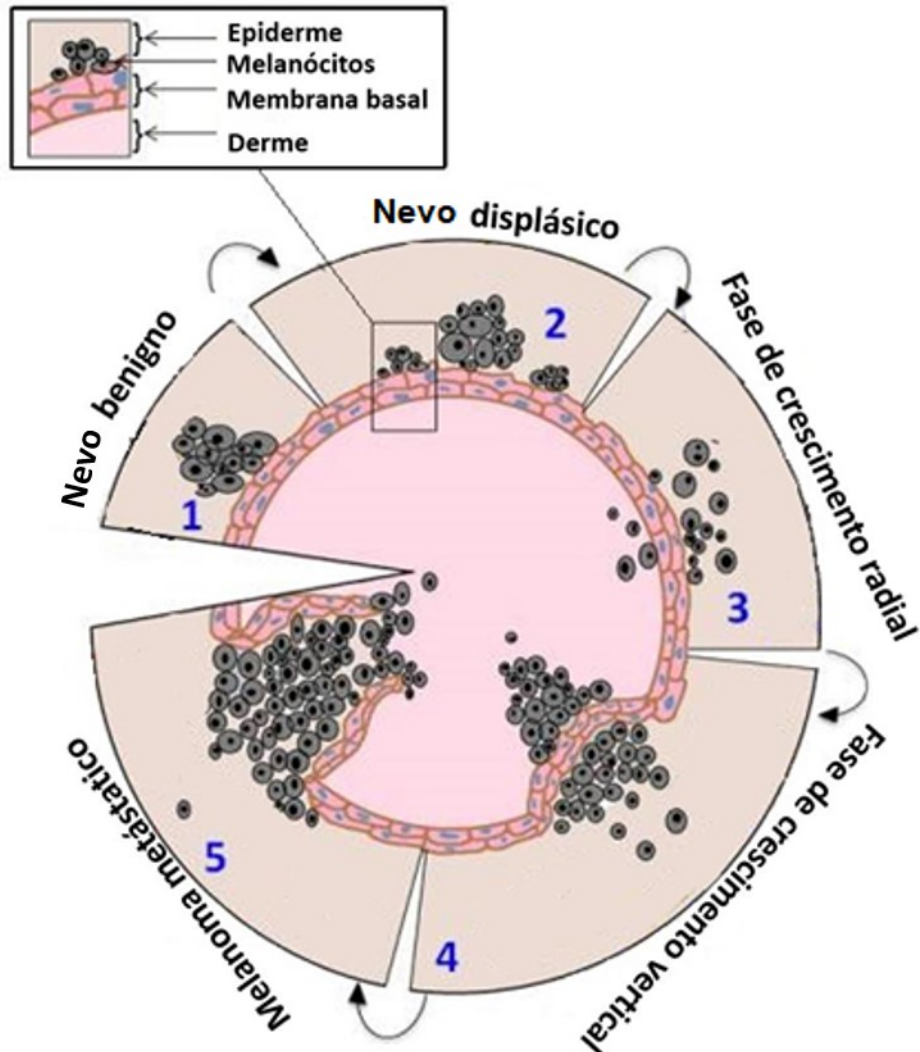
Melanoma

O melanoma, originado a partir da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de melanina, é a forma mais letal de câncer de pele devido a sua alta capacidade de metástase (INCA, 2020). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA 2020), para o triênio 2020/2022, são estimados no Brasil 8.450 novos casos, sendo 4.200 em homens e 4.250 em mulheres, um aumento bem significativo quando comparado à estimativa de 6.260 casos no triênio anterior. O melanoma geralmente tem bom prognóstico, com altas possibilidades de cura quando diagnosticado em estágio inicial, razão pela qual a prevenção e o diagnóstico precoce assumem um

importante papel (Mendes e col., 2010). A sobrevida média mundial estimada em 5 anos é de 69%, sendo de 73% nos países desenvolvidos e de 56% nos países em desenvolvimento (INCA, 2011).

O desenvolvimento do melanoma é caracterizado por cinco fases (figura 3). A primeira delas é a visibilidade de nevos benignos (constituído de melanócitos nevais), que ocorrem como consequência de algumas mutações precoces no gene *BRAF* (*BRAF PROTOONCOGENE, SERINE/THREONINE KINASE*) e *NRAS* (*NRAS PROTOONCOGENE, GTPase*) (Davies e col., 2002; Omholt col., 2003). A segunda fase apresenta uma lesão benigna. A progressão do melanoma é seguida pela terceira fase de crescimento vertical, com a penetração de células malignas em níveis mais profundos de pele, ocorrendo a invasão da derme e dos vasos, iniciando a disseminação metastática. Em contraste com a quarta fase de crescimento radial, o infiltrado de células imunes durante a fase de crescimento vertical ocorre com pouca frequência (10-20% dos casos), mas quando presente, está fortemente correlacionado com a sobrevivência prolongada e uma menor incidência de doença metastática em desenvolvimento. Esta fase é definida também pela invasão dérmica. O melanoma metastático é a quinta e última fase, e é caracterizada pela presença das células malignas crescendo em locais diferentes do local de origem (Clark e col., 1984; Clemente e col., 1996; Hodi, 2006; Prasad e col., 2015).

Figura 3 - Visão geral da progressão do melanoma



Legenda: O diagrama esquemático é uma adaptação do modelo proposto por Clark para o desenvolvimento do melanoma. Os números na figura referem-se às diferentes fases da progressão do melanoma.

Fonte: Adaptado de Prasad e col., 2015

Inflamação e câncer

A relação entre câncer e inflamação é de alta relevância uma vez que a inflamação é um componente crítico para o início e progressão do tumor. Além disso, mediadores inflamatórios presentes em diferentes etapas da inflamação tem um papel central na progressão tumoral mediando a angiogênese, invasão e metástase (Coussens e Werb, 2002; Hanahan e Weinberg, 2000).

A inflamação é uma resposta do organismo a um dano do tecido e pode ser originária de infecção, injúria tecidual, lesões isquêmicas, exposição a toxinas ou outros tipos de trauma (Singh e col., 2019). O processo inflamatório é um processo coordenado, principalmente, por várias células do sistema imune chamadas de leucócitos, além de células endoteliais e fibroblastos. Na sua fase inicial, as primeiras células a migrar para o sítio inflamatório são os neutrófilos. Posteriormente, outros tipos de leucócitos, como monócitos e linfócitos, serão ativados e migrarão para o local inflamado através da ativação de uma cascata de sinalização desencadeada por fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, resultando na defesa contra a injúria tecidual e por fim no reparo tecidual (Coussens e Werb, 2002; Nathan, 2002; Philip e col., 2004; Lu e col., 2006) (figura4).

A inflamação aguda visa reparar os tecidos lesados e eliminar patógenos indesejados e células neoplásicas. O resultado ideal esperado após a inflamação aguda é a resolução completa com um retorno à homeostase, que é executada pelos mediadores pró-resolutivos especializados, como por exemplo as lipoxinas (LXs), resolvinas (Rvs), protectinas e maresinas (MaRs) (Serhan, 2014; Zhang e col., 2017). Se não resolvida, a inflamação persistente leva à inflamação crônica, evento onde a mutação e proliferação celular podem criar um ambiente propício ao desenvolvimento do câncer. As células predominantes neste microambiente inflamatório são os macrófagos que, juntamente com os outros leucócitos, geram altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) para combater a infecção. Entretanto, este cenário pode gerar um dano contínuo ao tecido e consequente proliferação celular, cuja persistência é prejudicial ao tecido. Esses mecanismos de combate à infecção podem produzir agentes mutagênicos, como peróxido de nitrito, que reage com o DNA e causa mutações nas células epiteliais do estroma (Singh e col., 2019).

Desta forma, as células inflamatórias podem ter um papel benéfico e/ou

prejudicial no desenvolvimento das neoplasias. As células do sistema imune podem controlar a progressão do tumor devido a sua propriedade de vigilância imunológica, disparando um mecanismo capaz de perceber e eliminar as células malignas. No entanto, no quadro de inflamação crônica, os mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas produzidas pelos macrófagos e neutrófilos, podem promover alterações genéticas, o desenvolvimento de mutações tumorigênicas e a instabilidade genética necessária para permitir, por exemplo, o desenvolvimento do tumor (Coussens e Werb, 2002; Elinav e col., 2013) (figura4).

Aproximadamente 15% a 20% de todos os casos de câncer são precedidos por infecção, inflamação crônica ou autoimunidade (Mantovani e col., 2008; Grivennikov e col., 2010). Nesses casos, a inflamação que promove o câncer é induzida muito antes da formação do tumor no intuito de controlar e reparar algum estímulo prejudicial ao organismo. Os fatores ambientais que predisõem e promovem o câncer podem ser provocados pela indução da inflamação crônica de baixo grau e intensidade que precede o desenvolvimento do tumor (Greten e Grivennikov, 2019).

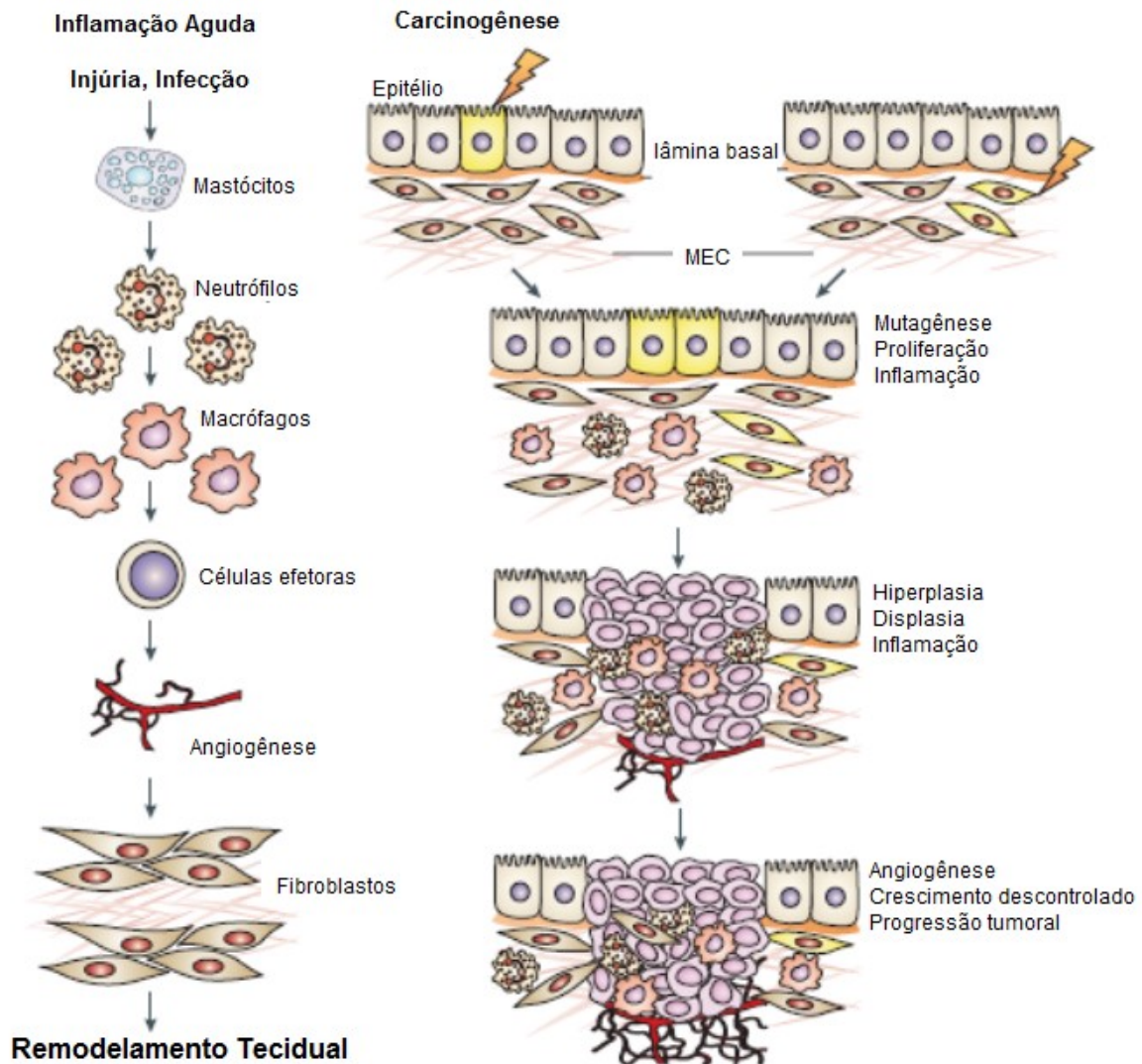
O surgimento do câncer induzido por inflamação crônica foi descrito em várias patologias, incluindo câncer gástrico em associação com infecção por *Helicobacter pylori*; exposição ao amianto ou cigarro no câncer de pulmão; exposição ao arsênico e câncer de pele; refluxo gastroesofágico para câncer de esôfago; doença intestinal inflamatória para câncer colorretal, pancreatite crônica para câncer de pâncreas; inflamação pélvica, doença para câncer de ovário e papilomavírus e hepatite para carcinomas cervicais e hepáticos (Mantovani e col., 2008). Exemplos de carcinogênicos inflamatórios incluem os ROS (espécies reativas de oxigênio) e MMP (metaloproteinases de matriz), que podem induzir dano ao DNA e ruptura da matriz extracelular, respectivamente (Crusz e Balkwill, 2015). Além disso, algumas citocinas, tais como IL-1 β e IL-8, podem induzir o crescimento anormal de células pré-neoplásicas em carcinoma gástrico e melanoma, respectivamente (Vano e col., 2018).

Diante do exposto acima, pode-se concluir que a inflamação atua em dois momentos: na fase inicial do desenvolvimento neoplásico, contribuindo para a transformação da célula normal em célula maligna, e na instalação e progressão tumoral, no momento em que tumor modula o microambiente local, fazendo com que a resposta inflamatória promova o desenvolvimento das células tumorais e inflamatórias no microambiente tumoral (Rakoff-Nahoum, 2006; Smyth e col., 2006; Onuchic e Chammas, 2010). A elucidação do papel e da diversidade da inflamação

relacionada ao câncer pode abrir caminho para melhorar as atuais estratégias de imunoterapia e pode afetar o diagnóstico e a prevenção (Ridker e col., 2017). Considerando as alterações inflamatórias em diferentes tipos de câncer, prevenir ou reverter a inflamação é uma importante abordagem para o controle do câncer (Todoric e col., 2016).

Além do evidente envolvimento do processo inflamatório na promoção do processo de carcinogênese, o infiltrado inflamatório que circunda o tumor interfere no desenvolvimento e progressão do mesmo, sendo descrito desde 1863, quando Virchow observou a presença de câncer em locais com inflamação crônica prévia, sendo o primeiro a descrever a presença de leucócitos em tumores humanos (Virchow 1863; Korniluk e col., 2017). Este fato foi o primeiro indício de que o ambiente tumoral não é constituído somente por células tumorais. Estudos posteriores demonstram esse infiltrado inflamatório que é denominado como microambiente tumoral é capaz de contribuir para a progressão do tumor (Coussens & Werb, 2002). Diante disso, o microambiente tumoral tornou-se um novo alvo terapêutico, juntamente com as terapias clássicas como radioterapia, quimioterapia e cirurgia (Postovit e col., 2006).

Figura 4 - Relação entre a inflamação e a carcinogênese



Legenda: A figura descreve a sequência de eventos que ocorre na inflamação aguda até o reparo tecidual e também como a não resolução dessa inflamação – inflamação crônica – contribui com a carcinogênese. Na inflamação aguda, em resposta a uma injúria ocorre a ativação de células residentes (mastócitos, macrófagos e células dendríticas), a entrada de granulócitos em resposta à lesão e a infiltração de células imunes efectoras (linfócitos) para permitir respostas imunes específicas. Em seguida há recrutamento e ativação de células endoteliais e fibroblastos para a formação de novos vasos sanguíneos e de uma matriz colágena para o remodelamento tecidual. Na carcinogênese, há uma desorganização caótica da inflamação e do reparo. Durante essa inflamação crônica não resolvida, os eventos descritos anteriormente são desorganizados e a homeostase não é alcançada. Durante o desenvolvimento tumoral, células epiteliais e estromais podem sofrer alterações que promovem sua proliferação e mutação de células epiteliais. Esta alteração na homeostase do tecido pode, por sua vez, levar a uma resposta inflamatória, que então promove ainda mais o crescimento do tumor por meio da ativação das células circundantes, especialmente neovascularização.

Fonte: Adaptado de Albini e Sporn, 2007.

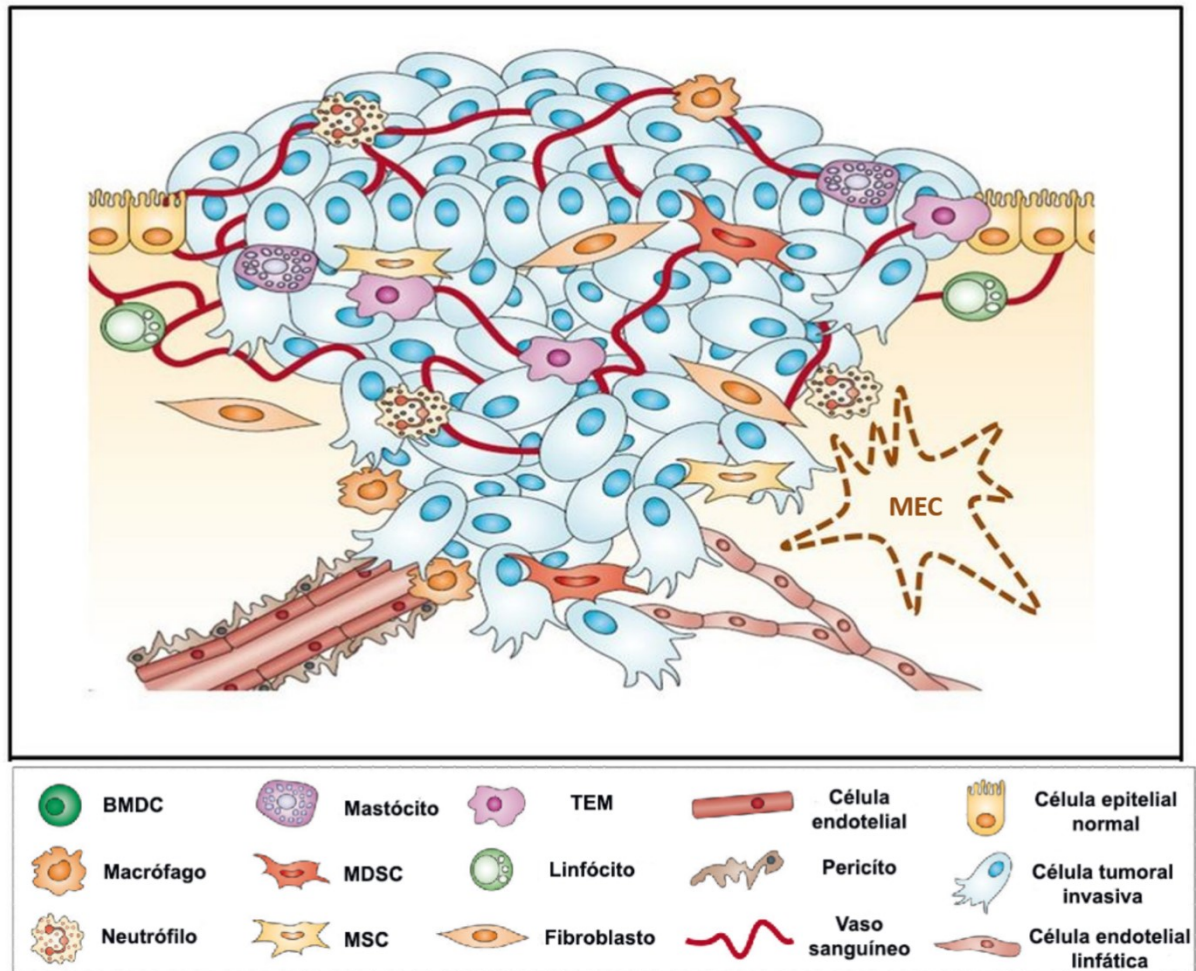
Microambiente tumoral

O conceito de microambiente tumoral surgiu no século XIX com a hipótese de “semente e solo”, do inglês, “*seed and soil*”, em que as células tumorais são como semente, enquanto o ambiente organizacional que as cerca são como o solo (Paget, 1989; Xiao e Yu, 2020). O microambiente tumoral é então formado por componentes celulares e não celulares que desempenham funções em todas as etapas do desenvolvimento tumoral (Balkwill e Mantovani, 2012).

Os principais componentes celulares incluem, além das células tumorais, células do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos, células *natural-killer*, linfócitos, células de suporte, como fibroblastos, células endoteliais, pericitos e células musculares lisas, além dos vasos linfáticos e adipócitos (figura 5) (Fridman e col., 2012; Wang e col., 2017). Os componentes não celulares são a matriz extracelular tumoral, fatores de crescimento, interleucinas, citocinas e quimiocinas (Okuyama e Inoue, 2011; Allen e Louise, 2011).

Em grande parte, orquestrado por células inflamatórias, o microambiente do tumor é indispensável no processo neoplásico promovendo a sobrevivência, proliferação e migração das células tumorais (Coussens & Werb, 2002). Entre as diversas células inflamatórias que compõe o microambiente tumoral, os macrófagos, denominados de macrófagos associados a tumor (TAMs - do inglês “tumor-associated macrophages”), são os elementos predominantes, podendo representar mais da metade das células não tumorais (Sica e col., 2002).

Figura 5 - Os principais componentes do microambiente tumoral e sua contribuição para a progressão tumoral



Legenda: Os diversos componentes celulares que compõem o microambiente tumoral, como: células endoteliais, fibroblastos e uma variedade de células derivadas da medula óssea (BMDCs), incluindo macrófagos, células supressoras mielóides (MDSCs), monócitos expressando TIE2 (TEMs) e células-tronco mesenquimais (MSCs).

Fonte: adaptada de Joyce e Polard, 2008

Macrófagos

Os macrófagos são células do sistema imune inato que desempenham importantes funções na fagocitose de patógenos, na apresentação de antígenos pela exibição de antígenos processados, em associação com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e na produção de diferentes tipos de citocinas (Wynn e col., 2013; Sica e col., 2015). Essas células atuam no apoio à homeostase

tecidual, na resolução das respostas imunes antes que ocorra dano excessivo ao tecido (Shi e Pamer, 2011; Chávez-Gálan e col., 2015).

Os macrófagos são células mielóides e possuem três precursores oriundos de três ambientes distintos: o saco vitelino; o fígado fetal e a medula óssea. Os macrófagos que se desenvolvem no saco vitelino extra-embriônico a partir de progenitores eritro-mielóides precoces não possuem um intermediário monocítico. Já os monócitos hepáticos fetais foram gerados no fígado fetal a partir de progenitores eritro-mielóides derivados do saco vitelino tardio. Por fim, os macrófagos provenientes das células-tronco hematopoiéticas colonizam a medula óssea e produzem monócitos da medula óssea que constituem o sangue continuamente, processo mantido ao longo da vida (Van de Laar e col., 2016). Os macrófagos têm papéis protetores e patogênicos em uma grande variedade de doenças. As mudanças na diferenciação dos macrófagos, sua polarização e repolarização e a ativação no ambiente local podem desempenhar um papel decisivo na patogênese de uma ampla variedade de doenças inflamatórias (Shapouri-Moghaddam e col., 2018).

Os macrófagos possuem uma ampla plasticidade e sua fisiologia pode ser modificada em resposta a diferentes estímulos ambientais, gerando várias subpopulações de macrófagos com diversas funções. Dependendo do estímulo presente no ambiente inflamatório, os macrófagos adquirem basicamente dois principais perfis de ativações: um perfil denominado M1, com características pró-inflamatórias e um perfil M2, com propriedades principalmente anti-inflamatórias (Mantovani e col., 2002). Shapouri-Moghaddam e colaboradores (2018) descreveram três caminhos diferentes para controlar a polarização: 1) a epigenética celular e a sobrevivência celular levando ao desenvolvimento e a viabilidade dos macrófagos; 2) o microambiente tecidual em que ele se encontra; e 3) os fatores extrínsecos, como produtos microbianos e citocinas liberadas na inflamação (Shapouri-Moghaddam e col., 2018).

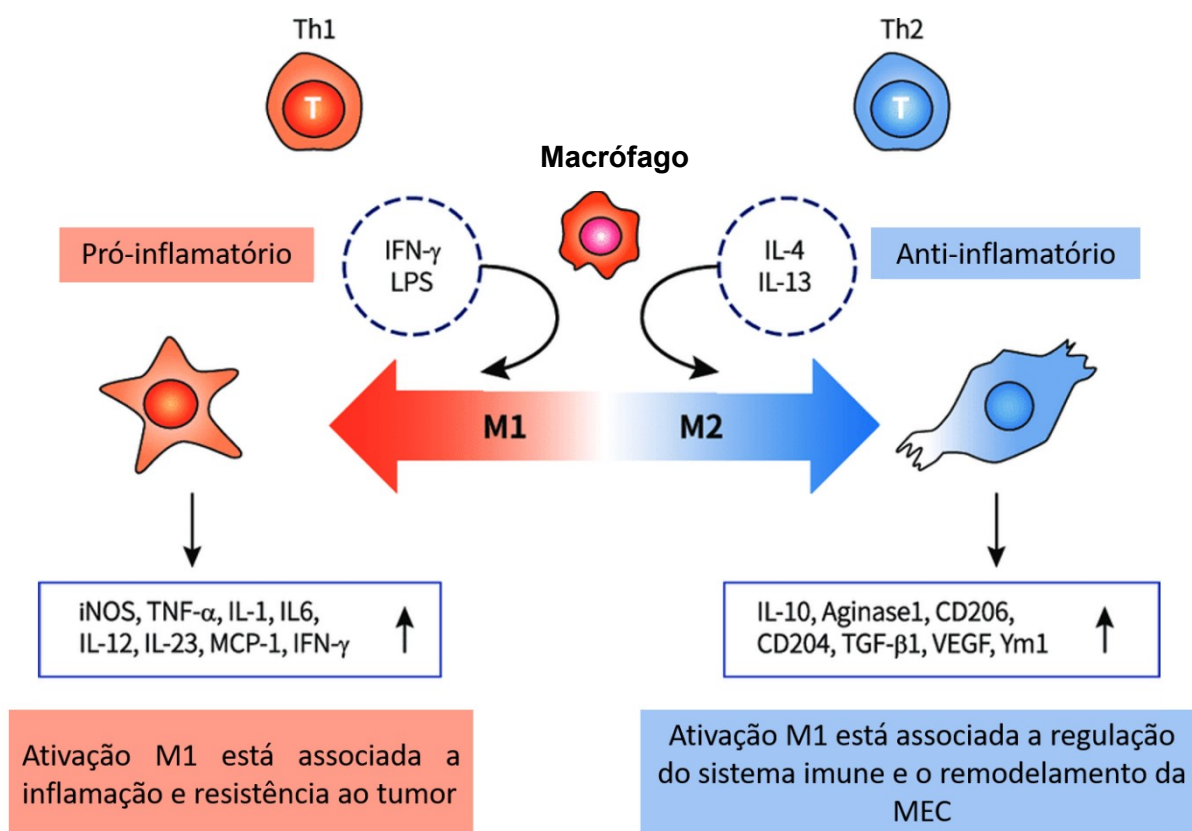
Na polarização para o perfil M1, a ativação dos macrófagos é chamada de clássica e tem um aumento na expressão de citocinas envolvidas com as respostas das células T *helper* do tipo T1 (Th1). Esta população é ativada pelo interferon-gama (IFN- γ), pelo LPS (lipopolissacarídeo) através de receptores *Toll-like* (TLRs) e pelo fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos ou pelo fator estimulador de colônias 2 (do inglês GM-CSF ou CSF-2). Essa população caracteriza-se pela elevada expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II,

pela liberação de interleucina-12 (IL-12) e do fator de necrose tumoral- α (TNF α). Além disso, os macrófagos M1 apresentam alta geração de ROS e óxido nítrico (NO), bem como a capacidade de combater agentes patogênicos e células tumorais (Taylor e Gordon, 2003; Sica e col., 2008; Hume, 2015). A ativação deste perfil é mediada por várias vias de sinalização como: os fatores de transcrição STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição) e NF κ B (fator nuclear- κ B), além da via das MAP kinases (O'Shea e Murray, 2008).

A ativação não clássica, do tipo M2, está envolvida na resposta Th2. Os macrófagos M2 exercem funções anti-inflamatórias e pró-tumorais, tais como remodelamento e reparo tecidual, secretando citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (fator de crescimento transformador beta). Além disso, promovem a angiogênese devido à alta expressão de VEGF (fator vascular de crescimento endotelial) (figura 6). Macrófagos M2 podem ser ainda subdivididos: M2a, quando estimulados por IL-4 e IL-13; M2b, quando estimulados pela ativação de TLRs, por LPS e complexos imunes; M2c, quando estimulados por IL-10, glicocorticóides e TGF- β ; e M2d, quando estimulados por fatores derivados de tumor (Hao e col., 2012; Sica e Mantovani, 2012; Chanmee, 2014)

Podemos distinguir os dois perfis de ativação dos macrófagos através da expressão diferencial de alguns marcadores celulares. Um dos principais marcadores utilizado é a relação entre arginase-1 e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), enzimas que competem pela utilização de L-arginina. Nos macrófagos M1 caracterizados pela alta produção de NO (óxido nítrico), a iNOS cataboliza L-arginina em NO e citrulina, enquanto os macrófagos M2 expressam altos níveis de arginase-1, que metaboliza a L-arginina em ornitina, baixos níveis de NO (Odegaard e Chawla; 2008). A produção de NO através da ativação da iNOS é de grande importância para a citotoxicidade dos macrófagos M1 contra patógenos e células tumorais (Lala;1998; Xue e col., 2018). Os marcadores fenotípicos mais comuns que diferenciam os dois principais perfis dos macrófagos são exemplificados na figura 6.

Figura 6 - Os dois principais perfis de macrófagos



Legenda: Os macrófagos possuem dois principais perfis de ativação: um perfil M1 pró-inflamatório e um perfil M2, anti-inflamatório. Os macrófagos do M1 são ativados por IFN- γ e LPS e estão envolvidos na resposta Th1. Produzem moléculas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23. Os macrófagos M2 são ativados por IL-4 e são caracterizados por: altos níveis de arginase, IL-10 e baixos níveis de IL-12, além de produzir VEGF, TGF- β .

Fonte: Adaptada de Lee e col., 2019.

Macrófagos associados ao tumor

Os macrófagos ($M\emptyset$) podem representar até 50% da massa tumoral nos tumores sólidos (Mantovani e col., 1992). Dessa forma, tornam-se a principal população no microambiente tumoral, estabelecendo uma complexa função na interação com as células neoplásicas. Uma vez presentes nesse microambiente, são então denominados de TAMs (macrófagos associados ao tumor) (Sica e Mantovani, 2012; De Palma e Lewis, 2013; Noy e Pollard, 2014). Os TAMs se originam

principalmente de monócitos precursores circulantes, mas também podem ter origem de macrófagos residentes no tecido onde o tumor se desenvolverá posteriormente (Cortez-Retamozo e col., 2012; Movahedi e Ginderachte, 2016).

Durante o desenvolvimento tumoral os macrófagos recrutados para esse microambiente são primariamente polarizados no perfil M1 e são geralmente caracterizadas por uma baixa expressão de IL-10, alta expressão de IL-12, TNF, iNOS e moléculas do MHC de classe II, elaborando uma resposta capaz de promover as respostas imunes que combatem células tumorais (Sica e Mantovani, 2012). Durante a progressão do tumor, os TAMs geralmente adquirem um fenótipo *M2-like*, caracterizado pela alta secreção de IL-10; expressão de arginase-1, CD163 (receptor *scavenger*) e CD206 (receptor de manose), além da baixa produção de IL-12, possuindo assim uma baixa atividade antitumoral (Sica e Mantovani, 2012).

A relação entre as células tumorais, os TAMs e outros componentes do microambiente tumoral é dinâmica e heterogênea. Destaca-se nesse contexto a secreção de mediadores imunossupressores que interferem na capacidade do sistema imunológico de combater o tumor (Anfray e col., 2020). Além disso, um dos fatores essenciais para o efeito pró-tumoral dos TAMs é a promoção da neo-angiogênese através da secreção de fatores de crescimento como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (Mantovanni e col., 2017). Em tumores com estágio avançados, os TAMs se acumulam em áreas hipóxicas, apresentando uma baixa capacidade de apresentação de antígenos e comportamento pró-angiogênico (Sica e col., 2011; Laoui e col., 2014; Anfray e col., 2020). Nessas áreas de hipóxia, os TAMs expressam o fator induzido por hipóxia (HIF) 1 α e -2 α , que são fatores responsáveis pela transcrição de genes pró-angiogênicos, como o gene *VEGF*, que sustenta a progressão tumoral. Além disso, em carcinoma pulmonar de Lewis foi visto que essas áreas em hipóxia promovem seletivamente uma polarização M2 nos macrófagos, ativando a sinalização celular induzida por IL-6 (Zhang e col., 2014). A hipóxia é, portanto, crucial para manter o fenótipo *M2-like* pró-tumoral de TAMs, tornando a polarização mediada por hipóxia em TAMs uma estratégia prática para o tratamento do câncer (Zheng e col., 2017).

Os TAMs também liberam quimiocinas pró-angiogênicas, como CXCL8, e enzimas proteolíticas, como MMPs e catepsinas, que degradam a matriz extracelular (MEC). A ação das MMP-2 e MMP-9 induzem à liberação de TGF- β , VEGF, PDGF e FGF presentes na MEC que contribuem para o aumento da invasão tumoral (Cassetta

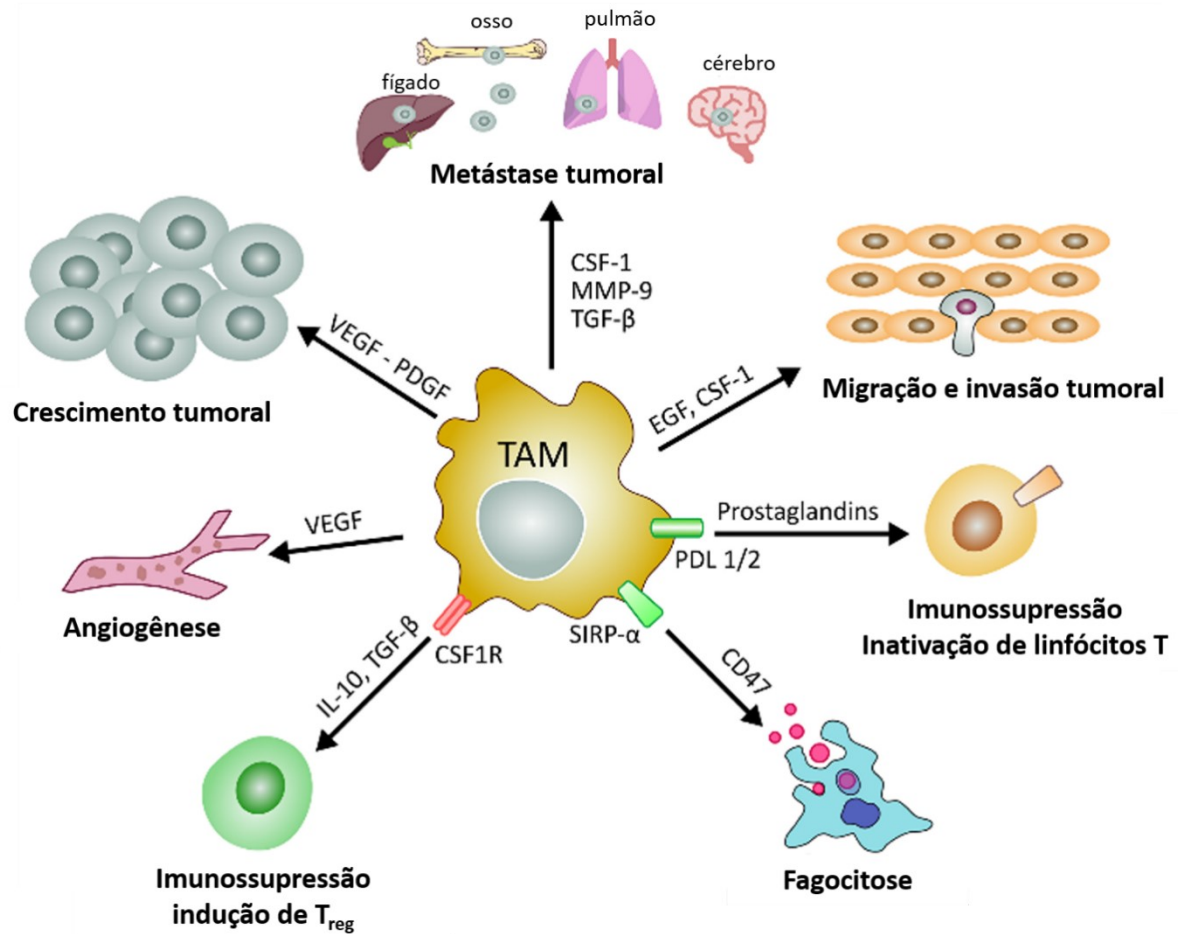
e Pollard, 2018; Mazziere e col., 2019; Prenen e Mazzone, 2019)

Desta maneira, evidencia-se que os TAMs são essenciais para a progressão tumoral, uma vez que promovem: a proliferação e sobrevivência celular; a angiogênese, através da indução de fatores pró-angiogênicos como o VEGF e o HIF-1 α ; e a metástase, através do TGF- β e outros, que propiciam extravasamento das células tumorais pelos novos vasos formados (figura 7) (Lin e col., 2006; DeNardo e col., 2009; Ostuni e col., 2015). Diversos estudos mostram que há uma correlação entre o número de TAMs, o desenvolvimento avançado do tumor e a diminuição da sobrevida nos tipos de câncer de mama, renal, pancreático, cabeça e pescoço, linfoma, glioblastoma e melanoma (Torisu e col., 2000; Bingle e col., 2002; Guerriero, 2018). Nesse contexto, a repolarização dos TAMs, ou seja, a perda de características imunossupressoras e aquisição de características pró-inflamatórias em macrófagos são associadas ao aumento da sobrevida de de pacientes e camundongos em diversos tipos de câncer (Pathria e col., 2019).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico humano, quando tratados com o meio condicionado de células de melanoma humano altamente metastático (MV3), assumem um perfil TAM/ M2-*like in vitro* e *in vivo* (Simões e col., 2017, De Brito e col, 2019). Neste estudo, os macrófagos humanos adquiriram características M2, como a alta expressão de CD206 e CD163, IL-10 e arginase-1, baixa produção de NO e ROS, além de baixa atividade tumoricida (Simões e col, 2017). Estes estudos corroboram a ideia de que fatores secretados pelas células de melanoma podem polarizar os macrófagos para um perfil M2-*like* pró-tumoral.

Diante destas evidências, os macrófagos presentes no microambiente tumoral são de extrema importância em diversas etapas da progressão tumoral, tornando-os importantes alvos para a terapia contra o câncer. Além disso, desvendar os mecanismos moleculares pelo qual os TAMs são polarizados também se torna uma importante ferramenta para ser utilizada na terapia antitumoral.

Figura 7 - Funções pró-tumorais dos TAMs



Legenda: Os mecanismos de macrófagos associados a tumor (TAMs) na promoção tumoral como invasão, vascularização, intravasamento, extravasamento, estabelecimento de nichos pré-metastáticos e proteção da sobrevivência das células tumorais circulantes.

Fonte: Adaptada de Aramini e col., 2021.

Sinalização intracelular no câncer

A resposta tumoral pode ser modulada por diferentes vias de sinalização disparadas tanto em células tumorais como nas outras células presentes no microambiente tumoral. De forma interessante, essas vias participam de vários eventos responsáveis pelo processo inflamatório e tumoral e evidenciam ainda mais a forte relação entre inflamação e câncer. Dentre estas vias, podemos destacar MAPK/ERK e PI3K/AKT (Cao e col., 2019).

A família de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) regula

diferentes processos como o crescimento celular, diferenciação, sobrevivência celular, função neuronal e resposta imune (Krishna e Narang, 2008). Na literatura, já foram descritos seis grupos principais de MAPKs em mamíferos: a proteína quinase regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinase*) ERK1/2; ERK7/8; ERK3/4; ERK5 (também conhecida como *big mapkinase1*, BMK1); a JNK1/2/3 (*cJun N-terminal kinase*) e a p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$). As funções de ERK3/4 e ERK7/8 ainda não são muito bem esclarecidas (Krishna e Narang, 2008).

A via canônica MAPK/ERK é composta por três tipos de quinases de MAPKK, (MAPKKK) da família da *RAF* (protooncogene, serina/treonina quinase), *A-RAF*, *B-RAF* ou *BRAF* e *RAF-1* ou *C-RAF* quinases. Em um nível abaixo estão as MAPKKs, que são compostos de MEK1 e MEK2. Finalmente, mais abaixo estão a ERK1 e ERK2, as quais são as efetoras finais da via MAPK (Olea-Flores e col., 2019).

Após a sua ativação, a via das MAPKs atua como mediadores de sinalização intracelular que controlam a diferenciação celular, proliferação, apoptose e outras funções efetoras (Wellbrock e Hurlstone, 2010, Olea-Flores e col., 2019). A ativação de fatores de transcrição dependentes de MAPK ativa a expressão de genes alvos para a atividade dos macrófagos no crescimento, na diferenciação celular, na resposta inflamatória e na sua polarização (Li e col., 2020).

A evidência que a sinalização MAPK é importante para a polarização de macrófagos foi demonstrada por diversos autores. Em um modelo de carcinoma de pulmão foi demonstrado que a polarização M2 depende da ativação da ERK (Zhang e col., 2014). Além disso, ativação da sinalização ERK pode induzir nos TAMs *M2-like* a produção de IL-8 promovendo a migração e invasão do câncer de mama (Cao e col., 2016; Li e col., 2020). Mu e colaboradores (2018) viram que o lactato, presente no microambiente tumoral devido ao metabolismo da glicose, induz a polarização M2 em TAMs de maneira dependente da sinalização de ERK1/2 em macrófagos (Mu e col., 2018).

Algumas quimiocinas e citocinas, secretadas pelos TAMs ou pelas células tumorais, são capazes de ativar a sinalização da ERK. Recentemente foi demonstrado que CCL3, também conhecido como MIP α , é secretada pelos TAMs e pelas células tumorais e promove a invasão e migração das células tumorais pela fosforilação de ERK e AKT em um modelo de carcinoma de esôfago (Kodama e col., 2020).

A AKT ou PKB é uma serina/treonina quinase de 57 kDa cuja ativação pode ser induzida pelos fatores de sobrevivência da célula. Nos mamíferos, foram identificados

três genes *AKT* (*AKT1*, *AKT2* e *AKT3*) e a principal isoforma *AKT* é codificada por *AKT1* que modula apoptose em vários tipos celulares. Esses três genes *AKT* são diferencialmente expressos, ao nível de RNA e de proteína e desempenham funções distintas na fisiologia das células normais e em algumas doenças como câncer e a aterosclerose (Bellacosa e col., 1993; Datta e col., 1999; Revathidevi e Munirajan, 2019). A via PI3K/AKT (do inglês, *phosphatidylinositol 3-kinase/Protein Kinase-B*) é um regulador chave da sobrevivência durante o estresse celular. Como os tumores existem de forma intrínseca em um ambiente estressante, caracterizado por fornecimento limitado de nutrientes e oxigênio, bem como pelo baixo pH, o papel desta via no câncer parece ser crucial (Datta e col., 1999). Descoberta em 1991, a via PI3K/AKT tem sido amplamente estudada em diversos tipos celulares (Bellacosa e col., 1991). Vários estudos demonstram que essa via regula a sobrevivência, migração e proliferação de macrófagos, além de orquestrar a resposta a diferentes sinais metabólicos e inflamatórios nos macrófagos (Song e col., 2005).

O eixo PI3K / Akt / mTOR é uma das mais frequentes vias de sinalização ativadas no câncer humano. Esta via participa da diferenciação e da regulação metabólica das células do sistema imune inato e adaptativo, além da promoção da angiogênese (Conciatori e col., 2018). A mTOR forma dois complexos distintos: o complexo mTORC1 e o mTORC2 e estes possuem diferentes funções no microambiente tumoral. A ativação constitutiva de mTORC1, leva a diminuição na produção de IL-4 consequentemente inibindo a polarização de M2. Já mTORC2 também desempenha um papel crítico na polarização de macrófagos M2, regulando positivamente os marcadores M2 como o CD206 e CD163, através do eixo AKT, levando assim a um aumento da invasão e metástase em modelos de tumor mamário, tanto in vitro quanto em camundongos (Shrivastava e col., 2019).

Diversos trabalhos demonstram que a ativação de AKT/PI3K/mTOR está relacionada com a polarização M2 em diversos tipos de tumores. Isso ocorre pelo fato da sinalização de AKT regular positivamente fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que promovem o fenótipo M2, como TGF β ; IL-10; EGF, CCL12 e CCL18 (Lin e col., 2015; Vergadi e col., 2017; Lian e col., 2020). Entre as isoformas da AKT, a AKT2 contribui para a polarização M1 dos macrófagos e para a migração das células tumorais em resposta ao CSF-1 (fator de estimulação de colônia-1). Além disso, a supressão da expressão de AKT2 em macrófagos peritoneais de camundongos resultou na redução da migração das células tumorais (Zhang e col., 2009). De forma

inversa, em macrófagos, o miR-155, um micro RNA que é regulado positivamente por estímulos inflamatórios e parece ser essencial para respostas antitumorais de macrófagos, ativa a sinalização da AKT1. A deleção do miR-155 prejudicou a polarização M1 em macrófagos e reduziu a atividade da AKT levando ao crescimento tumoral em um modelo de câncer de mama espontâneo (Zonari e col., 2013).

Diante do exposto, a ativação da via PI3K/AKT é ambígua, com importantes funções para regulação tanto das respostas anti-inflamatórias quanto das respostas pró-inflamatórias em macrófagos, levando a indução de fenótipos M1 ou M2 nestas células (Vergadi, 2014).

A ambiguidade na resposta desencadeada por essas vias pode ser devido a ativação de fatores de transcrição com diferentes atividades nas células presentes no microambiente tumoral. Neste sentido, destacam-se os STATs (transdutor de sinal e ativador de transcrição), que pertencem a uma família de proteínas altamente conservadas e que compreendem sete membros: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6. Nas células não neoplásicas, os STATs geralmente estão localizados no citoplasma em seu estado inativo e a fosforilação de resíduos específicos de tirosina é um passo essencial para a sua ativação e transmigração para o núcleo (Akira e col., 1994; Darnell e col., 1994).

Após sua identificação durante a resposta inflamatória aguda em hepatócitos humanos estimulados por IL-6, diversos estudos demonstraram que a ativação de STAT3 desempenha um papel crítico em todas as etapas da metástase, incluindo proliferação e sobrevivência celular, invasão, migração e angiogênese (Wegenka e col., 1993; Bromberg e Darnell, 2000; Yu e col., 2009; Kamran e col., 2013).

A ativação persistente de STAT3 e STAT5 é relatada na maioria dos tipos de câncer, como mama, pulmão, pâncreas, cabeça e pescoço, próstata, ovário, melanoma, leucemias e linfomas (Buettner e col., 2002; Kamran e col., 2013). Tipicamente, a ativação de STAT3 é induzida pela fosforilação em um resíduo de tirosina (Tyr 705) regulada por membros de família Janus quinases como a JAK1 (Hirano e col., 2000; Yoshimura e col., 2007).

Diferentes STATs atuam na polarização de macrófagos. O IFN γ estimula a ativação de STAT1 e STAT2 para promover maiores efeitos pró-inflamatórios em macrófagos (Verdeil e col., 2019). De maneira inversa, a estimulação sinérgica de IL-6 com IL-4 favorece a polarização M2 em TAMs, modificando a expressão gênica, ativando STAT6 e STAT3 e promovendo a progressão tumoral (Gupta e col., 2018).

De maneira geral, a ativação de STAT3 favorece a polarização de macrófagos para um fenótipo M2, aumentando a expressão dos seus marcadores como Arg-1, TGF- β e IL-10 (Giurisato e col., 2018). Macrófagos M2 também são capazes de aumentar a ativação de STAT3 para sustentar o crescimento tumoral em câncer de mama (Yang e col., 2013; Huynh e col., 2019). Também foi visto que quando a STAT3 dos TAMs M2-*like* é inibida, ocorre uma reprogramação dos TAM M2-*like* para um perfil pró-inflamatório, sugerindo uma nova ferramenta para o desenvolvimento de terapias antitumorais.

Níveis bem equilibrados de fosforilação da tirosina, mantida pelas ações das proteínas tirosina quinases (PTKs) e proteínas tirosina fosfatases (PTPs), são fundamentais para manutenção da sinalização intracelular e alguns processos celulares, incluindo crescimento, diferenciação, metabolismo, migração e sobrevivência (Tonks, 2006; Hunter, 2009). As PTPs clássicas são divididas em dois grupos, as transmembranares e as não-transmembranares, incluindo SHP-1 e SHP-2, fosfatase fosfo-tirosina 1B (PTP1B) e proteína tirosina fosfatase T (TC-PTP) (Wu e col., 2003).

A SHP-1, codificada pelo gene *PTPN6*, é uma proteína tirosina fosfatase citosólica, que regula os níveis de fosfotirosina intracelular. É predominantemente expresso em células hematopoiéticas e em níveis baixos pelas células epiteliais (Tamir e col., 2000; Zhang e col., 2001). A SHP-1 possui três domínios: o N terminal; o C terminal com locais potenciais para fosforilação de tirosina, e um domínio catalítico no C terminal, sendo que a sua atividade máxima de fosfatase é alcançada somente quando os dois domínios C terminal estão envolvidos (Pei e col., 1993; Townley e col., 1993; Yang e col., 2003). Devido à função regulatória da SHP-1 nas células imunes, essa fosfatase está relacionada diretamente com as doenças autoimunes e o câncer (Sharma e col., 2016; Watson e col., 2016).

A SHP-1 regula a sinalização associada à diferentes receptores tirosina quinase, incluindo receptores de fator de crescimento e receptores de citocinas. Essa proteína também pode se ligar a membros da família das JAK e regular as atividades de JAK e STATs (Wu e col., 2003). Em um estudo foi observado que a ativação de SHP-1 leva a inativação de STAT1 e NF κ B promovendo efeitos anti-inflamatórios em macrófagos murinos (Valerio e col., 2011).

SHP-1 pode inibir a atividade de AKT ao desfosforilar seletivamente o supressor de tumor PTEN (Lu e col., 2003; Krotz e col., 2005). Além disso, a SHP-1

pode desfosforilar ERK em resposta ao VEGF (Chong e Maiese, 2007). Foi demonstrado que a ligação do VEGF-A ao VEGFR1 induz a ativação da fosfatase SHP-1 que, por sua vez, reduz a fosforilação do VEGFR2 (Nozaki e col., 2006), sugerindo que a atividade do VEGFR1 regularia negativamente a atividade do VEGFR2, o que poderia ter implicações importantes na modulação da via de sinalização do VEGF em tumores (Sullivan e Brekken, 2010). Além disso, a SHP-1 atua também como um modulador negativo da sinalização de citocinas através da inibição das STATs que, em alguns casos, pode ser favorável no controle da tumorigênese e progressão tumoral (Christophi e col., 2008).

A SHP-1 promove a polarização M1 em um modelo de miopatia induzida por vírus (Watson e col., 2015). No entanto, mais estudos são necessários para desvendar o envolvimento da SHP-1 na polarização dos macrófagos no microambiente tumoral.

Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

A evolução de vários tipos de câncer está associada à transição para a fase invasiva, que envolve os processos de angiogênese e metástase.

Em alguns tumores como o de próstata, a metástase é o evento mais letal na tumorigênese (Aytes e col., 2018; Graham e Shibata, 2020; Majidpoor e Mortezaee, 2020). A metástase é um processo de múltiplas etapas, iniciado pelo escape das células tumorais do sítio primário e culminando na colonização de tumores secundários em locais distantes do tumor primário (Majidpoor e Mortezaee, 2020; Mortezaee, 2020). Para isso é necessário o transporte de células malignas através de vasos sanguíneos e / ou linfáticos (Geiger e Peeper, 2009).

O processo de formação e crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes – angiogênese - implica uma comunicação complexa entre células tumorais, células endoteliais, componentes da matriz extracelular e secreção de diversos fatores de crescimento (Geiger e Peeper, 2009). Dentre as proteínas secretadas pelas células tumorais ou pelas células do microambiente tumoral que estimulam a formação de vasos sanguíneos, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) possui um papel fundamental em vários tumores (Siveen e col., 2017; Karaman e col., 2018; De Aguiar e De Moraes, 2019; Ceci e col., 2020).

O VEGF é uma família de polipeptídios secretados por diferentes tipos celulares compreendendo várias proteínas diferentes, incluindo VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PIGF) (Otrock e Makarem, 2007). O VEGF-A, foi o primeiro fator angiogênico identificado, sendo crítico tanto para processos angiogênicos fisiológicos, como o desenvolvimento vascular embrionário, morfogênese e crescimento esquelético, angiogênese pós-natal e reparação tecidual e funções reprodutivas nos indivíduos adultos. Além disso também possui um importante papel na angiogênese do câncer e consequente disseminação de células tumorais. É um forte indutor de permeabilidade em vasos sanguíneos e um mitógeno potente de células endoteliais, que também estimula a sobrevivência e a migração (Lacal e Graziani, 2018).

O PIGF foi o segundo membro descoberto da família VEGF, sendo assim nomeado após sua clonagem a partir de cDNA da placenta humana (Maglione e col., 1991; Cao e col., 1997; Carmeliet e col., 2001; Fischer e col., 2008). O VEGF-B é ativo nas células endoteliais do coração e estimula o crescimento dos cardiomiócitos, além disso é fundamental para sua sobrevivência das células endoteliais vasculares, pericitos, células musculares lisas e células-tronco vasculares / progenitoras. Na tumorigenese o VEGF-B tem um papel controverso, pois alguns estudos mostram que sua atuação é na "sobrevivência", ao invés de um ser um fator "angiogênico", porém há estudos que indicam o VEGF-B promove metástase do câncer por meio da remodelação da microvasculatura do tumor (Yang e col., 2015; Lacal e Graziani, 2018).

O VEGF-C é altamente expresso durante o desenvolvimento embrionário nas regiões onde os vasos linfáticos são formados e sua expressão diminui com a idade na maioria dos tecidos, exceto nos linfonodos (Rauniyar e col., 2018). O VEGF-D é expresso principalmente no pulmão e na pele durante a embriogênese e desempenha um papel na angiogênese e na linfangiogênese (Rauniyar e col., 2018). Nos tumores, foi descrito que o VEGF-D promove o crescimento de vasos linfáticos e metástases linfáticas (Stacker e col., 2001; Ceci e col., 2020).

As ações do VEGF dependem da sua interação com receptores específicos. Os receptores de VEGFs (VEGFRs) são clássicos receptores do tipo tirosina quinase divididos em: VEGFR-1 (também conhecido como FLT1), VEGFR-2 (também conhecido como FLK1 e KDR) e VEGFR-3 (também conhecido como FLT4) (Kowanetz e Ferrara, 2006) (figura 8). A ativação de VEGFR-1 está envolvida no

recrutamento e regulação de monócitos e na migração de macrófagos (Sawano e col., 2001). O VEGFR-2 é o receptor predominante nas células endoteliais, mediando a sinalização do VEGF que induzirá a angiogênese (Kowanetz e Ferrara, 2006). O VEGFR-3 tem um papel importante na linfangiogênese fisiológica e patológica e também está envolvido na progressão do tumor (Su e col., 2007; Rauniyar e col., 2018). A ativação do VEGFR-1 por VEGF-A ou PlGF promove angiogênese patológica, como angiogênese tumoral e promove o recrutamento de TAMs que, por conseguinte, contribuem na produção de citocinas (Hiratsuka e col., 2001). Muitas citocinas e fatores de crescimento podem aumentar a expressão do mRNA de VEGF ou induzir a liberação de VEGF. Dentre estes, identifica-se o PDGF, TNF- α , FGF (fator de crescimento de fibroblasto), EGF (fator de crescimento epitelial), TGF- β e o IGF-1 (fator de crescimento de insulina-1) (Brogi e col., 1994).

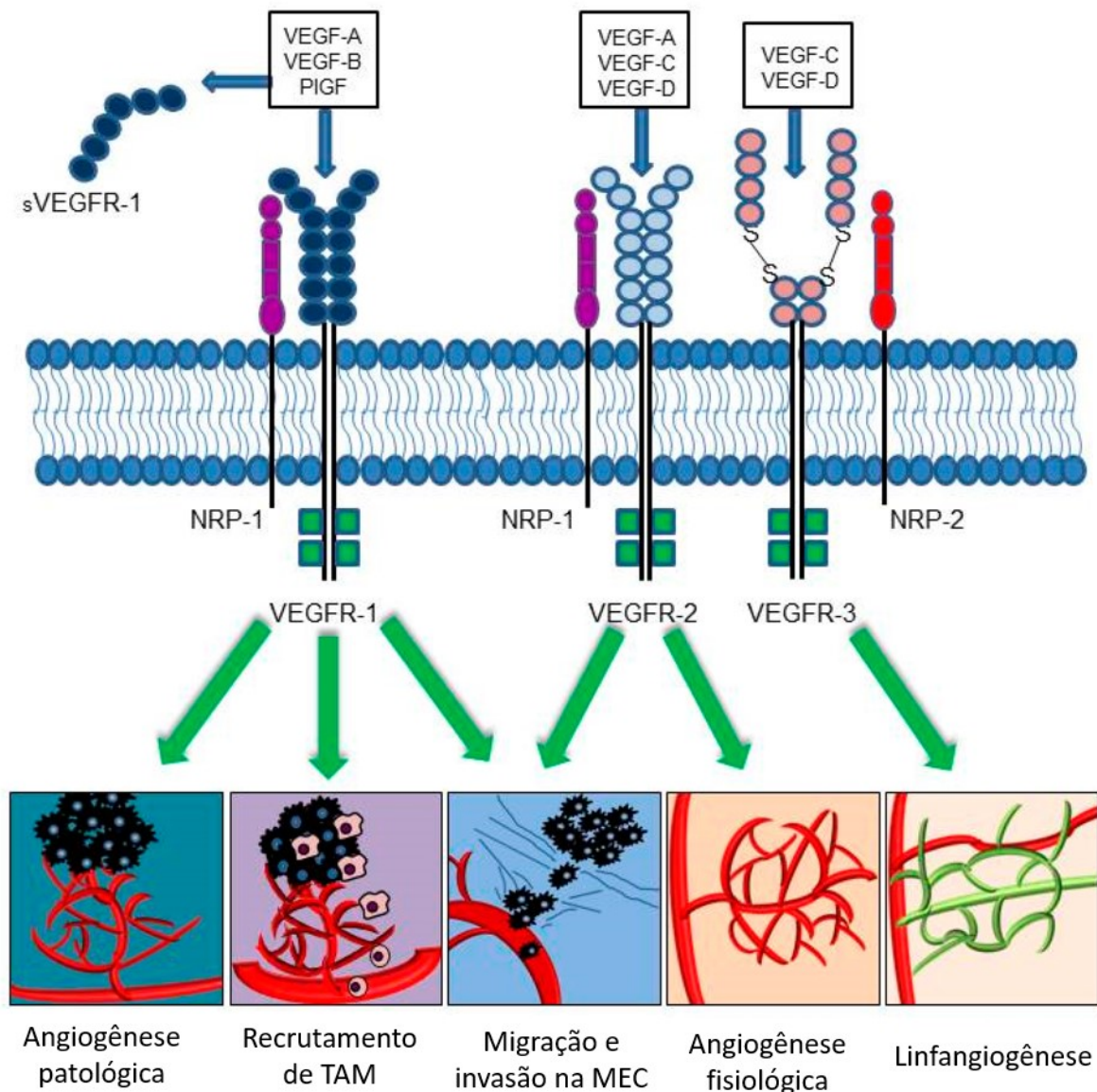
Tanto o PlGF quanto o VEGF-A são capazes de mobilizar células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea que expressam o VEGFR-1. Durante a angiogênese, estes progenitores proliferam e se mobilizam para a corrente sanguínea e, juntamente com células progenitoras endoteliais positivas para VEGFR-2, contribuem para o crescimento e vascularização dos tumores primários (Lyden e col., 2001; Hattori e col., 2002). Além de gerar TAMs que favorecem o crescimento tumoral, invasividade e escape imunológico, esses progenitores hematopoiéticos derivados da medula óssea estão localizados em sítios pré-metastáticos específicos, formando aglomerados que alteram microambiente e atraem as células tumorais levando a formação de lesões metastáticas (Chen e col., 2017). Além disso, vários fatores derivados dos TAMs, como TGF- β , VEGF-A, fator 1 derivado de células estromais (SDF-1) e MMP-9 contribuem no nicho pré-metastático e na metástase para a mobilização de células mielóides VEGFR-1 positivas (Kaplan e col., 2005; Chen e col., 2017). A ativação do VEGFR-1 em monócitos e em macrófagos leva à produção de fatores angiogênicos como o VEGF-A, FGF, PlGF e MMPs (MMP-9, MMP-3) que aumentam a invasão das células tumorais e a formação de metástases (Hiratsuka e col., 2002; Rolny e col., 2011; Zhou e col., 2015; Li e col., 2015; Lacal e Graziani, 2018).

O VEGFR-1 está altamente expresso em TAMs e nos macrófagos associados a metástases (MAMs) ambos com perfil *M2-like* (Jetten e col., 2014). Em modelos de metástase pulmonar de câncer de mama, os TAMs expressam exclusivamente VEGFR-1 sendo este um fator crítico para a metástase, regulando um conjunto de

genes relacionados à resposta inflamatória, incluindo o CSF-1 (Qian e col., 2015).

A resistência dos tumores às atuais terapias anti-VEGF é frequentemente associada a uma alta infiltração de células mielóides (Casazza e col., 2013). Evidências pré-clínicas sugerem que a hipóxia resultante da destruição do leito vascular, como consequência do tratamento anti-angiogênico, desencadeia o recrutamento compensatório de células mielóides que vão promover a angiogênese através de mecanismos alternativos (Murdoch e col., 2008; De Palma e Lewis 2013; Mantovani e Allavena, 2015).

Figura 8 - Membros da família do VEGF e seus receptores



Legenda: A sinalização pro-angiogênica de VEGF-A é mediada por meio da interação com VEGFR-2 ou VEGFR-1. A forma solúvel de VEGFR-1 (sVEGFR-1) funciona como um receptor, evitando a ativação do receptor de membrana. O VEGF-B e o PIGF se ligam apenas ao VEGFR-1, desempenhando um papel fundamental na angiogênese patológica e na inflamação. Além disso, a ativação do VEGFR-1 contribui para o recrutamento de macrófagos associados ao tumor (TAMs) e escape imunológico do câncer. A ativação de VEGFR-1 e VEGFR-2 em células tumorais estimula diretamente a migração e a invasão da matriz extracelular (ECM). O VEGF-C e o VEGF-D ativam principalmente o VEGFR-3, que é necessário para o desenvolvimento e a linfangiogênese patológica.

Fonte: Adaptado de Ceci e col., 2020.

Lipoxinas

As lipoxinas (LX), mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico (AA), são eicosanóides gerados a partir de interações entre leucócitos pela indução de vias biossintéticas transcelulares durante respostas multicelulares, tais como inflamação, aterosclerose e trombose (Serhan e col., 1984). Esses mediadores são biossintetizados tanto *in vitro* como *in vivo*, em diferentes espécies, pela ação sequencial das lipoxigenases (LOX) e de outras enzimas (Godson e col., 2000). As LX foram os primeiros mediadores reconhecidos com atividade anti-inflamatória e pró-resolutiva, podendo também inibir a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Wu e col., 2005, Bonnans e col., 2007). Nos mamíferos, as lipoxigenases (LOXs) produzem dois principais produtos, as lipoxinas A4 (LXA4) e B4 (LXB4) (Zhang e col., 2018).

A síntese de LXA4 é induzida por três principais vias sintéticas. A primeira via de biossíntese descoberta envolve a cooperação entre células epiteliais, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares (PMN). As enzimas envolvidas são a 15-LO encontrada em células epiteliais, monócitos e macrófagos, e a 5-LO, encontrada em PMN. O ácido araquidônico é inicialmente oxigenado por 15-LO para produzir 15S-15S (ácido hidroxitetraenóico-HETE). Este é convertido pela 5-LO para um 5S, 6S, 15S-epoxytetraeno intermediário, que será enzimaticamente transformado em LXA4 e LXB4. Alternativamente, o LTA4 pode ser convertido pela 15-LO para o 5S, 6S, 15S-epoxytetraene e, em seguida, para LX (Serhan e col., 1995). Outra via de biossíntese de LX é determinada por interações que ocorrem, predominantemente, dentro da vasculatura, entre a 5-LO e a 12-LO presente em plaquetas (Edenius e col., 1988). Através da síntese de LTA4 a partir da degradação do ácido araquidônico pela 5-LO, o LTA4 formado é então convertido em LXA4 e LXB4 pela ação da 12-LO plaquetária (Serhan e Sheppard, 1990).

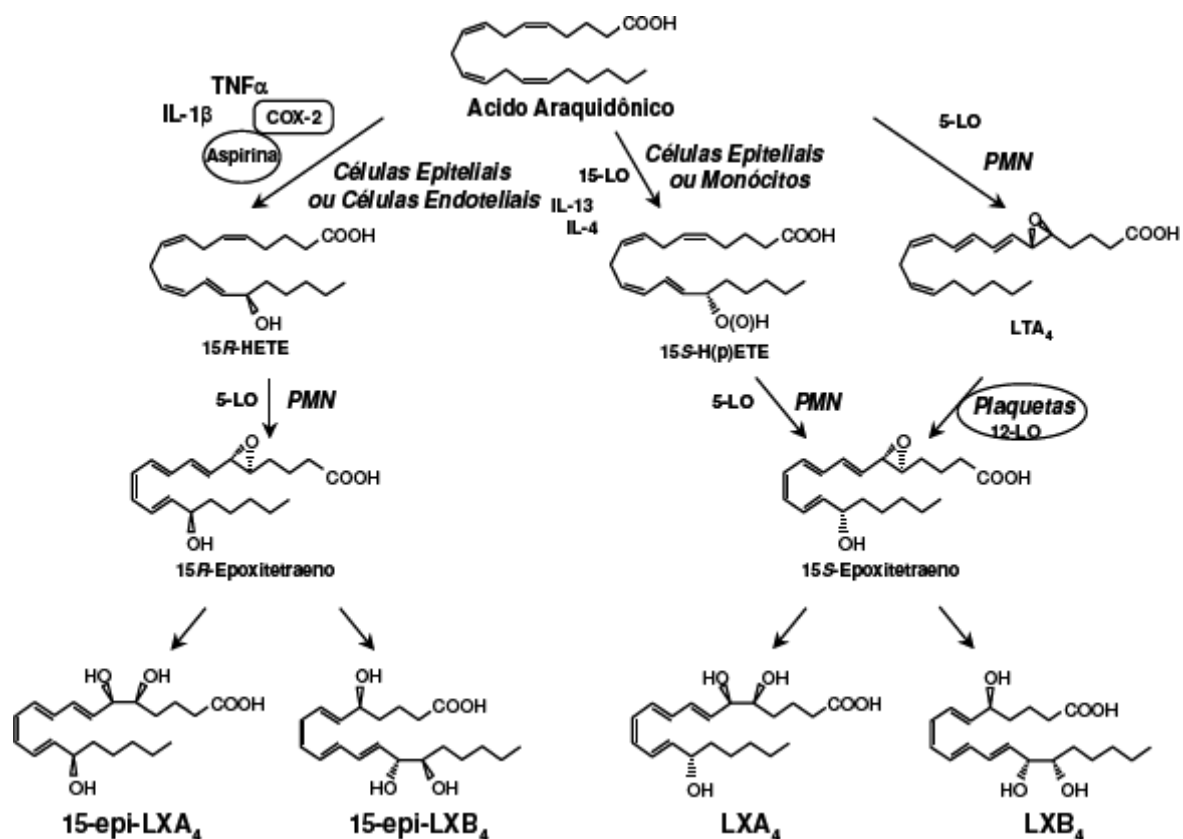
Uma terceira via de geração de LX foi descoberta posteriormente e envolve a participação da Aspirina®, produzindo uma classe adicional de LX, denominada 15-epi-LX. Elas são geradas pela acetilação da ciclooxigenase-2 (COX-2) pela Aspirina®. A COX-2 acetilada metaboliza o ácido araquidônico a 15R-HETE ao invés de gerar prostanóides. O 15R-HETE é então retomado por PMN e convertido em 15R-LXA4, também denominado ATL (*aspirin-triggered lipoxin*), e 15R-LXB4 por uma reação

catalisada pela 5-LO (Claria e Serhan, 1995; Romano e col., 2006). Os ATLs possuem as mesmas ações que as LX, porém são mais estáveis, exibindo atividade catalítica reduzida para inativação da enzima e possuindo assim uma ação mais prolongada (Serhan e col., 2008) (Figura 9).

A LXA₄ e os ATLs atuam principalmente em um receptor acoplado à proteína G (GPCR) pertencente à família dos receptores FPR (formylpeptide receptor), que têm papel relevante na resposta imune e na inflamação. Há três receptores FPR descritos em humanos: FPR1, FPR2/ALX e FPR3 (Ye e col., 2009; Dufton e Perreti, 2010). O FPR2/ALX é o receptor ao qual a LX e o ATL se ligam com maior afinidade e está expresso em diversos tecidos, como o baço, pulmão e também em distintos tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos e microglia. Uma vez ativado, o FPR2/ALX é capaz de disparar vias de sinalização específicas para cada tipo celular (Chiang e col., 2006). As lipoxinas também interagem com outros receptores, como receptor L acoplado à proteína 32 (GPR 32), o receptor de Aril-hidrocarbonetos, o receptor de estrogênio, tendo também alta afinidade ao receptor de cisteil-leucotrieno (Schaldach e col., 1999; Gronert e col., 2001; Russell e col., 2011; Chandrasekharan e col., 2015).

A internalização do receptor ALX/FPR2 após a estimulação com LX ocorre de maneira tempo-dependente. Os receptores ALX/FPR2 encontram-se, predominantemente, na superfície celular e após 5 minutos de estimulação com a LX apresentam-se tanto na face externa como na face interna da membrana plasmática. Após 15 minutos de estimulação, o ALX/FPR2 é encontrado no endossomo e, subsequentemente, no compartimento do endossomo-lisossoma. Após 120 minutos a expressão do receptor na superfície é reestabelecida (Mitchell e col., 2002; Maderna e col., 2010; Chandrasekharan e col., 2015).

Figura 9 - Biossíntese das Lipoxinas e “aspirin-triggered-lipoxins” (ATL)



Legenda: As três vias de síntese das lipoxinas a partir do ácido araquidônico.

Fonte: Adaptada de Fierro e Serhan, 2001.

Efeito biológico das lipoxinas

As respostas biológicas à LXs incluem a inibição da proliferação de células endoteliais vasculares, quimiotaxia de neutrófilos, ativação de monócitos e macrófagos e promoção de proliferação de linfócitos B (Baker e col., 2009; Zhang e col., 2019).

A lipoxina possui um papel na regulação da apoptose em diferentes tipos celulares. O tratamento com a lipoxina em leucócitos é capaz de diminuir a produção de peróxido de nitrito e reduzir a apoptose dessas células (Goh e col., 2001; Zhang e col., 2019). Além disso, a lipoxina induz a migração e aumenta a sobrevivência de monócitos humanos, reduzindo a apoptose a partir da regulação de vias de

sinalização clássicas como ERK e AKT (Simões e Fierro, 2005, Simões e col., 2010) (figura 10).

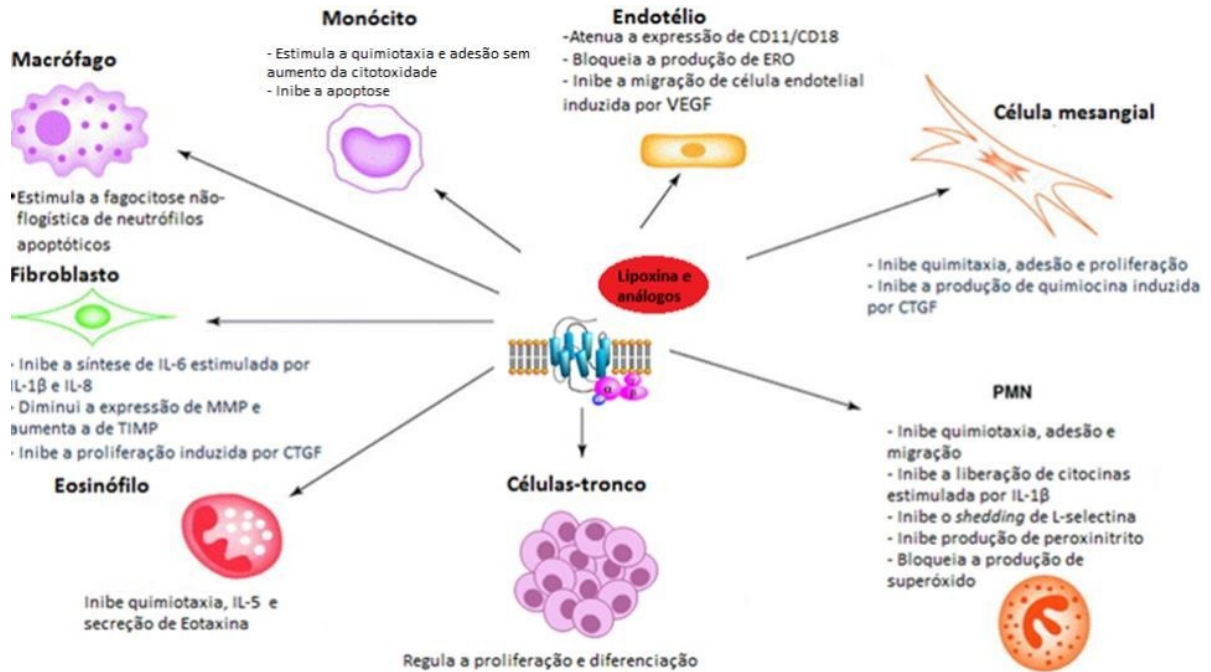
Estudos indicam que as LX e seus análogos têm efeitos inibitórios na angiogênese induzida por VEGF nas células endoteliais (Fierro e col., 2002; Cezar-de-Mello e col., 2008). Também foi relatado que a LX inibe a adesão, a atividade de MMP-9 e a proliferação de células endoteliais, presumivelmente através da *down* regulação de VEGFR2 pela SHP-1, uma vez que promoveu a associação desta fosfatase com o VEGFR-2 (Cezar-de-Mello e col., 2008)

Os estudos desenvolvidos pelo nosso grupo vem demonstrando o papel antitumoral da LX, destacando especialmente seu papel seletivo sobre TAMs. Mostramos que a lipoxina reduz, seletivamente, nos TAMs, a expressão de marcadores M2, como MRC1, CD163, IL-10 e a relação iNOS/Arginase-1, sem afetar a expressão destes marcadores em macrófagos M2 clássicos (estimulados com IL-4). Além disso, os dados obtidos no tratamento com lipoxina demonstrou o aumento da produção de NO e ROS e a apoptose das células tumorais de melanoma humano. Os resultados desse estudo mostra um efeito inédito da lipoxina, que induz nos TAMs uma mudança de um perfil *M2-like* para um tipo *M1-like*, desencadeando assim a apoptose de células tumorais e modulando negativamente a progressão do tumor (Simões e col., 2017).

Além disso, resultados obtidos em modelos *in vivo* de melanoma murino, observamos que a lipoxina inibe a progressão tumoral, acompanhada por reversão significativa no perfil dos TAMs na massa tumoral e diminuição da angiogênese (Simões e col 2017, De-Brito e col., 2019). A lipoxina diminuiu a população de monócitos LyC6^{hi}, que dão origem aos TAMs, em diferentes ambientes, como no sangue, baço e medula óssea, reduzindo, assim, a infiltração de macrófagos no tumor. Esses efeitos foram acompanhados de uma melhora da sobrevivência dos camundongos e da diminuição do desenvolvimento do tumor (De-Brito e col., 2019).

Como as LXs podem atuar de diferentes formas na resolução da inflamação, na inibição da angiogênese e da progressão tumoral, esses dados preliminares sugerem as LXs como potencial ferramenta terapêutica a ser combinada com outros medicamentos antitumorais no tratamento do câncer. Nesse contexto, a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na polarização de TAMs, bem como a regulação destes mecanismos pela LX podem se tornar importantes alvos no controle da progressão tumoral.

Figura 10 - Lipoxinas e seus efeitos



Legenda: Efeitos das LXs nas principais células do sistema imune.

Fonte: Adaptado de McMahon e col., 200

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na polarização de macrófagos associados ao tumor, bem como o efeito da lipoxina na modulação destes mecanismos.

1.2 Objetivos específicos

- a) Analisar as vias de sinalização envolvidas na polarização de TAMs, investigando:
 - a via MAPK/ERK
 - a via PI3K/AKT
 - o fator de transcrição STAT-3.
- b) Investigar o efeito do VEGF na polarização de TAMs;
- c) Investigar o envolvimento da fosfatase SHP1;
- d) Investigar o papel da lipoxina na modulação destes mecanismos moleculares.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais e protocolos

a) **DMEM incompleto (1 Litro)**

3,7 g/L de NaHCO₃,
5,2 g/L de HEPES;
60 mg/L de penicilina;
100 mg/L de estreptomicina;
Água destilada q.s.p.;
Ajustar pH para 7,2

b) **DMEM completo**

DMEM Incompleto;
10% de SFB (Cultilab);
Ajustar pH para 7,2.

c) **RPMI incompleto (1 Litro)**

10,4 g de RPMI-1640 (Invitrogen);
2,0 g de NaHCO₃;
5,2 g de HEPES;
Penicilina 10⁴ U/mL (10 mL);
Estreptomicina 10 mg/mL (10 mL);
Água Mili-Q q.s.p.;
Ajustar pH para 7,2.

d) **RPMI completo**

RPM incompleto;
Soro fetal bovino 10%
Ajustar pH para 7,2.

e) **PBS (Phosphate Buffered Saline) (1 Litro) – 20X concentrado**

3 M – 175 g de NaCl;
0,2 M – 27,6 g de NaH₂PO₄;
Água destilada q.s.p;
Ajustar pH para 7,2.

f) **Base Salina 10% (200 mL)**

16 g de NaCl; 0,4 g de KCl; 0,4 de KH₂PO₄;
4 g de Na₂HPO₄·12H₂O;
Água destilada q.s.p.

g) **Tripsina 0,15%**

EDTA 0,1% (500 mL)
0,05 g de EDTA;
0,02 g de Vermelho de fenol; 0,5 g de Tripsina (Sigma);
50 mL de Base salina 10%; Água Mili-Q q.s.p.

h) **EDTA 5%**

5% de EDTA;
PBS estéril q.s.p.

i) **Hank's (1 Litro)**

0,4 g de HCl;
0,06 g de Fosfato de potássio monobásico;
8,0 g de NaCl;
0,121 g de Fosfato de sódio dibásico;
1,0 g de D-glicose;
0,011 g de Vermelho de fenol;
0,35 g de Bicarbonato de sódio;
Água Mili-Q q.s.p.;
Ajustar pH para 7,2.

j) **Hank's10x concentrado (100 mL)**

0,4 g de HCl;

0,06 g de Fosfato de potássio monobásico;

8,0 g de NaCl;

0,121 g de Fosfato de sódio dibásico; 1,0 g de D-glicose;

0,011 g de Vermelho de fenol;

0,35 g de Bicarbonato de sódio;

Água Mili-Qq.s.p.;

Ajustar pH para 7,2.

k) **Hank's EDTA (100 mL)**

HBSS 1x q.s.p.; 0,146 g de EDTA;

Ajustar pH para 7,4.

l) **Solução de Turk (100mL)**

Cristal violeta (Merck) - q.s.p.;

2 mL de Ácido acético glacial 2% (Merck)

Água Mili-Qq.s.p.

m) **Solução para Citometria de Fluxo (100 mL)**

2,0 g de BSA; 5mL de SFB;

0,1 g de Ázida Sódica;

PBS q.s.p.

n) **Acrilamida 30% (100 mL)**

30 g de Acrilamida (GE);

Água destilada q.s.p.

o) **Persulfato de Amônio (APS) 10% (1 mL)**

100 mg de APS (GE);

Água destilada q.s.p.

p) Bis-Acrilamida 1,6% (50 mL)

0,8 g de Bis-acrilamida (GE);

Água destilada q.s.p.

q) Tampão do gel de separação pH 8,8 (200 mL)

36,33 g de Tris (GE) 1,5 M;

8,0 mL de SDS (GE) 0,4%;

Água destilada q.s.p.

r) Tampão do gel de entrada pH 6,8 (100 mL)

Tris (GE) 0,5 M - 6,05 g;

SDS (GE) 0,4% - 4,0 mL SDS 10%;

água destilada q.s.p.

s) SDS 10% (100mL)

SDS (GE) – 10 g;

Água destilada q.s.p.

t) Tampão de corrida 10x (500 mL)

7,57 g de Tris (GE) 0,125 M;

72,1 g Glicina (GE) 1,92 M;

50 ml SDS (GE) 10%;

Água destilada q.s.p.

u) Tampão de transferência (3 Litros)

17,4 g de Tris (GE) 48 mM;

8,76 g de Glicina (GE) 39 mM;

Água destilada q.s.p.

v) T-PBS (100 mL)

50 mL de Tween–20 (GE) 0,05%;

PBS q.s.p.

w) **Vermelho de Ponceau (10 mL)**

20 mg de Ponceau Rouge 0,2%;
300 mg Ácido Tricloroacético 3%;
Água destilada q.s.p.

x) **Gel de poliacrilamida**

Gel de Separação	8%	10%	12%	15%
Tampão				
	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Acrilamida 30%	2,12 mL	2,65 mL	3,18 mL	3,98 mL
Bis-Acrilamida 1,6%	1,06 mL	1,33 mL	1,59 mL	1,99 mL
Água Destilada	2,82 mL	2,03 mL	1,23 mL	30 µL
Aps 10%	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

y) **Gel de entrada 3%**

337,5 µL de Acrilamida, 22,2% Bis-acrilamida, 1,6%; 375 µL de Tris-HCl;
1,82 µL de Água Mili Q; 25 µL de SDS 10%;
50 µL de APS 10%;
50 µL de TEMED.

z) **Tampão de Lise**

Triton X-100 1%; Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM;
EGTA 2 mM;
Ortovanadato 10 µL/mL;
Coquetel de inibidores 1µL/mL (10 µg/µL de aprotinina, 10 µg/µL de leupeptina, 2 µg/µL de pepstatina e 1 mM de PMSF)
DNase 1 µL/mL;
Ajustar o pH para 7,4 ao adicionar o Tris-HCl.

aa) Tampão de Amostra (5X)

Tris-HCl 50 mM, pH 6,8;
SDS 1%;
 β -mercaptoetanol 5%;
Glicerol 10%;
Azul de bromofenol 0,001%;
Água destilada q.s.p.

2.2 Metodologia**2.2.1 Linhagens celulares**

Nos experimentos *in vitro*, foram utilizadas a linhagem celular de melanoma humano MV3, uma linhagem celular de melanoma humano com alto potencial metastático (Van Muijen e col., 1991), doada pelo Dr. Cezary Marcienkevickz (Temple University PA, EUA) e a linhagem de melanócitos human NGM (N° 0190; tecido: epitélio; órgão: pele; tipo: melanócito; patologia: Nevo) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ, Brasil).

2.2.2 Cultura de Células

As células NGM e MV3 foram cultivadas em meio de cultura DMEM completo (Gibco Invitrogen Corporation), mantidas em cultura a 5% de CO₂ e a temperatura constante à 37°C. Quando confluentes a cada 2 ou 3 dias, o meio de cultura foi renovado e/ou as células foram repassadas. Foi utilizada a solução Hank's EDTA (5 nM) para soltar as células MV3 da garrafa de cultura. Nas células NGM foi utilizada a tripsina para soltar as células, seguido pela inativação da reação com DMEM completo. As células foram centrifugadas a 1.200 rpm durante 10 minutos. O número

de células presentes na suspensão celular foi determinado por contagem na câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por Azul de Tripán (Gibco Invitrogen Corporation) 0,2% em PBS.

2.2.3 Obtenção do meio condicionado da MV3

A cultura de células MV3 foi mantida como descrito anteriormente. Após três dias as células apresentaram confluência o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 1.200 rpm e armazenado no freezer a -80 °C até o uso. O meio condicionado (M.C.MV3) foi adicionado ao experimento utilizando a diluição 1:1 sempre mantendo a mesma concentração de SFB dos demais grupos experimentais.

2.2.4 Obtenção de Macrófagos Humanos

A obtenção de macrófagos humanos foi feita segundo o protocolo descrito por Simões e colaboradores (2017). Os monócitos humanos foram obtidos a partir de sangue periférico de doadores saudáveis, em EDTA 5% (20:1). Após isso, o sangue foi adicionado sobre o Ficoll-Hypaque® (1:1) e centrifugado durante 40 minutos (400 x g/25°C acc/dcc 2). A camada de células mononucleares foi coletada, lavada com solução salina e ressuspendida em RPMI-1640 incompleto e cultivadas em placas de 24 poços. O número de células presentes na suspensão celular foi determinado por contagem na câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas e incubadas por 40 minutos a 37 °C. O sobrenadante, contendo linfócitos e plaquetas, foi retirado e suplementado com RPMI 10% de SFB (RPMI completo) e foi adicionado à cultura. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por Azul de Tripán (0,2% em PBS). Os monócitos foram mantidos em cultura durante sete dias com RPMI 10% SFB para a diferenciação em macrófagos, com troca do meio de cultura a cada dois dias.

Para obtenção dos fenótipos específicos, os macrófagos não estimulados (MØ)

foram tratados durante 72 horas com LPS (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) + IFN- γ (100 ng/mL), para obtenção do fenótipo M1 e com IL-4 (40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para indução do fenótipo M2.

2.2.5 Obtenção de TAMs

Para a obtenção dos TAMs, os macrófagos M \emptyset foram incubados com meio condicionado derivado de diferentes concentrações de células MV3 (de 3; 5 ou 10×10^4 células/ poço) cultivadas por 24 horas ou 72 horas. Os macrófagos incubados com o meio condicionado nessas condições tiveram seu perfil fenotípico analisado por citometria de fluxo, utilizando marcadores específicos M1 (CD86) e M2 (CD206-PE e CD163-APC). A obtenção de TAMs em todos os experimentos foi realizada conforme já demonstrado em outros trabalhos do nosso grupo, o meio condicionado proveniente da cultura de células de melanoma humano MV3 (3×10^4 células por poço) durante 72 horas induz um aumento na expressão de marcadores M2, como CD206 (70,4%) e CD163 (37%) quando comparamos com o fenótipo M1 (figura 21).

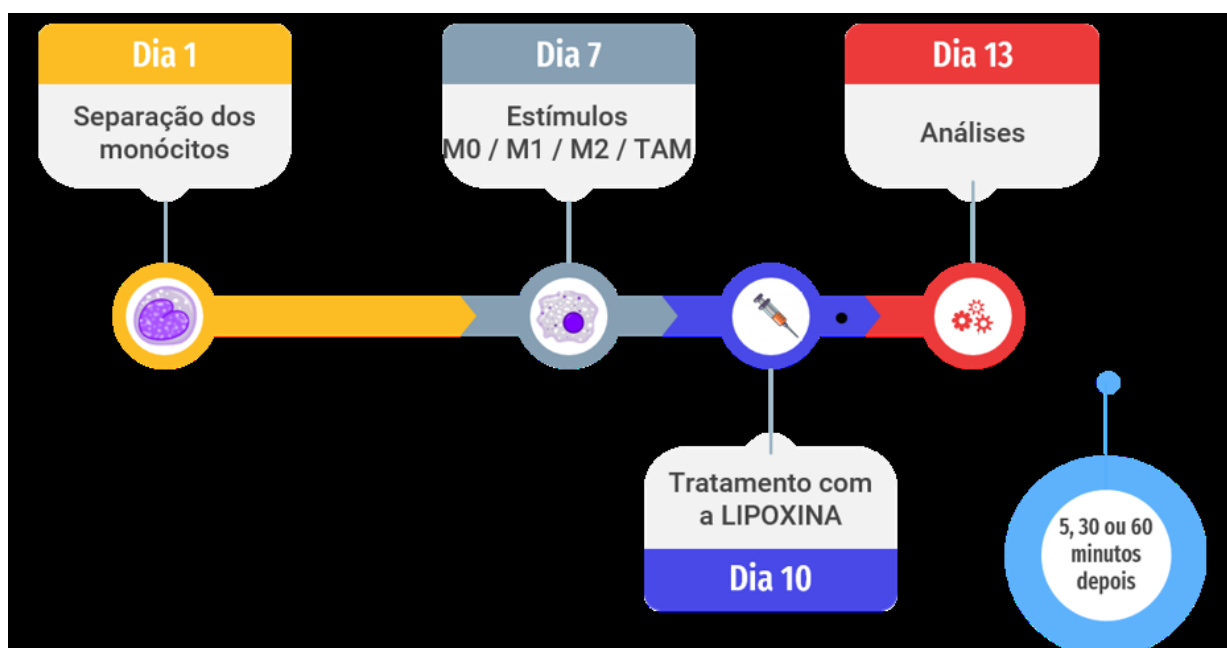
2.2.6 Tratamento com a Lipoxina

Macrófagos com diferentes fenótipos (M \emptyset , M1, M2 e TAMs) foram tratados com 15-epi-LXA $_4$ (LX; 10 nM, ATL – Cayman Chemical), e cultivados em RPMI incompleto por diferentes períodos de tempo em estufa à 5% de CO $_2$ e temperatura constante de 37°C. Em experimentos com períodos longos de tratamento com a LX, utilizamos o protocolo de tratamento descrito por Simões e colaboradores (2017), em que os macrófagos polarizados (ou não) nos diferentes fenótipos (M \emptyset , M1, M2 e TAM) foram tratados com a LX em RPMI incompleto por 15 minutos para interação da LX com as células e, após este tempo, foi adicionado SFB (10%) ao meio de cultura por 72 horas adicionais em estufa à 5% de CO $_2$ e temperatura constante de 37°C.

Também utilizamos tempos de incubação com a LX mais curtos como 5, 30 e 60 minutos. Nestes casos os diferentes tipos de macrófagos (M \emptyset , M1, M2 e TAM)

foram tratados com a LX por 5, 30 e 60 minutos com RPMI incompleto e após esse tempo as análises foram realizadas (figura 11).

Figura 11 - Obtenção do Meio Condicionado



Fonte: A autora, 2021.

Legenda: Modelo experimental da separação de monócitos até a análise dos resultados.

2.2.7 Citometria de Fluxo

Para análise do perfil fenotípico, os macrófagos humanos polarizados como descrito acima foram retirados da placa por raspagem e ressuspensos em tampão para citometria. Após o bloqueio por 20 minutos no tampão, os macrófagos foram marcados com anticorpos específicos CD80-PE e CD86-APC para fenótipo M1 e CD206-PE e CD163-APC para o fenótipo M2, de acordo com as especificações do fabricante (*Biolegend*). Em todos os procedimentos, o isotipo controle recomendado foi utilizado.

2.2.8 Western Blotting

Após os diferentes tratamentos, as células foram lisadas em tampão de lise RIPA e a quantidade de proteína presente no lisado celular foi determinada pelo método de BCA (*ThermoScientific*®). Posteriormente, foi adicionado 20% de tampão de amostra 5 vezes concentrado a cada amostra, sendo estas então fervidas por 5 minutos para sua desnaturação.

As amostras foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE) durante 90 minutos a 200 V, onde são separadas de acordo com o peso molecular. As proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF ou nitrocelulose e bloqueadas por 45 minutos com solução de BSA 5% em TBS- Tween 0,1% (T-TBS)- para evitar ligações inespecíficas. As membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C para marcação das proteínas alvo , com anticorpo primário específico (AKT 1:1000; ACTINA 1:100; ERK1/21:100; SHP-1 1:1000; STAT3 1:1000; pAKT 1:500; pSTAT3 1:500; pVEGFR1 1:1000, VEGFR1 1:1000). Após 3 lavagens consecutivas de 5 minutos com T-TBS, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados à peroxidase (1:10.000) por 1 hora. As proteínas reativas às marcações foram determinadas por um kit de quimiluminescência (*kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent- GE Healthcare*) e as marcações foram visualizadas através do aparelho *ChemiDoc* (BioRAD). As bandas foram quantificadas usando o programa *ImageJ* versão 1.8.0_172 (NIH/USA).

2.2.9 Multiplex

A quantidade de VEGF liberado pelas células NGM, MV3, macrófagos e TAMs foi avaliada através de um *Multiplex* utilizando um kit comercial (*BioPlex ExP Hy Cyto GrP1 6-plex, BioRad*). As dosagens seguiram as instruções do fabricante. O sobrenadante foi coletado de culturas de células NGM, MV3, macrófagos e TAMs, tratados ou não com lipoxina em diferentes concentrações.

2.2.10 Análise estatística

Os resultados obtidos são expressos como média e erro padrão. Os dados foram analisados por teste *t de Student* ou *anova one way*, com auxílio do programa *GraphPadPrism 6* para Windows, do Microsoft Excel 2007 e foram consideradas significativas diferenças cujo $p \leq 0,05$.

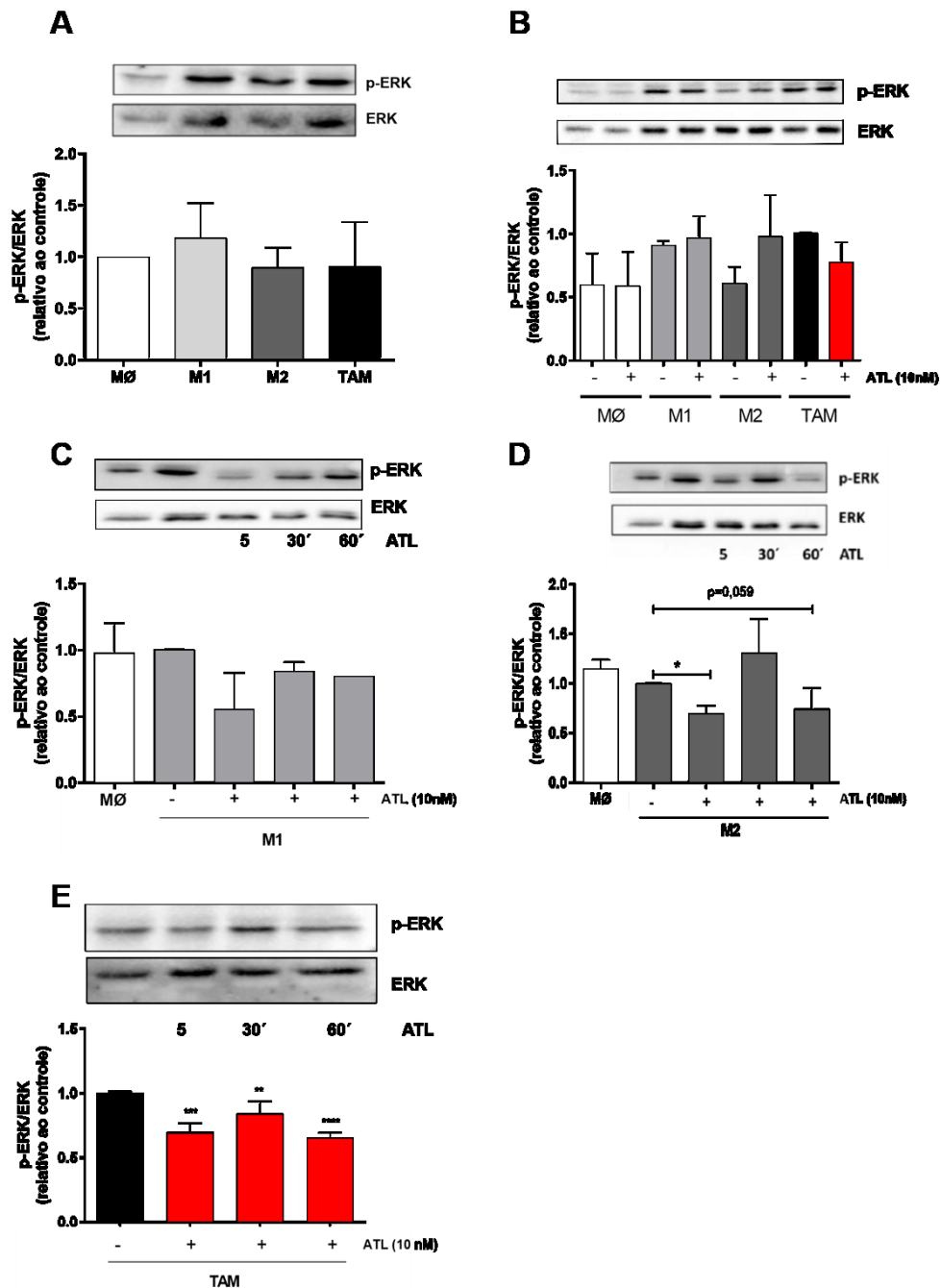
3 RESULTADOS

3.1 Envolvimento da via da MAPK-ERK 1/2 no efeito da lipoxina

A ativação de ERK está envolvida em diferentes eventos celulares relacionados à progressão tumoral. Dados anteriores do nosso grupo descreveram que o papel citoprotetor da lipoxina sobre monócitos se dá através da ativação de ERK (Simões e col., 2010). Nos resultados mostrados na figura 12A, observamos que os níveis basais de fosforilação da ERK não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes fenótipos de macrófagos. Investigamos então, o efeito do tratamento por 72 horas com lipoxina sobre a ativação de ERK, através da análise da fosforilação, nos diferentes fenótipos de macrófagos (M1, M2 e TAM). A Figura 12B mostra que, nestas condições, o tratamento com lipoxina não induziu diferenças estatisticamente significativas no perfil de fosforilação da ERK dos macrófagos, MØ, M1, M2 ou TAM (figura 12B).

Uma vez que a lipoxina poderia estar regulando a ativação de ERK em tempos mais curtos de tratamento, os macrófagos polarizados para os diferentes fenótipos foram tratados com lipoxina por 5, 30 e 60 minutos. Observamos em macrófagos do tipo M1 que a lipoxina não alterou significativamente a fosforilação de ERK nessas células nos tempos estudados (figura 12C). Contudo, no fenótipo M2, o tratamento com lipoxina diminuiu a fosforilação de ERK após 5 minutos de tratamento com a lipoxina (figura 12D), que aparentemente retorna aos níveis basais após 30 minutos. Para os TAMs, conforme demonstrado na figura 12E, a lipoxina diminuiu os níveis de fosforilação de ERK em 5, 30 e 60 minutos em TAMs. Estes resultados sugerem que, diferentemente de macrófagos M1, a lipoxina parece agir de maneira seletiva em macrófagos que apresentam fenótipo M2, como os tratados com IL-4 e os TAMs, reduzindo a sinalização da via MAPK/ERK1/2 nessas células.

Figura 12 - Envolvimento da ERK no efeito da lipoxina em macrófagos



Legenda: Monócitos foram cultivados em placa de 24 poços (10⁶ cels/poço) durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, os macrófagos foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN-γ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM). Após 72 horas, os macrófagos foram tratadas ou não com ATL (10 nM) por 5, 30, 60 minutos ou por mais 72 horas. Após os períodos de tratamento os macrófagos foram lisados e a expressão proteica de p-ERK/ERK foi analisada através de *WesternBlotting*. A-fosforilação de ERK em 72 horas de polarização; B – fosforilação de ERK após 72 horas de tratamento com a lipoxina; C-E, fosforilação de ERK após 5-60 minutos de tratamento com a lipoxina. Resultados são expressos como média ± EP de 3 experimentos realizados separadamente.

Nota: *, $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ **** $p \leq 0,0001$

Fonte: A autora, 2021.

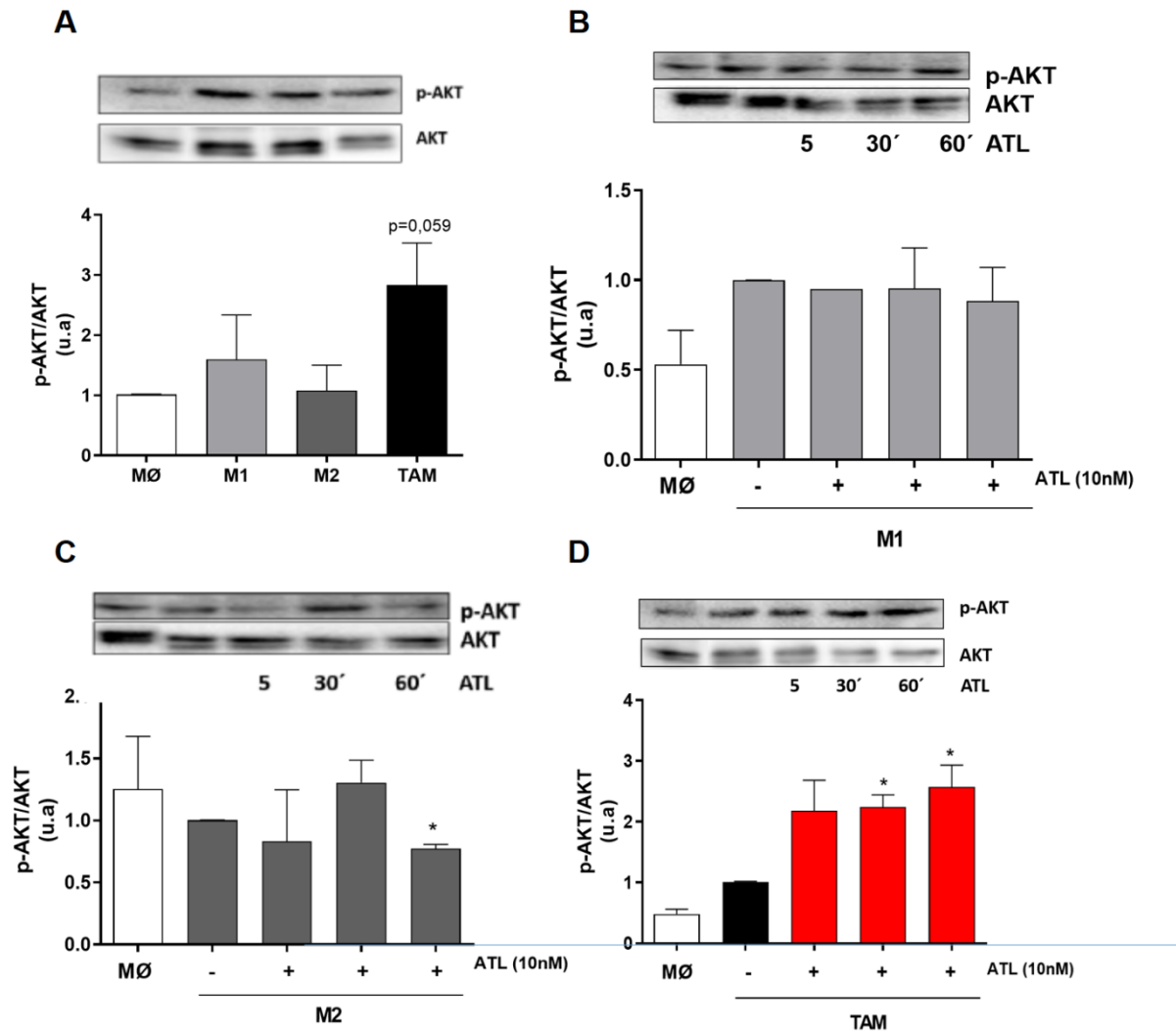
3.2 Envolvimento da AKT no efeito da lipoxina em macrófagos

Assim como a via MAPK/ERK, a ativação da via da PI3k/AKT está envolvida em diferentes eventos celulares relacionados ao desenvolvimento tumoral (Bellacosa e col., 1993; Datta e col., 1999; Revathidevi e Munirajan, 2019). A figura 13A mostra que não há diferença nos níveis de fosforilação da AKT em macrófagos M1 ($p=0,4$) e M2 (após o tempo da polarização de 3 dias). No entanto, observa-se nos TAMs uma tendência de aumento na fosforilação da AKT (não estatisticamente significativo: $p=0,059$), quando comparado ao MØ, sugerindo uma maior ativação basal da via PI3K/AKT nessas células (após a polarização).

Na análise da ativação de AKT em tempos mais curtos de tratamento com a lipoxina, a incubação por 5, 30 e 60 minutos não alterou a fosforilação de AKT nos macrófagos M1, quando comparados ao controle M1 (Figura 13B). Nos macrófagos com perfil M2, a lipoxina diminuiu a fosforilação de AKT após 60 minutos de incubação quando comparados aos macrófagos M2 sem tratamento com a lipoxina (figura 13C). De maneira inversa, nos TAMs, o tratamento com a lipoxina aumentou a fosforilação de AKT após 30 e 60 minutos de tratamento quando comparado ao MØ e TAMs não tratados com a lipoxina (figura 13D).

Estes resultados indicam uma modulação diferencial da sinalização da AKT em resposta à lipoxina, dentre os diferentes fenótipos de macrófagos. Os TAMs, apesar de apresentarem um perfil M2, respondem à lipoxina de forma diferente dos macrófagos M2 ativados por IL-4.

Figura 13 - Envolvimento da AKT no efeito da lipoxina em macrófagos



Legenda: Monócitos foram cultivados em placa de 24 poços (10^6 cels/poço) durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, os macrófagos foram estimuladas com LPS (1 μ g/mL) + IFN- γ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM). Após 72 horas, os macrófagos foram tratadas ou não com ATL (10nM) por 5, 30, 60 minutos. Após os períodos de tratamento os macrófagos foram lisados e a expressão proteica de p-AKT/AKT foi analisada através de *WesternBlotting* A- fosforilação de ERK após 72 horas de polarização; B-D, fosforilação de ERK após tratamento com a lipoxina (5-60min). Resultados são expressos como média \pm EP de três experimentos realizados separadamente.

Nota: *, $p \leq 0,05$ quando comparado ao respectivo controle.

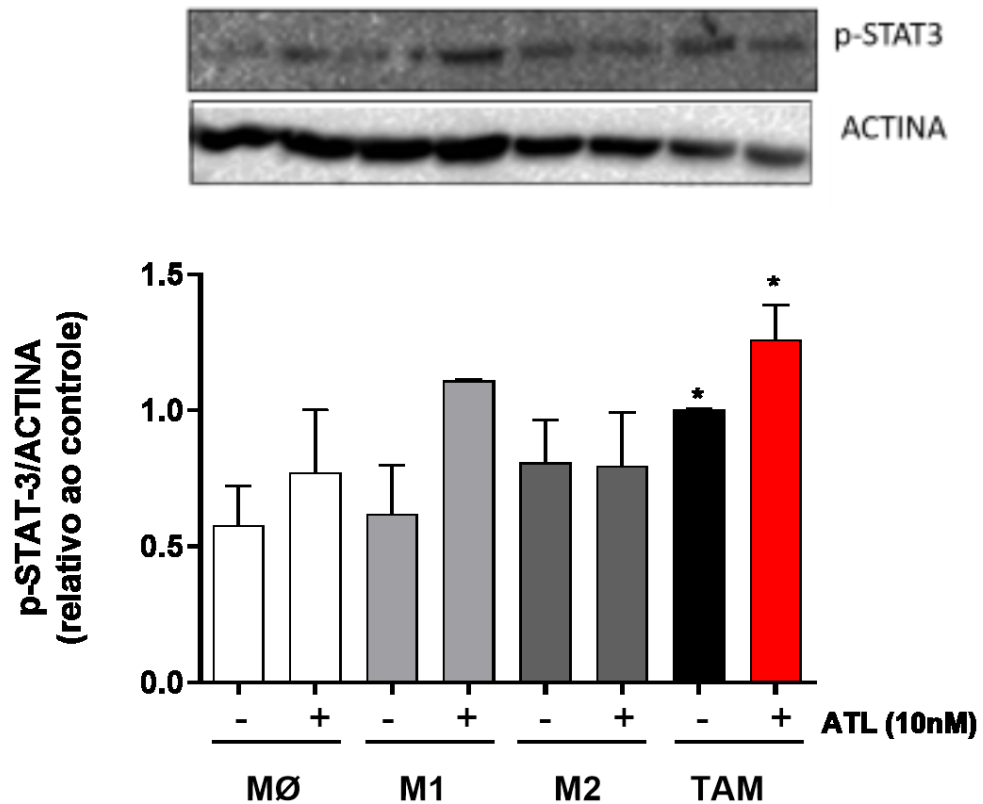
Fonte: A autora, 2021.

3.3 Envolvimento da STAT3 no efeito da lipoxina

O perfil M2-like em TAMs tem sido associado com a ativação de STAT3 em diversos tipos tumorais (Sun e col., 2006; Komohara e col., 2008). O perfil de ativação da STAT3 foi investigado através dos níveis de fosforilação desta proteína nos diferentes fenótipos de macrófagos. Conforme mostrado na figura 14, não houve variação na fosforilação da STAT3 em macrófagos M1 e M2, quando comparados ao MØ. No entanto, a fosforilação da STAT3 se mostrou aumentada nos TAM, frente ao controle MØ.

O tratamento com a lipoxina por 72 horas não alterou os níveis de fosforilação STAT3 em macrófagos MØ e M2. Por outro lado, nos TAMs detectou-se um aumento expressivo na fosforilação da STAT3. Nos TAMs tratados com a lipoxina observou-se a manutenção desse aumento na fosforilação quando comparados com macrófagos não estimulados. Esses resultados sugerem que a lipoxina é capaz de modular a via sinalização via STAT-3 especificamente nos TAMs, sem interferir na ativação desta via em outros macrófagos com perfil fenotípico M2 (figura 14).

Figura 14 - Envolvimento da STAT3 no efeito da lipoxina



Legenda: Monócitos foram cultivados em placa de 24 poços (10⁶ cels/poço) durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, os macrófagos foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN -γ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM). Após 72 horas, os macrófagos foram tratadas ou não com ATL (10 nM) mais 72 horas. Após os períodos de tratamento os macrófagos foram lisados e a expressão proteica de p-STAT3/ACTINA foi analisada através de *Western Blotting*. Resultados são expressos como média ± EP de três experimentos realizados separadamente.

Nota: *, $p \leq 0,05$ quando comparado ao MØ.

Fonte: A autora, 2021.

3.4 Envolvimento do VEGF sobre o efeito da lipoxina sobre os TAMs

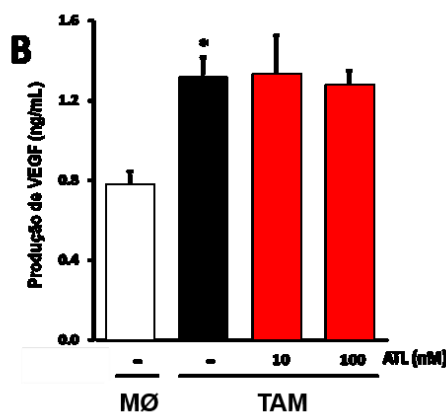
Como descrito, no nosso modelo experimental padronizado por Simões e colaboradores (2017), a polarização de macrófagos humanos à TAM foi obtida através da incubação das células com meio condicionado de células de melanoma humano MV3. Os resultados foram obtidos após análise dos fatores solúveis presentes no meio condicionado de células de melanoma humano MV3. O ensaio de Multiplex mostrou uma alta secreção de VEGF e IL-6, com baixa secreção de MCP-1, quando comparado ao meio condicionado de culturas de melanócito NGM. Não foram observadas diferenças significativas na liberação de TGF- β entre os meios condicionados de NGM e MV3 (figura 15A).

Conforme demonstrado na figura 15B, observamos que os TAMs secretaram altos níveis de VEGF, em comparação aos M ϕ , o que não é alterado pelo tratamento com lipoxina (figura 15B).

Figura 15 - Envolvimento do VEGF sobre o efeito da lipoxina sobre os TAMs

A

	IL-6		MCP-1		MIP1a		TNF α		VEGF		IL-10		TGF β	
	MD	DP	MD	DP	MD	DP	MD	DP	MD	DP	MD	DP	MD	DP
DMEM 1%	0	-	0	-	0	-	0	-	0,093	-	0	-	0	-
NGM	0,036	0,018	0,194	0,023	nd	-	nd	-	0,383	0,191	-	-	0,539	0,371
MV3	1,530***	1,346	0,010***	0,006	nd	-	nd	-	3,928*	1,471	-	-	0,673	0,623



Legenda: A lipoxina não interferiu na liberação de VEGF pelos TAMs. (A) MV3, NGM (1×10^6 células/poço) foram cultivados em placas de 24 poços. As citocinas foram analisadas através de *Multiplex* (B) Os monócitos foram cultivados por 7 dias para a diferenciação em macrófagos, após isso foram estimulados com meio condicionado (1:1) para a indução do perfil TAM. O sobrenadante foi retirado e os TAM foram incubados ou não com ATL (10-100 nM) por 72 horas, substituindo o meio por RPMI incompleto nas últimas 12 horas. A produção de VEGF foi realizada através do ensaio de ELISA. Resultados são expressos como média \pm DP de 3 experimentos realizados separadamente.

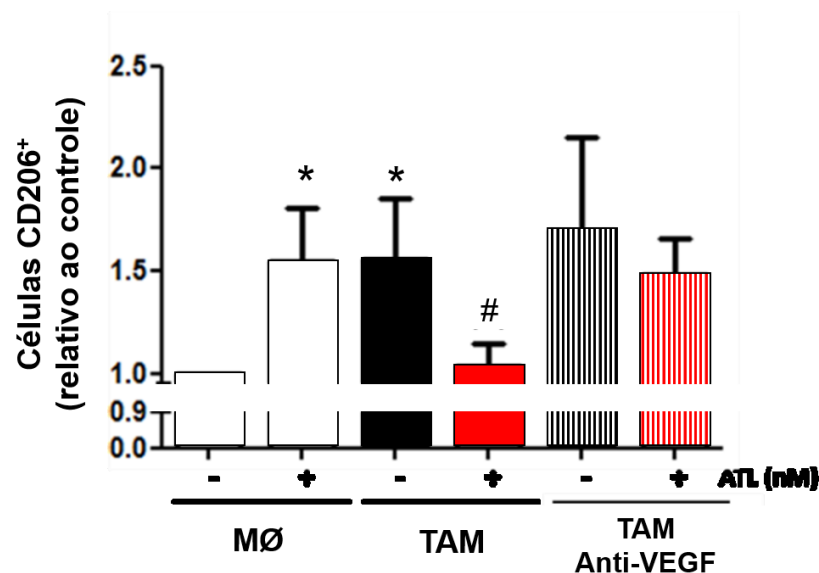
Nota: *, $p \leq 0,05$ quando comparado a MØ.

Fonte: A autora, 2021.

A partir desses dados, analisamos o possível papel e a participação do VEGF nos efeitos da lipoxina sobre os TAMs. Para isso, os macrófagos a serem polarizados à TAM foram incubados com o meio condicionado da MV3 na presença do anticorpo neutralizante anti-VEGF. Desta maneira conseguimos inibir o efeito do VEGF liberado no meio condicionado na indução da polarização de TAMs. Na ausência de VEGF durante a polarização, os macrófagos apresentaram um aumento na expressão de CD206, um marcador típico de macrófagos M2 (Figura 16, barra preta rachurada), assim como macrófagos incubados com meio condicionado de MV3 contendo VEGF (figura 16, barra preta). Os resultados indicaram que mesmo na ausência de VEGF os macrófagos humanos polarizaram para um perfil M2/TAMs clássico. Macrófagos MØ tratados com lipoxina por 72 horas mostraram aumento na expressão de CD206

quando comparamos com macrófagos controle (MØ barras brancas) (figura 16), confirmando dados da literatura (Li Y e col, 2011). Conforme descrito pelo nosso grupo (Simões e col., 2017), o tratamento com lipoxina por 72 horas modifica o perfil dos TAMs polarizados na presença do meio condicionado na MV3 contendo VEGF, diminuindo a expressão de CD206 e induzindo um perfil semelhante a macrófagos M1 (figura 16, barra vermelha). Este efeito da lipoxina não foi observado em TAMs polarizados na ausência de VEGF, onde, não observamos alterações na expressão de CD206 quando estas células foram tratadas com LX por 72 horas (figura 16, barra vermelha rachurada), sugerindo que o efeito da lipoxina na reversão do fenótipo dos TAMs depende das ações do VEGF durante a polarização dos macrófagos para o perfil M2/TAM/pró-tumoral. A partir desses resultados, buscamos investigar o papel do VEGF sobre a polarização de macrófagos em TAM e sua influência nos efeitos antitumorais da lipoxina nessas células.

Figura 16 - O efeito da lipoxina nos TAMs é dependente das ações do VEGF durante a polarização de TAMs



Legenda: O efeito da lipoxina na polarização dos TAMs é dependente do VEGF. Os macrófagos (1×10^6 células) foram estimulados com meio condicionado (1:1) produzido pela MV3 para indução do perfil M2-like dos TAMs. Para investigar o papel do VEGF, os macrófagos foram incubados com meio condicionado de MV3 (1:1) na presença ou ausência de anticorpo neutralizante anti-VEGF (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Após 72 horas, as células foram tratadas ou não com ATL (10 nM) por 72 horas. As células foram analisadas por citometria de fluxo utilizando marcador para M2 (CD206-PE). Gráfico representa as células CD206+. Resultados são expressos como média \pm DP de três experimentos realizados separadamente.

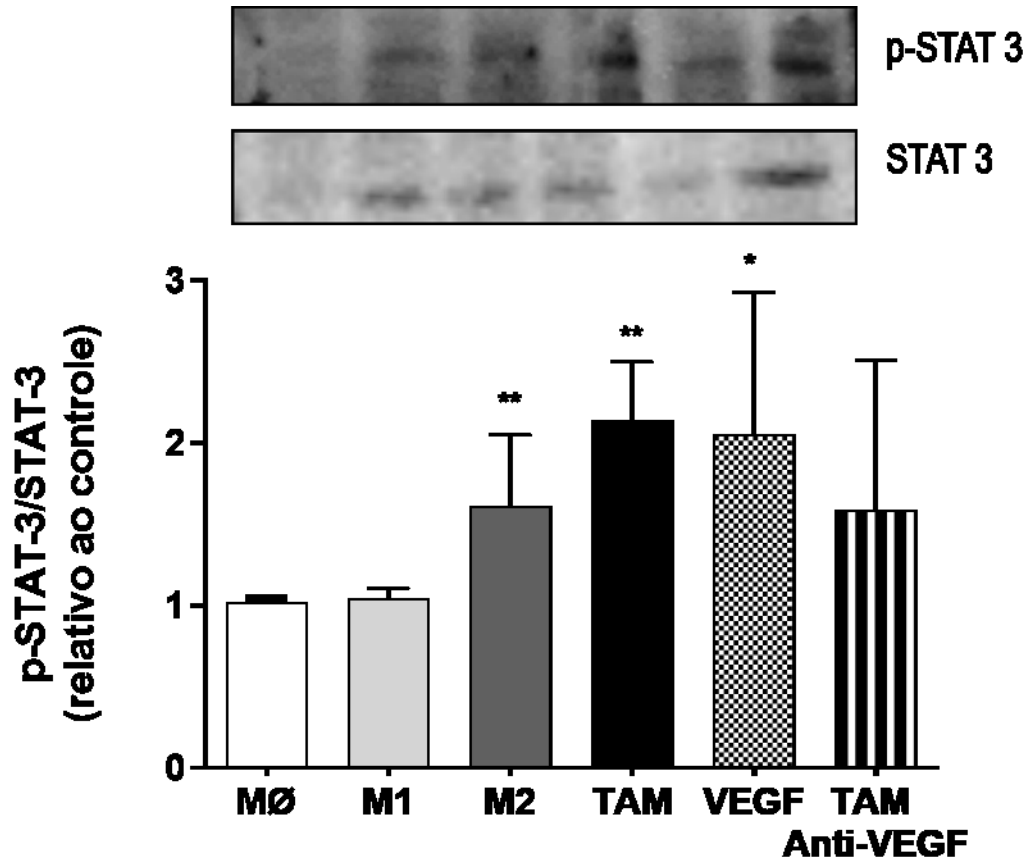
Nota: *, $p \leq 0,05$ quando comparado ao MØ; #, $p \leq 0,05$ quando comparado ao TAM.

Fonte: A autora, 2021.

3.5 Participação da STAT3 na modulação da polarização à TAM pelo VEGF

A ativação de STAT3 induz a produção de IL-10 e VEGF em TAMs polarizados com o meio condicionado de carcinoma hepático (Hasita e col., 2010). Para investigar a participação do VEGF na sinalização via STAT3 durante a polarização dos TAMs, foi utilizado o anticorpo neutralizante anti-VEGF no processo de polarização. Os resultados obtidos neste experimentos (figura 17) mostraram que macrófagos polarizados por IL-4, VEGF ou com meio condicionado de MV3 (TAMs), apresentaram aumento da fosforilação da STAT3, em relação às células MØ e M1. Em contraste, os TAMs obtidos com meio condicionado na presença de anti-VEGF não apresentam diferença na fosforilação da STAT3 quando comparados aos MØ ($p= 0,2$) ou aos TAMs ($p= 0,4$). Os dados sugerem que a polarização de macrófagos para um perfil TAM / M2-*like* e a ativação da STAT3 podem independentemente do VEGF (figura17).

Figura 17 - Participação da STAT3 na indução da polarização TAMs pelo VEGF



Legenda: Monócitos foram cultivados em placa de 24 poços (10^6 cels/poço) durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, os macrófagos foram estimuladas com LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) + IFN $-\gamma$ ($100 \text{ ng}/\text{mL}$) (M1), IL-4 ($40 \text{ ng}/\text{mL}$) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM). Para investigar o papel do VEGF, os macrófagos foram incubados com o anticorpo neutralizante anti-VEGF ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) na presença do meio condicionado de MV3 (1:1). Após 72 horas, os macrófagos foram lisados e a expressão proteica de p-STAT3 e STAT3 foi analisada através de *Western Blotting*. Os resultados são expressos como média \pm EP de quatro experimentos realizados separadamente.

Nota: *, $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, quando comparado ao MØ

Fonte: A autora, 2021.

3.6 Participação da lipoxina sobre a expressão VEGFR-1 nos macrófagos

No microambiente tumoral, os TAMs promovem vascularização pela produção de fatores pró-angiogênicos, como VEGF (Wynn e col., 2013). A sinalização de VEGF via VEGFR-1 induz o recrutamento de monócitos da medula óssea até o tumor, que podem influenciar no início e no crescimento tumoral e na formação de sítios metastáticos (Sawano e col., 2001; Kaplan e col., 2005; Muramatsu e col., 2010; Qian e col., 2015).

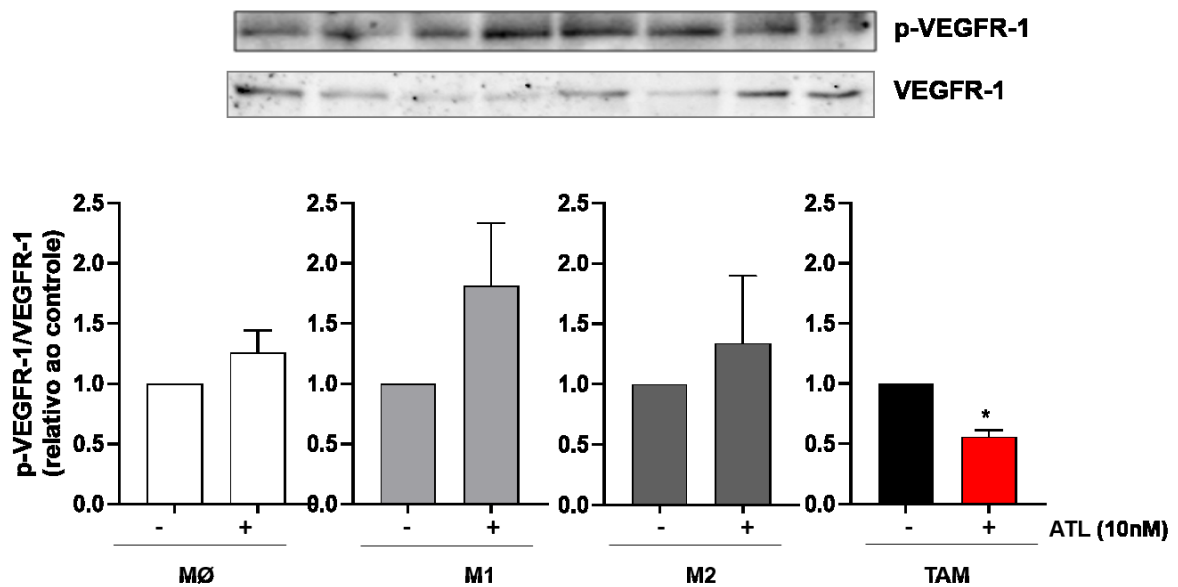
Uma vez que o efeito da lipoxina sobre os TAMs depende da presença do VEGF durante a polarização dos TAMs, investigamos a ativação do VEGFR-1 nestas células. Conforme mostrado na figura 18, o tratamento com a lipoxina não afetou de maneira significativa a fosforilação do VEGFR1 nos macrófagos MØ ($p=0,2$), M1 ($p=0,2$) e M2 ($p=0,7$), contudo em todos esses fenótipos, e em macrófagos M1, a lipoxina tende a aumentar a fosforilação do VEGFR1 (figura 18). Em contraste, de maneira bem interessante, nos TAMs, o tratamento com lipoxina diminuiu a fosforilação do VEGFR-1, destacando o efeito seletivo da lipoxina em TAMs (figura 18).

3.7 Participação da lipoxina sobre a expressão de SHP1 em macrófagos

A SHP-1 é uma proteína fosfatase que regula a fosforilação do receptor do VEGF (Huang e col., 1999). Dados anteriores do nosso grupo mostram que a lipoxina regula a ativação do VEGFR em células endoteliais através da regulação da ativação de SHP-1 (Cezar-de-Melo e col., 2008). Através da avaliação da expressão de SHP-1 em macrófagos tratados ou não com lipoxina, observamos que macrófagos com perfil M1 apresentaram menor expressão de SHP-1. Em contrapartida, os macrófagos M2 e TAMs, apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles, claramente têm uma menor expressão da SHP-1 quando comparado aos MØ (figura 19) ($p=0,1$ em ambos os perfis quando comparado ao MØ). Interessantemente, o tratamento com a lipoxina aumentou a expressão de SHP-1

apenas em TAMs, sem afetar a expressão desta fosfatase nos outros fenótipos. Estes dados sugerem que a SHP-1 parece ser regulada de diferencialmente pela lipoxina nos TAMs, podendo estar envolvida nos efeitos anti-tumorais da lipoxina nessas células.

Figura 18 - Participação da lipoxina sobre a expressão VEGFR-1 nos macrófagos

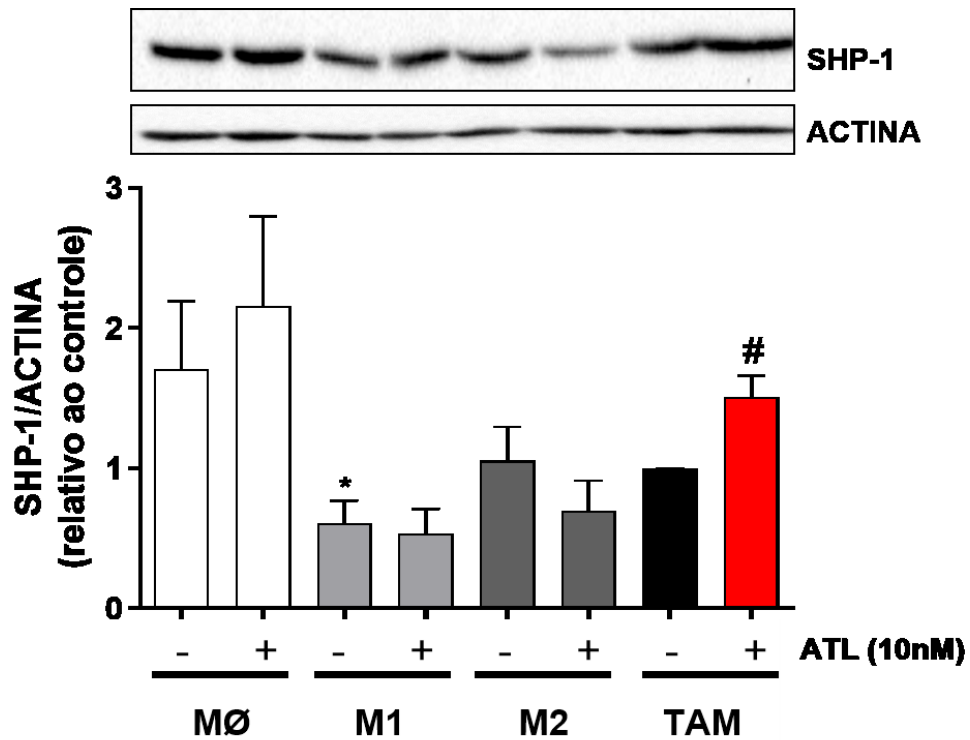


Legenda Monócitos foram cultivados em placa de 24 poços (10^6 cels/poço) durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, os macrófagos foram estimuladas com LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) + IFN γ ($100 \text{ ng}/\text{mL}$) (M1), IL-4 ($40 \text{ ng}/\text{mL}$) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM). Após 72 horas, os macrófagos foram tratadas ou não com ATL (10 nM) mais 72 horas. Após os períodos de tratamento os macrófagos foram lisados e a expressão proteica de p-VEGFR1 e VEGFR1 foi analisada através de *Western Blotting*. Resultados são expressos como média \pm EP de 3 experimentos realizados separadamente.

Nota: *, $p \leq 0,05$ quando comparado ao TAM.

Fonte: A autora, 2021.

Figura 19 - Participação da lipoxina sobre a expressão de SHP-1 em macrófagos



Legenda: Monócitos foram cultivados em placa de 24 poços (10⁶ cels/poço) durante 7 dias para diferenciação em macrófagos. Após esse período, os macrófagos foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN-γ (100 ng/mL) (M1), IL-4 (40 ng/mL) (M2) e meio condicionado de MV3 (TAM). Após 72 horas, os macrófagos foram tratadas ou não com ATL (10 nM) mais 72 horas. Após os períodos de tratamento os macrófagos foram lisados e a expressão proteica de SHP-1 e da ACTINA foram analisadas através de *Western Blotting*. Resultados são expressos como média ± EP de 4 experimentos realizados separadamente.

Nota: *, $p \leq 0,05$ quando comparado ao MØ; #, $p \leq 0,05$ quando comparado ao TAM.

Fonte: A autora, 2021.

4 DISCUSSÃO

A interface entre câncer e a resposta inflamatória vem ganhando destaque na literatura, e neste cenário, os TAMs, células do sistema imune com diferentes funções durante o desenvolvimento tumoral, surgem como importantes alvos no controle do câncer. Apesar do seu papel bem elucidado no microambiente tumoral, ainda não estão claros os mecanismos moleculares que regulam o perfil funcional dos TAMs na progressão tumoral.

Classicamente, a lipoxina é um mediador lipídico da resolução do processo inflamatório capaz de induzir a mudança do perfil M1/pró-inflamatório para um perfil M2/pró-resolutivo em macrófagos (Li e col., 2011). Recentemente, nosso grupo demonstrou, de maneira inédita, que a lipoxina apresenta uma potente ação antitumoral ao alterar o perfil de M2/TAMs para um fenótipo citotóxico que diminui a progressão neoplásica, semelhante ao perfil M1/pró-inflamatório. Interessantemente, estes efeitos em M2/TAMs se mostram seletivos aos TAMs, uma vez que a lipoxina não altera o perfil M2/IL4 clássico (Simões e col., 2017). A partir desses resultados, hipotetizamos que essa regulação diferencial da lipoxina sobre os TAMs poderia ser consequência da modulação de vias de sinalização distintas nos diferentes perfis de macrófagos. Diante disso, neste trabalho objetivamos estudar as diferentes vias de sinalização relacionadas com a polarização de macrófagos a fim de obter um melhor entendimento sobre os mecanismos que regulam a ação da lipoxina sobre os TAMs e, conseqüentemente, na progressão tumoral.

Já é relatado na literatura que membros da família MAPK, como ERK, JNK e p38, são ativados e medeiam a diferenciação de macrófagos (Yang e col., 2013). Tem sido mostrado que a ativação de ERK está relacionada com a polarização M2 dos TAM contribuindo para a progressão tumoral. Zhang e colaboradores (2013) sugeriram que a ativação tardia de ERK é necessária para diferenciação monócito-macrófago e quando bloqueada no estágio inicial dessa diferenciação inibe especificamente a polarização à M2 (Zhang e col., 2013). Além disso, Cheng e colaboradores (2018) mostraram que a PKN2, uma serina/treonina proteína-quinase da subfamília PKC, modula negativamente a fosforilação de ERK1/2, levando assim a uma menor expressão de IL-10 e IL-4, reduzindo a polarização dos TAMs para o

fenótipo M2 (Cheng e col., 2018).

Corroborando os dados da literatura, nossos resultados revelaram que em TAMs e macrófagos M2/IL4, mas não em macrófagos M1, a lipoxina reduz a fosforilação da ERK nos tempos iniciais de incubação, sugerindo que a lipoxina atua de maneira semelhante nos macrófagos M2/IL-4 e TAMs na regulação de ERK. No entanto, a fosforilação de ERK volta aos níveis normais após 30 minutos em macrófagos M2/IL4, enquanto se mantém inibida até 60 minutos em TAMs, sugerindo um efeito da lipoxina seletivo e mais prolongado em TAMs. Dados anteriores do nosso grupo, mostraram que a lipoxina altera o perfil *M2-like* dos TAMs para um perfil *M1-like* após 72 horas de tratamento (Simões e col., 2017). Sugerimos que, apesar de não encontrarmos diferença na fosforilação de ERK após 72 horas de incubação, a inibição precoce da fosforilação de ERK, se mantendo sustentada até 60 minutos, pode contribuir para os efeitos iniciais da lipoxina na indução do perfil M1 de TAMs de maneira seletiva.

A via de sinalização canônica da PI3K/AKT converge sinais inflamatórios e metabólicos para regular as respostas de macrófagos, modulando seu fenótipo de ativação. A ativação desta via é fundamental na restrição de respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias de macrófagos (Vergadi e col, 2017). Covarrubias e colaboradores (2015) demonstraram que a ativação de AKT é necessária para a polarização M2. A ativação ou super expressão de PI3K/AKT em macrófagos reduz a ativação por LPS, enquanto a inibição da PI3K aumenta a expressão de iNOS e a produção de óxido nítrico, promovendo respostas de macrófagos do tipo M1 (Díaz-Guerra, 1999). Mais recentemente, Shrivastava e colaboradores (2018) revelaram ainda que a oncostatina M, uma citocina da família da IL-6, leva à polarização M2 em macrófagos via ativação do complexo de sinalização mTOR 2 (mTORC2) dependente de AKT1. Por outro lado, foi visto que isoformas PI3K e AKT também podem contribuir para a polarização M1. O complexo TSC/mTORC1 é um efetor *downstream* da via PI3K/AKT que pode ser ativado por estímulos, desempenhando um papel de coordenação de sinais metabólicos e inflamatórios e determinando o fenótipo M1 em macrófagos (Galván-Pena e O'Neill, 2014). Em nossos resultados não observamos alterações na fosforilação da AKT nos macrófagos M1 (LPS + IFN- γ) tratados com lipoxina, enquanto nos macrófagos M2/IL-4 a lipoxina reduziu a fosforilação da AKT após 60 minutos de tratamento. Por outro lado, o efeito da lipoxina nos M2/TAMs, foi oposto ao que ocorreu nos macrófagos M2/IL-4, aumentando a fosforilação de AKT

após 30 minutos de tratamento. Estes resultados sugerem que a AKT possa ser diferentemente regulada nos TAMs, o que poderia contribuir para o efeito seletivo da lipoxina nessas células. Assim, a lipoxina poderia estar induzindo a polarização dos TAMs a um perfil M1 através da ativação da via PI3k/Akt, enquanto manteria o perfil M2 em macrófagos M2/IL4 através da diminuição da fosforilação de AKT.

Diante desses resultados, sugerimos que a ativação da via PI3K/AKT pela lipoxina em TAMs possa estar relacionada com a ativação de diferentes proteínas associadas, tais como TORC1/2, normalmente associadas ao perfil M1 (Vergadi e col., 2017). No entanto, mais estudos devem ser realizados para esclarecer o envolvimento da via AKT / TORC1/2.

Investigamos também o envolvimento da STAT3 nos diferentes perfis de macrófagos e sua possível regulação pela lipoxina nos TAMs. A fosforilação de STAT3 é essencial para sua ativação e este fator de transcrição regula passos cruciais na tumorigênese (Kamran e col., 2013). Em diversos tipos de tumores, a ativação de STAT3 está relacionada à polarização M2 (Rébé e col., 2019). Corroborando esses dados, observamos que ambos os perfis M2/IL-4 e TAM apresentam a fosforilação de STAT3 aumentada em comparação ao perfil M1 ou controle. Já nos macrófagos M1 tratados com lipoxina observou-se um aumento da expressão de p-STAT3 que, embora não esteja estatisticamente significativo ($p=0,2$), sugere um perfil de ativação diferente dos anteriores.

Nossos resultados obtidos mostram que o tratamento com a lipoxina aumentou a fosforilação de STAT3 nos TAMs. Estes dados contrastam com trabalho anterior de Li e colaboradores (2011) mostrando que nas células U937 diferenciadas com MCP-1 e M-CSF, que apresentaram um perfil semelhante ao TAM, o tratamento com a lipoxina diminuiu a fosforilação de STAT3. Tem sido relatado que a STAT3 pode, na mesma célula, modular respostas tanto pró- como anti-inflamatória (Hutchins e col., 2013). Tanto a citocina pró-inflamatória IL-6 como a citocina anti-inflamatória IL-10 ativam a STAT3, gerando, porém respostas celulares diferentes. Utilizando um modelo computacional de sinalização de IL-6 e IL-10, foi demonstrado que a estimulação do receptor da IL-6 resulta na ativação transitória de STAT3, enquanto a sinalização induzida por IL-10 leva a ativação sustentada de STAT3 (Braun e col., 2013). Além disso, dados anteriores publicados pelo nosso grupo mostraram que a lipoxina diminui a secreção de IL-10 pelos TAMs, sugerindo que a ativação da STAT3 pela lipoxina não estaria relacionada com a secreção de IL-10 (Simões e col., 2017).

Mostramos que o meio condicionado da MV3 que polariza o fenótipo do TAM tem uma alta concentração de IL-6, assim, sugerimos que o efeito da lipoxina em aumentar a ativação da STAT3 poderia estar regulando as atividades pró-inflamatória contribuindo para o *switch* da modulação do perfil M2-like dos TAMs pra M1-like.

Simões e colaboradores (2017) demonstraram que a lipoxina modula o perfil M2-like dos TAMs em direção a um perfil M1-like diminuindo a expressão de marcadores M2 como CD206 e CD163 e alterando funcionalmente esses TAMs que exercem um papel antitumoral. Em nossos resultados vimos que a polarização de TAMs na presença de anticorpo neutralizando anti-VEGF impediu o efeito da lipoxina sobre a diminuição da expressão de CD206. Observamos, contudo, que TAMs polarizados na ausência de VEGF mantiveram o perfil M2 com expressão de CD206. Estes resultados sugerem que as ações do VEGF durante a polarização são necessárias para os efeitos antitumorais da lipoxina sobre o perfil fenotípico de TAMs. Os TAMs polarizados na ausência do VEGF parecem apresentar um perfil M2 diferente do observado nos TAMs polarizados na presença do VEGF. Contudo, mais experimentos são necessários para investigar se outros marcadores M2, como o CD163, também seriam mantidos nestas condições, além de investigar possíveis alterações funcionais nesses TAMs.

Para entender melhor a relação entre as ações do VEGF e os efeitos antitumorais da lipoxina nos TAMs, nossos resultados mostraram inicialmente, que a MV3 secreta altos níveis de VEGF e que a lipoxina não afeta a secreção de VEGF pelos TAMs, sugerindo, assim, que seu efeito anti-tumoral poderia ser decorrente da regulação na via de sinalização do VEGF liberado pelas células tumorais sobre os TAMs. Além disso, a neutralização do VEGF presente no meio condicionado da MV3 não alterou a ativação da STAT3, sugerindo que a sinalização da STAT3 não parece estar associada à sinalização do VEGF em TAMs.

Um estudo recente mostrou que a expressão de VEGFR2 em TAMs está aumentada em tumores de pacientes com câncer colorretal (Min e col., 2021). Além disso, ensaios *in vitro*, demonstraram que a função inibidora de macrófagos M2 é parcialmente dependente da via de sinalização VEGF/VEGFR2. Nossos experimentos não conseguiram detectar a expressão de VEGFR2 nos TAMs, corroborando outros dados da literatura que demonstram que o VEGFR1 é o receptor de VEGF mais expresso em macrófagos (Barleon e col., 1996; Qian e col., 2015).

Nos tumores, os macrófagos M2 promovem a vascularização pela produção de fatores pró-angiogênicos, como VEGF (Wynn e col., 2013). Muitos estudos relataram a expressão dos receptores de VEGF em TAMs. Por exemplo, o RNA mensageiro de VEGFR-1 é encontrado em monócitos humano extraídos de sangue periférico (Lacal e Graziani, 2018). Além disso, a atividade da tirosina quinase de VEGFR-1 é importante para a migração de macrófagos induzida por VEGF (Barleon e col., 1996). Sawano e colaboradores (2001) demonstraram ainda que o receptor VEGFR-1 é expresso na superfície de monócitos e aumenta durante a diferenciação de linhagem monócito-macrófago, sugerindo que VEGFR-1 pode ser um marcador de superfície celular em macrófagos. Ao analisar o perfil de ativação de VEGFR1 nos diferentes perfis de macrófagos, observamos que a lipoxina reduziu a expressão desse receptor apenas nos TAMs. Este resultado sugere que a lipoxina, conhecida como um mediador anti-angiogênico, possa estar exercendo seus efeitos sobre os TAMs modulando a mudança do perfil *M2-like* para um perfil *M1-like* através da inibição da sinalização via VEGF/VEGFR1.

Têm sido relatado que o VEGF-A é capaz de mobilizar células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea (Hattori e col., 2002). Essas células, que expressam o VEGFR-1, residem em nichos específicos da medula óssea, onde proliferam, e então se mobilizam para a corrente sanguínea durante a angiogênese. Desta forma, as células hematopoiéticas e endoteliais contribuem para o crescimento e vascularização dos tumores primários (Lyden e col., 2001; Hattori e col., 2002). Além de gerar TAMs que favorecem o crescimento tumoral, invasividade e fuga imunológica, esses progenitores hematopoiéticos derivados da medula óssea estão localizados em locais pré-metastáticos específicos, formando aglomerados que alteram o microambiente e atraem as células tumorais levando a formação de lesões metastáticas. Além disso, fatores derivados de macrófagos M2, como TGF- β , VEGF-A, SDF-1 (fator 1 derivado de células estromais) e MMP-9 contribuem para o nicho pré-metastático e metástase por mobilização de células mielóides positivas para VEGFR-1 (Kaplan e col., 2005; Chen e col., 2017). Também foi demonstrado que a expressão de VEGFR-1 é regulada positivamente em macrófagos associados a metástases (MAMs) (Qian e col., 2015). Em modelos de metástase pulmonar de câncer de mama, os MAMs expressam exclusivamente VEGFR-1 sendo um fator crítico para a metástase, regulando um conjunto de genes relacionados à resposta

inflamatória, incluindo o CSF-1 (Qian e col., 2015). Em conjunto, todos esses dados sugerem que a lipoxina, ao diminuir a fosforilação de VEGFR-1, possa estar envolvida na diminuição dos efeitos pró-tumorais dos TAMs nos vários momentos da progressão tumoral, como migração e metástase. Mais estudos se fazem necessários para confirmar esta hipótese.

Em macrófagos murinos estimulados por LPS, a ativação de SHP-1 inibe a indução iNOS e a secreção de TNF (Hardin e col., 2006). Também foi visto que macrófagos de camundongos *knockout* para SHP-1 produzem maiores quantidades de IL-6 em resposta ao LPS (Rego e col., 2011), sugerindo que a ativação de SHP-1 restringe a indução do perfil pró-inflamatório M1 (Kozicky e Sly, 2015). De forma contrastante, outro estudo mostrou que a atividade de SHP-1 estaria associada à maior produção de IL-12 e IL-6 em macrófagos estimulados com LPS (Zhou e col., 2010; Rego e col., 2011). Em estudo mais recente, Busca e colaboradores (2018) descreveram que a sinalização *downstream* de TLR4 estaria associada à indução do complexo SHP-1/Src em macrófagos (Busca e col., 2018). Anteriormente, nosso grupo demonstrou que a lipoxina inibe a ativação de VEGFR2 em células endoteliais através da ativação de SHP-1, promovendo um efeito anti-angiogênico (Cezar-de-Melo e col., 2008).

Nossos resultados mostraram que o processo de polarização de macrófagos para perfis M1, M2 e TAMs diminui os níveis de expressão de SHP-1. De maneira elegante e bem interessante, mostramos que a lipoxina aumenta os níveis de SHP-1 apenas nos TAMs, sem modificar os níveis da fosfatase em macrófagos M1 e M2. Em conjunto, esses dados sugerem que a o aumento da expressão e a ativação de SHP-1 estaria envolvida nos efeitos da lipoxina na modulação da polarização de TAMs. Possivelmente, como mostrado anteriormente (Cezar-de-Melo e col., 2008) a lipoxina promoveria em macrófagos a associação da SHP-1 ao VEGFR1, diminuindo assim a sinalização induzida pelo VEGF e, conseqüentemente, promovendo respostas antitumorais como inibição da progressão tumoral e angiogênese. Mais estudos estão sendo elaborados para reforçar nossa hipótese.

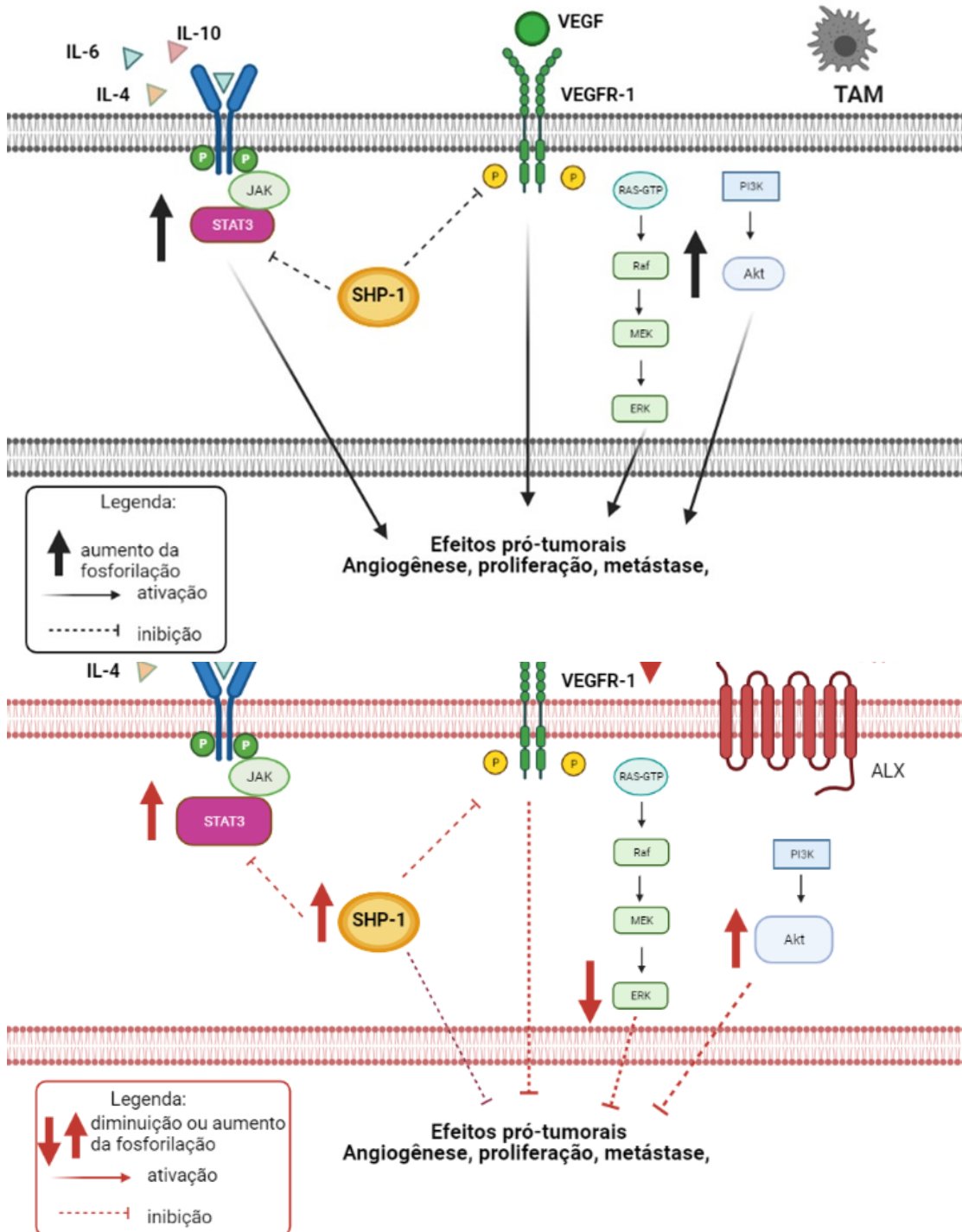
Foi reportado que a diminuição da expressão ou atividade de SHP-1 resulta no aumento da atividade da JAK (Janus quinase) levando ao crescimento anormal de células tumorais (Wu e col., 2003). Além disso, a ativação de STAT3 ativa diretamente a produção de VEGF, enquanto a SHP-1 regula negativamente STAT3 em vários tipos

de cânceres (Niu e col., 2002; Wei e col., 2003; Witkiewicz e col., 2007; Liu e col., 2014). Em estudo utilizando um modelo de câncer de mama triplo negativo (TNBC), caracterizado por um comportamento mais agressivo e maior probabilidade de metástases, foi demonstrado que o inibidor de VEGFR, Regorafenibe, suprimiu o potencial metastático das células TNBC através do mecanismo dependente da inibição da via SHP-1/p-STAT3/VEGF-A (Su e col., 2016). Ao comparar estes dados da literatura com os dados obtidos em nosso trabalho, vimos um efeito oposto daquele esperado inicialmente. Nos TAMs, a lipoxina aumentou tanto a fosforilação da STAT3 quanto a expressão de SHP-1, reforçando que não há a associação da SHP-1 com a STAT3 no efeito da lipoxina em TAMs. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para sustentar essa hipótese.

Chen e colaboradores (2017) observaram que a sinalização STAT3 é crítica para a polarização M2 dos macrófagos no tumor e para a formação do nicho pré-metastático. O *crosstalk* de TAMs com células mielóides positivas para VEGFR1 é dependente de STAT3, uma vez que ao silenciar STAT3, foi observado a diminuição da migração desses TAMs VEGFR1⁺ (Chen e col., 2017). Diante disso, ao comparar o efeito da lipoxina em duas vias de sinalização estudada neste trabalho, temos que a lipoxina não altera a ativação de STAT3 na presença do anticorpo neutralizante para o VEGF, excluindo a associação dessas vias de sinalização.

Dessa forma, este trabalho sugere que a SHP-1 pode estar envolvida nos efeitos da lipoxina sobre a modulação da polarização M2-like nos TAMs para um perfil M1-like, possivelmente pela redução da sinalização induzida por VEGFR1, promovendo respostas antitumorais como inibição da progressão tumoral, metástase e angiogênese, entretanto mais estudos são necessários a fim de reforçar esta hipótese (figura 20).

Figura 20 - O efeito de diferentes vias de sinalização envolvidas na polarização dos TAMs



Legenda: O efeito de diferentes vias de sinalização envolvidas na polarização dos TAMs. Os TAMs possuem um perfil M2-like ativado por citocinas como IL-4 e IL-10 contribuem para a progressão tumoral. Nessas células o VEGF se liga ao seu receptor e induz efeitos protumorais como a angiogênese. O tratamento com a lipoxina é capaz de diminuir a expressão do VEGFR-1 e aumentar a fosforilação de AKT, STAT3 e SHP-1.

Fonte: A autora, 2021.

CONCLUSÃO

Em nosso trabalho, através da análise dos mecanismos moleculares, concluímos que:

- a) A lipoxina diminui a fosforilação de ERK nos TAMs e nos macrófagos M2;
- b) A lipoxina aumenta a fosforilação de AKT apenas nos TAMs;
- c) O efeito antitumoral da lipoxina é seletivo e depende das ações prévias do VEGF, reduzindo a expressão de marcadores M2 apenas nos TAMs;
- d) Lipoxina aumenta a expressão de SHP-1 e a fosforilação de VEGFR1.

Nossos dados demonstraram que a lipoxina modula diferencialmente a sinalização de TAMs inibindo a ativação de VEGFR possivelmente via SHP-1. Estes resultados podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão tumoral.

REFERÊNCIAS

- AKIRA, S. et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. **Cell**, vol. 77, no. 1, pp. 63–71, 1994
- ALLEN, Michael; Louise Jones, J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 163-177, 2011.
- ANFRAY, C.; UMMARINO, A.; ANDÓN, F.T.; ALLAVENA, P. Current Strategies to Target Tumor-Associated-Macrophages to Improve Anti-Tumor Immune Responses. **Cells**, v. 9, p. 46. 2020
- ARAMINI, Beatrice et al. Cancer stem cells and macrophages: molecular connections and future perspectives against cancer. **Oncotarget**, v. 12, n. 3, p. 230, 2021.
- AYTES, Alvaro et al. NSD2 is a conserved driver of metastatic prostate cancer progression. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2018.
- BAKER, Nicole et al. Lipoxin A4: anti-inflammatory and anti-angiogenic impact on endothelial cells. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 6, p. 3819-3826, 2009.
- BALKWILL, Frances R.; MANTOVANI, Alberto. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, v. 22, n. 1, p. 33-40, 2012.
- BARLEON, Bernhard et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. **Blood**, v. 87 n. 8, p. 3336–3343, 1996.
- BELLACOSA, T.F. Franke, M.E. Gonzalez-Portal, K. Datta, T. Taguchi, J. Gardner, J.Q. Cheng, J.R. Testa, P.N. Tsichlis, Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications, **Oncogene**, v. 8, n. 3, p. 745–754, 1993.
- BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, Claire E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 196, n. 3, p. 254-265, 2002.
- BONNANS, Caroline et al. Synthesis and anti-inflammatory effect of lipoxins in human airway epithelial cells. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 61, n. 5, p. 261-267, 2007.

BRAUN, David A.; FRIBOURG, Miguel; SEALFON, Stuart C. Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 5, p. 2986-2993, 2013.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians, Hoboken**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BROGI, Edi *et al.* Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. **Circulation**, v. 90, n. 2, p. 649-652, 1994.

BROMBERG, Jacqueline; DARNELL, James E. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. **Oncogene**, v. 19, n. 21, p. 2468-2473, 2000.

BUETTNER, Ralf; MORA, Linda B.; JOVE, Richard. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. **Clinical cancer research**, v. 8, n. 4, p. 945-954, 2002.

BUSCA, Aurelia *et al.* cIAP1/2–TRAF2–SHP-1–Src–MyD88 complex regulates lipopolysaccharide-induced IL-27 production through NF- κ B activation in human macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 5, p. 1593-1606, 2018.

CAO, Yihai *et al.* Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 235, n. 3, p. 493-498, 1997.

CAO, Zhe *et al.* AKT and ERK dual inhibitors: The way forward? **Cancer letters**, v. 459, p. 30-40, 2019.

CARMELIET, Peter *et al.* Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nature medicine**, v. 7, n. 5, p. 575-583, 2001.

CASAZZA, Andrea *et al.* Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity. **Cancer cell**, v. 24, n. 6, p. 695-709, 2013.

CASSETTA, Luca; POLLARD, Jeffrey W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 12, p. 887-904, 2018.

CECI, Claudia *et al.* Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and its inhibition in modulating tumor invasion: Experimental evidence in different metastatic cancer models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1388, 2020.

CEZAR-DE-MELLO, P. F. T. *et al.* ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A4,

is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 5, p. 956-965, 2008.

CHANMEE, Theerawut et al. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1670-1690, 2014.

CHANDRASEKHARAN, Jayashree A.; SHARMA-WALIA, Neelam. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. **Journal of inflammation research**, v. 8, p. 181, 2015.

CHÁVEZ-GALÁN, Leslie et al. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 6, 2015.

CHEN, X. W. et al. CYP4A in tumor-associated macrophages promotes pre-metastatic niche formation and metastasis. **Oncogene**, v. 36, n. 35, p. 5045-5057, 2017.

CHENG Y, ZHU Y, XU J, YANG M, CHEN P, XU W, ZHAO J, GENG L, GONG S. PKN2 in colon cancer cells inhibits M2 phenotype polarization of tumor-associated macrophages via regulating DUSP6-Erk1/2 pathway. **Mol Cancer**. v. 17(1), p.13, 2018

CHIANG, Nan et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 3, p. 463- 487, 2006.

CHONG, Z. Z.; MAIESE, Kenneth. The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. **Histology and histopathology**, v. 22, n. 11, p. 1251, 2007.

CHRISTOPHI, George P. et al. SHP-1 deficiency and increased inflammatory gene expression in PBMCs of multiple sclerosis patients. **Laboratory investigation**, v. 88, n. 3, p. 243-255, 2008.

CIVETTA MT, CIVETTA JD. Carcinogenesis. **SaludPublica**; v. 53, p. 405- 414, 2011.

CLARK JR, Wallace H. et al. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human pathology**, v. 15, n. 12, p. 1147-1165, 1984.

CLEMENTE, Claudio G. et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 77, n. 7, p. 1303-1310, 1996.

CONCIATORI, Fabiana et al. Role of mTOR signaling in tumor microenvironment: an overview. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 8, p. 2453, 2018.

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

COVARRUBIAS, A. J. E. col. Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. **Semin Immunol**, v. 27, n. 4, p. 286-296, 2015

CORTEZ-RETAMOZO, Virna et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 7, p. 2491-2496, 2012.

CRUSZ SM, BALKWILL FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 12(10), p. 584–96, 2015.

DATTA SR, BRUNET A, GREENBERG ME. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev**, v. 13, p. 2905–27, 1999.

DAVIES, H. et al. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. **Nature**, v.417, p. 949–954, 2002

DARNELL JR, J.E., KERR, I.M., STARK, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, v. 264, n. 5164, p. 1415–1421, 1994.

DE-AGUIAR, Rodrigo Barbosa de; MORAES, Jane Zveiter de. Exploring the immunological mechanisms underlying the anti-vascular endothelial growth factor activity in tumors. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1023, 2019.

DE-BRITO Natália Mesquita, DA-COSTA Hayandra Cunha, SIMÕES Rafael Loureiro, BARJA-FIDALGO Christina. Lipoxin-Induced Phenotypic Changes in CD115+LY6Chi Monocytes TAM Precursors Inhibits Tumor Development. **Frontiers in Oncology**. v. 6 p. 540. 2019.

DE-BRITO N. M, DUNCAN-MORETTI J, DA-COSTA H.C, et al. Aerobic glycolysis is a metabolic requirement to maintain the M2-like polarization of tumor-associated macrophages. **Biochimica et Biophysica acta. Molecular Cell Research**. v. 867(2), p.118604, 2020.

DENARDO, David G.; RUFFELL, Brian. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 6, p. 369-382, 2019.

DE PALMA, Michele; LEWIS, Claire E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. **Cancer cell**, v. 23, n. 3, p. 277-286, 2013.

DUFTON, Neil; PERRETTI, Mauro. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. **Pharmacology & therapeutics**, v.127, n.2, p. 175-188, 2010.

EDENIUS C, HAEGGSTRÖM J, LINDGREN JA. Transcellular conversion of endogenous arachidonic acid to lipoxins in mixed human platelet-granulocyte suspensions. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 157(2), p. 801-7, 1988.

- ELINAV E, NOWARSKI R, THAISS CA, HU B, JIN C, FLAVELLRA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 11, p. 759–71, 2013.
- FIERRO, Iolanda M.; KUTOK, Jeffery L.; SERHAN, Charles N. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin- triggered-15R-lipoxin A4 and lipoxin A4. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 385-392, 2002.
- FISCHER, Christian et al. FLT1 and its ligands VEGFB and PIGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 12, p. 942-956, 2008.
- FRIDMAN WH, PAGÈS F, SAUTÈS-FRIDMAN C, GALON J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nat Rev Cancer**, v. 2(4), p. 298–306, 2012.
- GALVÁN-PEÑA, Silvia; O'NEILL, Luke AJ. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 420, 2014.
- GEIGER, Thomas R.; PEEPER, Daniel S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1796, n. 2, p. 293-308, 2009.
- GIURISATO, Emanuele et al. Myeloid ERK5 deficiency suppresses tumor growth by blocking protumor macrophage polarization via STAT3 inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 12, p. E2801-E2810, 2018.
- GODSON, Catherine et al. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 1663-1667, 2000.
- GOH, Jason et al. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 antagonize TNF- α -stimulated neutrophil-enterocyte interactions in vitro and attenuate TNF- α -induced chemokine release and colonocyte apoptosis in human intestinal mucosa ex vivo. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 5, p. 2772-2780, 2001.
- GRAHAM, Trevor A.; SHIBATA, Darryl. Navigating the path to distant metastasis. **Nature genetics**, v. 52, n. 7, p. 642-643, 2020.
- GRETEN, Florian R.; GRIVENNIKOV, Sergei I. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. **Immunity**, v. 51, n. 1, p. 27-41, 2019.
- GRIVENNIKOV, Sergei I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.
- GRONERT K, Martinsson-Niskanen T, Ravasi S, Chiang N, Serhan CN. Selectivity of recombinant human leukotriene D(4), leukotriene B(4), and lipoxin A(4) receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA(4) and regulation of vascular and inflammatory responses. **AmJPathol**, v.158, n.1, p. 3-9, 2001.

GUERRIERO, Jennifer L. Macrophages: the road less traveled, changing anticancer therapy. **Trends in molecular medicine**, v. 24, n. 5, p. 472-489, 2018.

GUPTA, Sahil et al. IL-6 augments IL-4-induced polarization of primary human macrophages through synergy of STAT3, STAT6 and BATF transcription factors. **Oncoimmunology**, v. 7, n. 10, p. e1494110, 2018.

HANAHAAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer, **Cell**, v. 100, n.1, p. 57-70, 2000.

HANAHAAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAO, Ning-Bo et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

HASITA H, KOMOHARA Y, OKABE H, MASUDA T, OHNISHI K, LEI XF, et al. Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. **Cancer Sci**, v. 101, p. 1913-9, 2010.

HARDIN, Amy O. et al. SHP-1 inhibits LPS-mediated TNF and iNOS production in murine macrophages. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 342, n. 2, p. 547-555, 2006.

HATTORI, Koichi et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone-marrow microenvironment. **Nature medicine**, v. 8, n. 8, p. 841-849, 2002.

HIRANO T, ISHIHARA K, HIBI M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. **Oncogene**, v.19, p.2548-56, 2000.

HIRATSUKA, Sachie et al. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. **Cancer research**, v. 61, n. 3, p. 1207-1213, 2001.

HIRATSUKA, Sachie et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. **Cancer cell**, v. 2, n. 4, p. 289-300, 2002.

HODI FS. Well-defined melanoma antigens as progression markers for melanoma: insights into differential expression and host response based on stage. **Clin Cancer Res**, v. 12 p. 673-8, 2006.

HUANG, Liwen et al. HCPTPA, a protein tyrosine phosphatase that regulates vascular endothelial growth factor receptor-mediated signal transduction and biological activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 53, p. 38183-38188, 1999.

HUME, David A. The many alternative faces of macrophage activation. **Frontiers in**

immunology, v. 6, 2015.

HUNTER, Tony. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 2, p. 140-146, 2009.

HUTCHINS, Andrew P.; DIEZ, Diego; MIRANDA-SAAVEDRA, Diego. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. **Briefings in functional genomics**, v. 12, n. 6, p. 489-498, 2013.

HUYNH, Jennifer et al. Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer—using tissue repair as a road map. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 2, p. 82-96, 2019.

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

JETTEN, Nadine et al. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. **Angiogenesis**, v. 17, n. 1, p. 109-118, 2014.

JOYCE, Johanna A.; POLLARD, Jeffrey W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239-252, 2009.

KAMRAN, M.Z., PATIL, P., GUDE, RP. Role of STAT3 in Cancer Metastasis and Translational Advances. **BioMed Research International**, v.2013, 2013.

KAPLAN, Rosandra N. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 820-827, 2005.

KARAMAN, Sinem; LEPPÄNEN, Veli-Matti; ALITALO, Kari. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. **Development**, v. 145, n. 14, 2018.

KODAMA, Takayuki et al. CCL3–CCR5 axis contributes to progression of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and invasion via Akt and ERK pathways. **Laboratory Investigation**, v. 100, n. 9, p. 1140-1157, 2020.

KOMOHARA Y, OHNISHI K, KURATSU J, TAKEYA M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. **J Pathol**, v. 216, p. 15-24, 2008.

KORNILUK, A. et al. From inflammation to cancer. **Irish Journal of Medical Science**, v. 186, n. 1, p. 57-62, 2017.

KOWANETZ M, FERRARA N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. **Clin Cancer Res**, v. 12, p. 5018-22, 2006.

KOZICKY LK, SLY LM. Phosphatase regulation of macrophage activation. **Semin Immunol**. v. 27, n. 4, p. 276-85, 2015.

KRISHNA M, NARANG H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 22, p.3525-44, 2008.

KRÖTZ, Florian et al. The tyrosine phosphatase, SHP-1, is a negative regulator of endothelial superoxide formation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 45, n. 10, p. 1700-1706, 2005.

LACAL, Pedro Miguel; GRAZIANI, Grazia. Therapeutic implication of vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) targeting in cancer cells and tumor microenvironment by competitive and non-competitive inhibitors. **Pharmacological research**, v. 136, p. 97-107, 2018.

LALA, P. K. Significance of nitric oxide in carcinogenesis, tumor progression and cancer therapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 17, n. 1, p. 1-6, 1998.

LAOUI, Damya et al. Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. **Cancer research**, v. 74, n. 1, p. 24-30, 2014.

LEE, Kun-Yeong. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. **Medical Biological Science and Engineering**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2019.

LI, Ning et al. PTEN inhibits macrophage polarization from M1 to M2 through CCL2 and VEGF-A reduction and NHERF-1 synergism. **Cancer biology & therapy**, v. 16, n. 2, p. 297-306, 2015.

LI, Y. et al. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. **Oncogene**, v. 30, n. 36, p. 3887-3899, 2011.

LI, Zhenning; LIU, Fa-yu; KIRKWOOD, Keith L. The p38/MKP-1 signaling axis in oral cancer: Impact of tumor-associated macrophages. **Oral Oncology**, v. 103, p. 104591, 2020.

LIN, Elaine Y. et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. **Cancer research**, v. 66, n. 23, p. 11238-11246, 2006.

LIU, Chun-Yu et al. Obatoclax analog SC-2001 inhibits STAT3 phosphorylation through enhancing SHP-1 expression and induces apoptosis in human breast cancer cells. **Breast cancer research and treatment**, v. 146, n. 1, p. 71-84, 2014.

LYDEN, David et al. Impaired recruitment of bone-marrow–derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. **Nature medicine**, v. 7, n. 11, p. 1194-1201, 2001.

LU, Haitian; OUYANG, Weiming; HUANG, Chuanshu. Inflammation, a keyevent in cancer development. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. 4, p. 221-233, 2006.

MADERNA, Paola et al. Lipoxins induce actin reorganization in monocytes and macrophagesbutnotinneutrophils: differential involvement of rho GTPases. **The**

American journal of pathology, v. 160, n. 6, p. 2275-2283, 2002.

MAGLIONE, Domenico et al. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 20, p. 9267-9271, 1991.

MAJIDPOOR, Jamal; MORTEZAEE, Keywan. Steps in metastasis: an updated review. **Medical Oncology**, v. 38, n. 1, p. 1-17, 2021.

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

MANTOVANI, Alberto et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in immunology**, v. 23, n. 11, p. 549-555, 2002.

MANTOVANI, A., ALLAVENA, P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. **J. Exp. Med.** v.212, p.435–445, 2015.

MANTOVANI, Alberto et al. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunology today**, v. 13, n. 7, p. 265-270, 1992.

MAZZIERI, Roberta et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. **Cancer cell**, v. 19, n. 4, p. 512-526, 2011.

MENDES, Gelcio Luiz Quintella et al. **Melanoma Invasivo: mortalidade no Brasil e sobrevida hospitalar em centro de referência oncológica no Rio de Janeiro.** 2010. Tese de Doutorado.

MIN, Aung Kyi Thar et al. Therapeutic potential of anti-VEGF receptor 2 therapy targeting for M2-tumor-associated macrophages in colorectal cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 70, n. 2, p. 289-298, 2021.

MITCHELL S, THOMAS G, HARVEY K, COTTELL D. Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 10, p. 2497-507, 2002.

MORTEZAEE, Keywan. CXCL12/CXCR4 axis in the microenvironment of solid tumors: A critical mediator of metastasis. **Life sciences**, v. 249, p. 117534, 2020.

MOULD, Arne W. et al. Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 48, n. 9, p. 2660-2669, 2003.

MOVAHEDI, Kiavash; VAN GINDERACHTER, Jo A. The ontogeny and microenvironmental regulation of tumor-associated macrophages. **Antioxidants & redox signaling**, v. 25, n. 14, p. 775-791, 2016.

MU, Xianmin et al. Tumor-derived lactate induces M2 macrophage polarization via the activation of the ERK/STAT3 signaling pathway in breast cancer. **Cell Cycle**, v. 17, n. 4, p. 428-438, 2018

MURDOCH, Craig et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nature reviews cancer**, v. 8, n. 8, p. 618-631, 2008.

MURAMATSU, Masashi et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes mobilization of macrophage lineage cells from bone marrow and stimulates solid tumor growth. **Cancer research**, v. 70, n. 20, p. 8211-8221, 2010.

NASCIMENTO-SILVA, Vany et al. Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A4 induces heme oxygenase-1 in endothelial cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 289, n. 3, p. C557-C563, 2005.

NATHAN, Carl. Points of control in inflammation. **Nature**, v.420, n.6917, p.846- 852, 2002.

NIU, G., et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. **Oncogene**, v. 21, n13, p. 2000–2008, 2002.

NOY, Roy; POLLARD, Jeffrey W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 49-61, 2014.

NOZAKI, Miho et al. Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 2, p. 422-429, 2006.

ODEGAARD, Justinl.; CHAWLA, Ajay. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. **Nature clinical practice endocrinology & metabolism**, v. 4, n. 11, p. 619-626, 2008.

OLEA-FLORES, Monserrat et al. Extracellular-signal regulated kinase: a central molecule driving epithelial–mesenchymal transition in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 12, p. 2885, 2019.

OMHOLT, K.; PLATZ, A.; KANTER, L.; RINGBORG, U.; HANSSON, J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. **Clin. Cancer Res**, v. 9, p. 6483–6488, 2003

ONUCHIC, Ana Cláudia; CHAMMAS, Roger. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

O'SHEA, John J.; MURRAY, Peter J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 477-487, 2008.

OTROCK, Z.K; MAKAREM, J.A., SHAMSEDDINE, A.I. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. **Blood Cells Mol. Dis.**, 38, pp. 258-268, 2007.

OKUYAMA, Hiroaki; INOUE, Masahiro. Hypoxic microenvironment and cancer dormancy. **Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy**, v. 38, n. 10, p. 1559-1564, 2011.

OSTUNI, Renato et al. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. **Trends in immunology**, v. 36, n. 4, p. 229-239, 2015.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Cancer Metastasis Rev**, v. 8, p.98-101, 1989.

PEI D., NEEL, B.G., WALSH, C.T. Overexpression, purification, and characterization of SHPTP1, a Src homology 2-containing protein-tyrosine- phosphatase. **PNAS**, v.90, n. 3, p.1092-1096, 1993.

PRASAD, Chandra Prakash; MOHAPATRA, Purusottam; ANDERSSON, Tommy. Therapy for BRAFI-resistant melanomas: Is WNT5A the answer? **Cancers**, v. 7, n. 3, p. 1900-1924, 2015.

PRENEN, Hans; MAZZONE, Massimiliano. Tumor-associated macrophages: a short compendium. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 8, p. 1447-1458, 2019.

PHILIP, M., ROWLEY, D.A., SCHREIBER, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction, **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, p. 433-439, 2004.

QIAN, Bin-Zhi et al. FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 9, p. 1433-1448, 2015.

RAKOFF-NAHOUM, Seth. Why cancer and inflammation. **Yale J Biol Med**, v. 79, n. 3-4, p. 123-30, 2006.

RAUNIYAR, Khushbu; JHA, Sawan Kumar; JELTSCH, Michael. Biology of vascular endothelial growth factor C in the morphogenesis of lymphatic vessels. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 6, p. 7, 2018.

RÉBÉ, Cédric; GHIRINGHELLI, François. STAT3, a master regulator of anti-tumor immune response. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1280, 2019.

REGO, Dorothy et al. IL-6 Production Is Positively Regulated by Two Distinct Src Homology Domain 2-Containing Tyrosine Phosphatase-1 (SHP-1)–Dependent CCAAT/Enhancer-Binding Protein β and NF- κ B Pathways and an SHP-1–Independent NF- κ B Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated Bone Marrow-Derived Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 9, p. 5443-5456, 2011.

REVATHIDEVI, Sundaramoorthy; MUNIRAJAN, Arasambattu Kannan. Akt in cancer: mediator and more. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, p. 80-91, 2019.

RIDKER PM, MACFADYEN JG, THUREN T, EVERETT BM, LIBBY P & GLYNNR.J. Effect of interleukin-1beta inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**. v. 390, p. 1833–1842, 2017.

ROLNY, Charlotte et al. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PIGF. **Cancer cell**, v. 19, n. 1, p. 31-44, 2011.

ROMANO, Mario. Lipid mediators: lipoxin and aspirin-triggered 15-epi- lipoxins. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)**, v. 5, n. 2, p. 81-90, 2006.

RUSSELL, RONAN et al. Lipoxin A4 is a novel estrogen receptor modulator. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 12, p. 4326-4337, 2011.

SAWANO A, et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. **Blood**, v. 97, p. 785-91, 2001.

SCHALDACH CM, RIBY J, BJELDANES LF. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. **Biochemistry**, v. 38, p. 7594-600, 1999.

SERHAN, Charles N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92-101, 2014.

SERHAN CN, CHIANG N, VAN DYKE TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature reviews Immunology**, v. 8(5), p. 349-361, 2008

SERHAN CN, HAMBERG M, SAMUELSSON B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Proc Natl Acad Sci**. v.81, n.17, p. 5335-9, 1984.

SERHAN CN, MADDOX JF, PETASIS NA, AKRITOPOULOU-ZANZE I, PAPAYIANNI A, BRADY HR, COLGAN SP, MADARA JL. Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. **Biochemistry**, v. 34(44), p. 14609-15, 1995.

SERHAN CN, SHEPPARD KA. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. **J Clin Invest**, v. 85(3), p. 772-80, 1990.

SHARMA, Yadhu et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-1: resurgence as new drug target for human autoimmune disorders. **Immunologic research**, v. 64, n. 4, p. 804-819, 2016.

SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.

SHI, Chao; PAMER, Eric G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 11, p. 762-774, 2011.

SHIBUYA M, et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. **Oncogene**, v.5, p.519-24, 1990.

SICA, Antonio et al. Macrophage polarization in pathology. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 21, p. 4111-4126, 2015.

SICA, Antonio. *et al.* Macrophage polarization in tumour progression. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press. p. 349-355, 2008

SICA, Antonio; MANTOVANI, Alberto. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 3, p. 787-795, 2012.

SICA, Antonio; MELILLO, Giovanni; VARESI, Luigi. Hypoxia: a double-edged sword of immunity. **Journal of molecular medicine**, v. 89, n. 7, p. 657-665, 2011.

SICA, Antonio; SACCANI, Alessandra; MANTOVANI, Alberto. Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. **International immunopharmacology**, v. 2, n. 8, p. 1045-1054, 2002.

SIMÕES, Rafael L.; FIERRO, Iolanda M. Involvement of the Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway on human monocyte chemotaxis induced by ATL-1, an aspirin-triggered lipoxin A4 synthetic analog. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 3, p. 1843-1850, 2005.

SIMÕES RL, DE-BRITO NM, CUNHA-COSTA H, MORANDI V, FIERRO IM, ROITTI M, BARJA-FIDALGO C. Lipoxin A4 selectively programs the profile of M2 tumor-associated macrophages which favour control of tumor progression. **Int J Cancer**, v. 140, n.2, p. 346-357, 2017.

SIMÕES, R. L. e col. A synthetic analog of 15-epi-lipoxin A4 inhibits human monocyte apoptosis: involvement of ERK2 and PI3-kinase. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v. 91, n. 1-2, p. 10-7, 2010.

SINGH N, BABY D, RAJGURU JP, PATIL PB, THAKKANAVAR SS, PUJARI VB. Inflammation and cancer. **Ann Afr Med**, v. 18, n. 3, p. 121-126, 2019.

SMYTH, Mark J.; DUNN, Gavin P.; SCHREIBER, Robert D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Advances in immunology**, v. 90, p. 1-50, 2006.

SHRIVASTAVA, Richa et al. M2 polarization of macrophages by Oncostatin M in hypoxic tumor microenvironment is mediated by mTORC2 and promotes tumor growth and metastasis. **Cytokine**, v. 118, p. 130-143, 2019.

SONG, G., G. OUYANG, AND S. BAO. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **J. Cell. Mol. Med.** v. 9, p. 59–71, 2005.

SIVEEN, Kodappully Sivaraman et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Tumour Vascularization: Potential and Challenges. **Current vascular pharmacology**, v. 15, n. 4, p. 339, 2017.

STACKER, Steven A. et al. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 45, p. 32127-32136, 1999.

SUN Z, YAO Z, LIU S, TANG H, YAN X. An oligonucleotide decoy for Stat3 activates the immune response of macrophages to breast cancer. **Immunobiology**, v. 211, p.199-209, 2006.

SU, Jung-Chen et al. Disrupting VEGF-A paracrine and autocrine loops by targeting SHP-1 suppresses triple negative breast cancer metastasis. **Scientific reports**, v. 6, p. 28888, 2016.

SULLIVAN, Laura A.; BREKKEN, Rolf A. The VEGF family in cancer and antibody based strategies for their inhibition. In: **MAbs**. Taylor & Francis, 2010. p. 165-175.

SUNG, Hyuna et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAMIR, Idan; DAL PORTO, Joseph M.; CAMBIER, John C. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction. **Current opinion in immunology**, v. 12, n. 3, p. 307-315, 2000.

TAYLOR, Philip R.; GORDON, Siamon. Monocyte heterogeneity and innate immunity. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 2-4, 2003.

TODORIC, J., ANTONUCCI, L., KARIN, M. Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. **Cancer Prev Res**, v. 9(12), p. 895-905, 2016.

TONKS, Nicholas K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 7, n. 11, p. 833-846, 2006.

TORISU, Hitoe et al. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: Possible involvement of TNF α and IL-1 α . **International journal of cancer**, v. 85, n. 2, p. 182-188, 2000.

TOWNLEY R, SHEN SH, BANVILLE D, RAMACHANDRAN C.. Inhibition of the activity of protein tyrosine phosphate 1C by its SH2 domains. **Biochemistry**, v. 32, p. 13414– 13418, 1993.

VALERIO, Michael; AWAD, Atif B. β -Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A. 1 murine macrophages. **International**

immunopharmacology, v. 11, n. 8, p. 1012-1017, 2011.

VAN DE LAAR, Lianne et al. Yolk sac macrophages, fetal liver, and adult monocytes can colonize an empty niche and develop into functional tissue-resident macrophages. **Immunity**, v. 44, n. 4, p. 755-768, 2016.

VANO Y., GIRALDO N.A., FRIDMAN W.H., SAUTÈS-FRIDMAN C. The Human Tumor Microenvironment. In: Zitvogel L., Kroemer G. (eds) **Oncoimmunology**. Springer, Cham, 2018

VERDEIL, Grégory et al. Targeting STAT3 and STAT5 in tumor-associated immune cells to improve immunotherapy. **Cancers**, v. 11, n. 12, p. 1832, 2019.

VERGADI, E, et al. Akt 2 deficiency protects from acute lung injury via alternative macrophage activation and miR-146a induction in mice. **J. Immunol.** v. 192, p. 394–406, 2014.

VERGADI, Eleni et al. Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 3, p. 1006-1014, 2017.

VIRCHOW, Rudolf. **Cellular Pathology as Based Upon Physiological and Pathological Histology**. JB Lippincott, 1863.

WANG, Maonan et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761, 2017.

WATSON, H. Angharad et al. SHP-1: the next checkpoint target for cancer immunotherapy? **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 2, p. 356-362, 2016.

WEGENKA, URSULA M. et al. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 1, p. 276-288, 1993.

WELLBROCK, Claudia; HURLSTONE, Adam. BRAF as therapeutic target in melanoma. **Biochemical pharmacology**, v. 80, n. 5, p. 561-567, 2010.

WHO, World Health Organization, disponível em <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index2.html>> Acesso em: 02 de junho de 2018.

WITKIEWICZ, Agnieszka et al. Loss of SHP-1 tyrosine phosphatase expression correlates with the advanced stages of cutaneous T-cell lymphoma. **Human pathology**, v. 38, n. 3, p. 462-467, 2007.

WU C, SUN M, LIU L, ZHOU GW: The function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in cancer. **Gene**, v. 306, p. 1–12, 2003.

WUS., LU, C., DONG, L., ZHOU, G., GUANGZ., CHEN, Z. Lipoxin A4 inhibits TNF- α -induced production of interleukins and proliferation of rat mesangial cells,

Kidney International, v. 68, p35-46, 2005.

WYNN TA, CHAWLA A, POLLARD JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, p. 445-55, 2013.

XUE, Qingjie et al. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 12, p. 3805, 2018.

YANG, Jian et al. Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 8, p. 6516-6520, 2003.

YANG, Jian et al. Tumor-associated macrophages regulate murine breast cancer stem cells through a novel paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 signaling pathway. **Stem cells**, v. 31, n. 2, p. 248-258, 2013.

YANG SH, SHARROCKS AD, WHITMARSH AJ. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. **Gene**, v. 513, n. 1, p. 1–13, 2013.

YANG, Xiaojuan et al. VEGF-B promotes cancer metastasis through a VEGF-A-independent mechanism and serves as a marker of poor prognosis for cancer patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 22, p. E2900-E2909, 2015.

YE RD, BOULAY F, WANG JM, DAHLGRENC, GERARD C, PARMENTIER M. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. **Pharmacol Rev**, v. 61, p. 119 – 161, 2009.

YOSHIMURA A, NAKA T, KUBO M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nat Rev Immunol**, v.7, p. 454-65, 2007.

YU, Hua; PARDOLL, Drew; JOVE, Richard. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nature reviews cancer**, v. 9, n. 11, p. 798-809, 2009.

ZHANG, B., MA, Y., GUO, H., SUN, B., NIU, R., YING, G., ZHANG, N. Akt2 is required for macrophage chemotaxis. **Eur. J. Immunol.** v.39, p. 894–901, 2009.

ZHANG, Jinyi; SOMANI, Ally-Khan; SIMINOVITCH, Katherine A. Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2000. p. 361-378.

ZHANG, Jun et al. Tumor hypoxia enhances non-small cell lung cancer metastasis by selectively promoting macrophage M2 polarization through the activation of ERK signaling. **Oncotarget**, v. 5, n. 20, p. 9664, 2014.

ZHANG, Li et al. Annexin A1 Mimetic Peptide AC2-26 Inhibits Sepsis-induced Cardiomyocyte Apoptosis through LXA4/PI3K/AKT Signaling Pathway. **Current Medical Science**, v. 38, n. 6, p. 997-1004, 2018.

ZHANG, Qi; ZHU, Bo; LI, Yongsheng. Resolution of cancer-promoting inflammation:

a new approach for anticancer therapy. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 71, 2017.

ZHANG, Ting; HAO, Hua; ZHOU, Xiao-Yan. The role of lipoxin in regulating tumor immune microenvironments. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 144, p. 106341, 2019.

ZHANG, Yan et al. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. **Cell research**, v. 23, n. 7, p. 898-914, 2013.

ZHANG ZY: Protein tyrosine phosphorylases: prospects for therapeutics. **Curr Opin Chem Biol**. v.5, p. 416–423, 2001.

ZHENG X, TURKOWSKI K, MORA J, et al. Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy. **Oncotarget**, v.8, n.29, p.48436-48452, 2017.

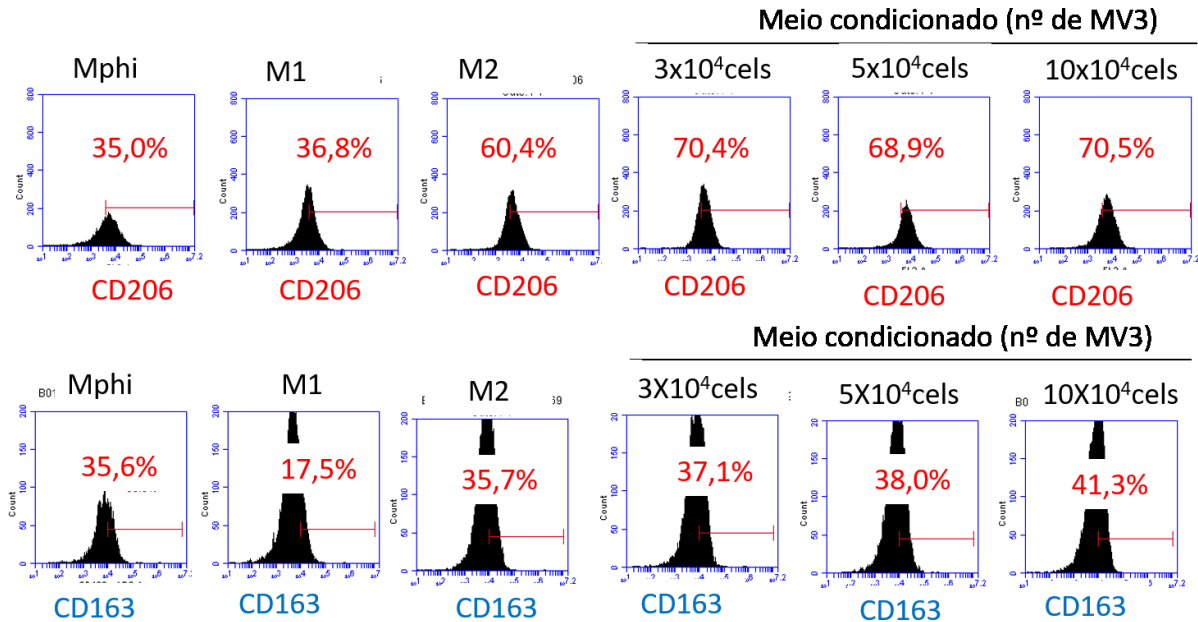
ZHOU, Delu et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-1 positively regulates TLR-induced IL-12p40 production in macrophages through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 5, p. 845-855, 2010.

ZHOU, Xu; QI, Ying. Larynx carcinoma regulates tumor-associated macrophages through PLGF signaling. **Scientific reports**, v. 5, p. 10071, 2015.

ZONARI, E., F. PUCCI, M. SAINI, R. MAZZIERI, L. S. POLITI, B. GENTNER, L. NALDINI. A role for miR-155 in enabling tumor-infiltrating innate immune cells to mount effective antitumor responses in mice. **Blood** v. 122, p. 243–252, 2013.

APÊNDICE – Figuras da metodologia

Figura 21 - Padronização do meio condicionado



Legenda: Obtenção do Meio Condicionado. Células MV3 (3-10x10⁴ células/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços por 3 dias. O sobrenadante produzido foi centrifugado e congelado a -80°C. Os monócitos (1x10⁶ células) diferenciados em macrófagos após 7 dias de incubação foram estimulados por 3 dias adicionais com: LPS (1 µg/µL) e IFN-γ (100 nM) para indução de um perfil M1; com IL-4 (40 µg/µL) para obtenção de um perfil M2. Para a indução de TAMs, os macrófagos foram incubados por 3 dias com meio condicionado (1:1) derivado de células MV3 (3, 5 ou 10 x 10⁴ cels.) cultivadas durante 24 horas ou 72 horas. Após esse tempo, o perfil dos macrófagos foi analisado por citometria de fluxo utilizando os marcadores CD86 (M1) e CD163-APC (M2). Resultado representativo de dois experimentos diferentes.

Fonte: A autora, 2021.