



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

Hayandra Cunha da Costa

**Papel do microambiente tumoral na modulação de monócitos e dos
macrófagos associados ao tumor**

Rio de Janeiro

2016

Hayandra Cunha da Costa

**O papel do microambiente tumoral na modulação de monócitos e dos
macrófagos associados ao tumor**

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

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

Coorientador : Prof. Dr. Rafael Loureiro Simões

Rio de Janeiro

2016

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

C837 Costa, Hayandra Cunha da.
O papel do microambiente tumoral na modulação de monócitos e macrófagos associados ao tumor / Hayandra Cunha da Costa. – 2016. 90 f.
Orientadora: Thereza Christina Barja-Fidalgo
Coorientador: Rafael Loureiro Simões
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.
1. Tumores – Teses. 2. Microambiente tumoral. 3. Matriz extracelular – Teses. 4. Monócitos - Teses. 5. Lipoxinas - Teses. 6. Macrófagos - Teses. I. Barja-Fidalgo, Thereza Christina. 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: Angela da Silva Velho - CRB7/4780

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

Assinatura

Data

Hayandra Cunha da Costa

**O papel do microambiente tumoral na modulação de monócitos e dos
macrófagos associados ao tumor**

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

Aprovada em 29 de fevereiro de 2016.

Orientadora: Prof. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Loureiro Simões
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Kátia Costa de Carvalho Sabino
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Alessandra Mattos Saliba
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Dra. Nathalia de Oliveira Meireles da Costa
Instituto Nacional do Câncer

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedicada a minha avó Severina Maria da Cunha.

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 com toda a paciência do mundo, por me ajudar no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela motivação constante, por todos os ensinamentos e, acima de tudo, por acreditar sempre em mim, quando nem eu mesma acreditava.

Ao Prof. Dr. João Moraes, por revisar esta dissertação, e por ser o maior responsável por desconstrair nosso ambiente de trabalho.

À Natália Mesquita, pela grande amizade, momentos divertidíssimos, risos, por tudo... e em muitos momentos ser minha co-co-orientadora. Minha irmã científica de coração, sem a sua ajuda, nem que fosse no apoio moral, eu não conseguiria. Você transmite segurança e tranquilidade.

À Roberta e Cristiane e Si, pela grande ajuda nos momentos finais, pelos conselhos, pela força, pelo cuidado, pelos chopps, por me fazerem saber que, qualquer fosse a situação, vocês estariam por perto me apoiando. E claro por todas as risadas garantidas. Beta, obrigada pelo carinho e cuidado sempre, como se fosse uma mãe.

À Thais, por estar nesta loucura comigo desde a seleção mestrado, me fazendo acreditar que tudo daria certo, por apenas me ouvir, e compartilhar de todas as maluquices.

À Gabi, que além da ajuda técnica imprescindível, se tornou uma grande e maravilhosa amiga. A Thamirys pelos abraços e cuidado nutricional e a Ághata por me fazer rir nos momentos certos.

À Gabi Medeiros, pelo cuidado e carinho desde a graduação. Sua amizade é um grande tesouro.

A minha amada afilhada Karine, pela amizade e cumplicidade, e ao meu afilhado Davi, pelas constantes brincadeiras. Agora sou parte da família, amo vocês.

As minhas irmãs escolhidas de coração, Suiane e Tatiana, por me apoiarem e cuidarem de mim e não deixarem a minha revolta se tornar maior que eu.

A minha amada banda Nova Era Kotekitai, pelo ser humano que me tornei.

A minhas irmãs-kotekis Erica, Bianca, Gabriella, Olivia, Luiza, Angel, Roberta, Luana, Núbia, Babi, Bethinha, Silvinha por todos os momentos vividos juntos.

A todos do lab, Vany, Genílson, Mariana, Marta, Daniel, Clarinha, Isadora, Taís, Renatinha, Edward, Andreza, Mariele, Mauro e Júlia por toda a ajuda e por fazerem a bancada um excelente lugar para se trabalhar.

Ao meu amigo Caio, por não esquecer de mim e sempre me encorajar a tudo.

Ao 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. Nome Completo. **O papel do microambiente tumoral na modulação de monócitos e macrófagos associados ao tumor**. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O conceito de que o microambiente tumoral desempenha um papel importante na regulação do comportamento celular tornou-se cada vez mais aceito no estudo da biologia do câncer. Monócitos e macrófagos, células com papel importante na resposta imune e no processo inflamatório desempenham diversas funções, modulando diferentes etapas do desenvolvimento tumoral. Durante muito tempo os monócitos foram considerados como uma população homogênea de células, porém a sua heterogeneidade fenotípica já é bem descrita. Atualmente, os monócitos são divididos em três subpopulações e podem ser classificados como: monócitos clássicos caracterizados pela alta expressão de CCR2 e baixos níveis de CX3CR1, monócitos intermediários caracterizados pela expressão de CX3CR1, os monócitos não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺ ou CD14^{dim}CD16⁺) caracterizando-se por não apresentarem CCR2 e altos níveis de CX3CR1. Os macrófagos são as principais células não tumorais presentes no microambiente tumoral, possuindo dois perfis de ativações: um M1 com características pró-inflamatórias e antitumorais e um perfil M2 anti-inflamatório e pró-tumoral. No microambiente tumoral, os macrófagos são denominados TAM, do inglês, *tumor associated macrophage*, possuindo um perfil semelhante ao M2. Neste cenário a matriz extracelular desempenha um papel significativo na regulação de numerosas funções celulares, tais como adesão, migração, proliferação, polaridade celular, diferenciação e a apoptose. Em condições patológicas, como o câncer, há uma alteração na composição da MEC, decorrente do aumento da síntese de certos componentes da matriz extracelular e/ou aumento da degradação como consequência da geração de produtos de clivagem de MEC, resultando em um fenótipo tumoral muito mais agressivo que contribui para o crescimento e progressão tumorais. Lipoxinas (LX) são metabólitos do ácido araquidônico, produzidos *in vitro* e *in vivo* pela ação sequencial de diferentes lipoxigenases, com importantes papéis anti-inflamatórios e durante a resolução da inflamação. Este trabalho investiga o papel de componentes do microambiente tumoral, meio condicionado secretado e a matriz extracelular produzidos pela célula tumoral, na ativação e modulação dos monócitos e macrófagos, bem como o efeito da lipoxina na modulação de monócitos e macrófagos ativados por este microambiente tumoral. Neste trabalho, os componentes do microambiente tumoral, alteram o perfil funcional de monócitos sanguíneos diminuindo a expressão de CX3CR1 e CD16, principalmente pela diminuição da população de monócitos intermediários. Estes componentes regulam efeitos funcionais da progressão tumoral, como aumento da relação iNOS/Arginase, aumento da migração e adesão celular. Nos macrófagos a MEC induz uma polarização M2, aumentando a expressão dos principais marcadores M2, CD206 e CD163. Tanto em monócitos como macrófagos, a lipoxina exerce um efeito regulatório, alterando o perfil destas células, bem como revertendo os efeitos pró-tumorais induzido pelos componentes do microambiente tumoral. Estes dados enaltecem o importante papel da lipoxina no controle tumoral e contribuem para o desenvolvimento de novas ferramentas a serem utilizadas no estudo e tratamento desta doença.

Palavras-chave: Microambiente tumoral. Matriz Extracelular. Monócitos. Macrófagos associados ao tumor. Lipoxina.

ABSTRACT

COSTA, Hayandra Cunha. ***The role of tumor microenvironment in modulating monocytes and macrophages to the tumor associated.*** 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The concept that the tumor microenvironment plays an important role in the regulation of cell behavior has become increasingly accepted in the study of cancer biology. Monocytes and macrophages play important roles in the immune and inflammation response by modulating different stages of tumor development. For a long time, monocytes were considered as a homogeneous population, but now its phenotypic heterogeneity is well described. Currently, monocytes are divided into three subsets and can be classified as classical monocytes characterized by high expression of CCR2 and low levels of CX3CR1, intermediate monocytes characterized by CX3CR1 expression, and non-classical monocytes (CD14⁺ CD16⁺⁺ or CD14^{dim}CD16⁺) characterizing by low levels of CCR2 and high levels of CX3CR1. Monocyte-derived macrophages are the major non-tumor cells present in the microenvironment, and could be characterized by two profiles of activation: M1 macrophages, with pro-inflammatory and antitumoral activity; and M2 macrophage, with anti-inflammatory and pro-tumor properties. In the tumor microenvironment, macrophages are denominated tumor associated macrophage (TAM), sharing similar characteristics to M2 profile. In this scenario, extracellular matrix plays an important role in regulating various cell functions such as adhesion, migration, proliferation, polarity, differentiation and apoptosis. In pathological conditions like cancer, there is a change in the composition of the extracellular matrix, due to increased synthesis of certain components of the extracellular matrix and / or increased degradation as a result of the generation of ECM cleavage products, resulting in a tumor phenotype very more aggressive that contributes to tumor growth and progression. Lipoxins (LX) are metabolites of arachidonic acid, produced *in vitro* and *in vivo* by the sequential action of different lipoxygenase, with important anti-inflammatory role and during the resolution of inflammation. This work investigates the role of components of the tumor microenvironment, conditioned medium and extracellular matrix produced by the tumor cells, in the modulation of monocytes and macrophages, as well the lipoxin effects in these cells stimulated by tumor microenvironment factors. In this work, the components of the tumor microenvironment change the functional profile of blood monocytes decreasing the expression of CX3CR1 and CD16, mainly by the decrease of intermediate monocytes population. Here, we demonstrated that these components regulate functional effects of tumor progression, increasing iNOS/ arginase ratio, migration and cellular adhesion. In macrophages ECM induces M2 polarization, increasing the expression of CD206 and CD163, key markers M2 profile. Lipoxin shift the monocytes and macrophage profile induced by tumor components, and reverts pro-tumoral functions triggered by the tumor microenvironment factors. Together, these results highlights the important role of lipoxin in tumor control, contributing to the study and possible development of new tools to be used in the treatment of this disease.

Keywords: Tumor microenvironment. Extracellular matrix. Monocytes. Tumor associated macrophages. Lipoxin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	As principais características do câncer.....	19
Tabela 1 –	Subpopulações de monócitos em humanos e em camundongos	24
Figura 2 –	Subtipos de monócitos em humanos.....	25
Figura 3 –	As principais funções da Matriz.....	28
Figura 4 –	A MEC e Câncer.....	29
Figura 5 –	Os principais componentes do Microambiente Tumoral.....	32
Figura 6 –	Diferentes fenótipos dos TAM na tumorigênese.....	33
Figura 7 –	As 3 vias de Biossíntese das Lipoxinas e “aspirin-triggered-lipoxins” (ATL).....	36
Figura 8 –	Lipoxinas e seus efeitos.....	38
Figura 9 –	Desenho esquemático do processo de obtenção da matriz extracelular.....	49
Figura 10 –	Componentes do microambiente tumoral diminuem a expressão de CD16 ⁺ em monócitos humanos.....	56
Figura 11 –	Componentes do microambiente tumoral diminuem a subpopulação de monócitos intermediários....	57
Figura 12 –	O ATL-1 inibe o efeito do meio condicionado sobre a expressão de CX3CR1.....	59
Figura 13 –	O ATL-1 aumenta a relação iNOS/Arginase-1 em tempos iniciais dos monócitos na presença do meio condicionado.....	60
Figura 14	A MEC tumoral diminui a migração de monócitos em direção ao meio condicionado da MV3.....	63
Figura 15 –	O ATL-1 reduz a migração de monócitos para o Meio Condicionado tumoral.....	64
Figura 16 –	Componentes do microambiente tumoral regulam diferencialmente a atividade de MMP-9 / MMP-2.....	65
Figura 17 –	O ATL-1 não tem efeito na adesão de monócitos.....	66
Figura 18 –	Componentes do microambiente tumoral não afetam a viabilidade de Macrófagos.....	69
Figura 19 –	A MEC da MV3 aumenta a expressão de marcadores M2 nos	

	macrófagos.....	70
Figura 20 –	O ATL-1 diminui a expressão de marcadores M2 nos macrófagos modulados pela MEC tumoral.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
APC	Aloficocianina
APCs	Células apresentadoras de antígeno
APS	Persulfato de amônio
ATL	Lipoxina produzida por aspirina
BSA	Albumina do soro bovino
CCL2	<i>Chemokine (c-c motif) ligand 2</i>
CCR2	<i>Chemokine (c-c motif) receptor 2</i>
CCR5	<i>Chemokine (c-c motif) receptor 5</i>
CMFDA	Clorometil diacetato fluoresceína
CO ₂	Gás carbônico
COX	Ciclo-oxigenase
CX3CL1	<i>CX3 chemokine ligand 1</i>
CX3CR1	<i>CX3 chemokine receptor 1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etileno diamina tetra acético
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
FPR	Receptor para peptídeo formilados
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
IL	Interleucina
INF	Interferon
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
LX	Lipoxina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MC	Meio Condicionado
MEC	Matriz extracelular

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase
MV3	Linhagem celular de melanoma humano metastático
NFκB	Fator nuclear kappa B
NGM	Linhagem celular de melanócitos humanos
NO	Óxido nítrico
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Tampão fosfato de sódio
PE	Ficoeritrina
PECy5.5	Ficoeritrina-cianina 5.5
pH	Potencial de hidrogênio
PI3K	Fosfatidil inositol-3 quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsufonil
q.s.p.	Quantidade suficiente para
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
STAT	Fator de tradução de sinal e ativador de transcrição
TAM	Macrófagos associados ao tumor
TGF	Fator de crescimento transformante
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TLR	Receptor do tipo toll-like
TNFα	Fator de necrose tumoral
T-TBS	Tampão Tris-Tween
UV	ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
g	Gramas
g	Gravidade
κ	Kappa
L	Litro
μL	Microlitro
mm	Micrometro
mg	miligrama
mL	Mililitro
M	Molar
H_2O	Molécula da água
ηM	Nanomolar
%	Porcentagem

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1	Câncer	18
1.1.1	<u>Melanoma</u>	20
1.2	Inflamação	21
1.2.1	<u>Monócitos</u>	22
1.2.2	<u>Macrófagos</u>	25
1.3	Matriz Extracelular	27
1.4	Inflamação e Câncer	30
1.4.1	<u>Microambiente Tumoral</u>	30
1.4.2	<u>Macrófagos Associados ao Tumor</u>	32
1.5	Lipoxinas	34
1.5.1	<u>Efeitos Biológicos</u>	36
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo Geral	39
2.2	Objetivos Específico	39
3	MATERIAIS E PROTOCOLOS	40
4	METODOLOGIA	48
4.1	Linhagens Celulares	48
4.2	Cultura de células	48
4.3	Obtenção da Matriz extracelular	49
4.4	Obtenção do Meio Condicionado da MV3	50
4.5	Separação de PBMC	50
4.5.1	<u>Separação de Monócitos Humanos</u>	50
4.5.2	<u>Geração de Macrófagos Humanos</u>	51
4.6	Adesão Celular	51
4.7	Viabilidade Celular	51
4.8	Caracterização fenotípica de monócitos e macrófagos	52
4.9	Western Blotting	52
4.10	Quimiotaxia	53
4.11	Zimografia	53

4.12	Análise estatística.....	54
5	RESULTADOS.....	55
5.1	Componentes do microambiente tumoral retarda o aumento da expressão de CD16 em monócitos humanos.....	55
5.2	O ATL-1 inibe o efeito do meio condicionado sobre a expressão de CX3CR1 em monócitos humanos.....	58
5.3	O ATL-1 aumenta a relação iNOS/Arginase-1 em monócitos na presença do Meio Condicionado da MV3.....	58
5.4	A MEC tumoral não tem efeito na migração de monócitos em direção ao meio condicionado da MV3.....	61
5.5	Componentes do microambiente tumoral regulam diferencialmente a atividade de MMP-9 / MMP-2.....	61
5.6	O ATL-1 não tem efeito na adesão de monócitos.....	62
5.7	Componentes do microambiente tumoral não afetam a viabilidade de macrófagos.....	67
5.8	A MEC tumoral aumenta de marcadores M2 nos macrófagos.....	67
5.9	O ATL-1 diminui a expressão de marcadores M2 nos macrófagos modulados pela MEC tumoral.....	68
6	DISCUSSÃO.....	72
	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80

INTRODUÇÃO

A relação entre câncer e inflamação é de alta relevância. Estudos recentes têm expandido cada vez mais o conceito de que a inflamação é um componente crítico para progressão do tumor. Nesse microambiente, monócitos e macrófagos, células com papel importante na resposta imune e no processo inflamatório desempenham diferentes funções, modulando a diversas etapas do desenvolvimento tumoral.

Os monócitos são células heterogêneas divididos em três subpopulações: monócitos clássicos ($CD14^+CD16^-$) caracterizados pela alta expressão de CCR2, monócitos intermediários ($CD14^+CD16^+$), caracterizados pela expressão de CX3CR1, HLA-DR e CCR5, e os monócitos não clássicos ($CD14^{dim}CD16^+$) que não apresentam CCR2 e expressam baixos níveis de CCR5.

Os macrófagos possuem funções na manutenção da homeostase tecidual, na resposta imune a patógenos e na resolução da resposta inflamatória (Gordon e Taylor, 2005). Dependendo do estímulo presente, os macrófagos adquirem dois diferentes perfis de ativações: um perfil denominado M1, com características pró-inflamatórias e um perfil M2, com propriedades principalmente anti-inflamatórias.

A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa composta de macromoléculas, proteínas, glicoproteínas, proteoglicanas, e polissacarídeos, que montam uma estrutura tridimensional com propriedades bioquímicas e biomecânicas que servem de estrutura para os tecidos (Alberts, 2010; Lu e col., 2012). A MEC regula a homeostase, a disponibilidade de fatores de crescimento e citocinas, além de se remodelar e adaptar a sua estrutura para cada órgão e tecido, refletindo seu estado fisiológico (Whittaker e col., 2006; Albert, 2010; Ozbek e col., 2010). A degradação dos componentes da matriz extracelular dá origem a fragmentos que desempenham um papel-chave no controle de inúmeros eventos, incluindo remodelação de tecidos, inflamação, angiogênese, crescimento tumoral e metástases (Adair-Kirk T. L. e Senior R. M., 2008).

No microambiente tumoral, os macrófagos são denominados como macrófagos associados ao tumor (TAM, do inglês, *tumor associated macrophages*), e desenvolvem uma complexa função na interação com células neoplásicas. Vários estudos indicam que os TAMs são condutores de progressão tumoral, promovendo a

proliferação e sobrevivência da célula tumoral, angiogênese, secreção de fatores pró-angiogênicos, como o fator vascular endotelial de crescimento (VEGF), induzindo a vascularização do tumor e o extravasamento das células tumorais pelos novos vasos formados induzindo também a metástase (Lin e col., 2006; DeNardo e col., 2009; Ostuni e col., 2015). Durante a progressão do tumor, os TAMs geralmente adquirem um fenótipo M2-like caracterizado pela alta expressão de IL-10 e baixa expressão de IL-12, possuindo uma baixa atividade tumoricida (Sica e Mantovani, 2012). 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.

A evidente relação entre células envolvidas na resposta inflamatória e o desenvolvimento tumoral sugere que mediadores com propriedades anti-inflamatórias possam modular e controlar a progressão tumoral. Lipoxinas (LX) são metabólitos do ácido araquidônico, produzidos *in vitro* e *in vivo* pela ação sequencial de diferentes lipoxigenases, com importantes papéis anti-inflamatórios e resolutivos durante a inflamação (Serhan e col., 1984). Após ser acetilada pela Aspirina®, a COX-2 interrompe a síntese de prostanóides e a enzima passa, então, a sintetizar 15-epi-lipoxinas ou ATL (“*aspirin-triggered lipoxins*”) (Claria e Serhan, 1995). Em células mononucleares, as LX exibem atividades estimulatórias bastante específicas, induzindo um perfil M2, além de estimular a migração e adesão, porém, sem ativar características tóxicas (Maddox e Serhan, 1996). Estas atividades em células mononucleares podem ser protetoras para o hospedeiro em vista do importante papel destas células no reparo tecidual e na resolução da resposta inflamatória.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer

O câncer é definido por uma coleção de doenças relacionadas em que algumas das células do corpo começam a dividir sem controle e podem se espalhar para os tecidos circundantes (NIH, 2014). Atualmente, 20 milhões de pessoas no mundo tem câncer, totalizando 190 mil mortes por ano, sendo a segunda causa de morte no mundo ocidental. Estima-se que em 2016 serão 600 mil novos casos no Brasil, dos quais 60% serão diagnosticados com a doença em estado avançado (INCA, 2015). O câncer tornou-se um problema de saúde pública, uma vez que o tratamento é de alta complexidade e possui alto impacto socioeconômico. Sabendo que um terço dos casos de câncer pode ser evitado, o controle da doença depende da política pública e do envolvimento da sociedade (INCA, 2015).

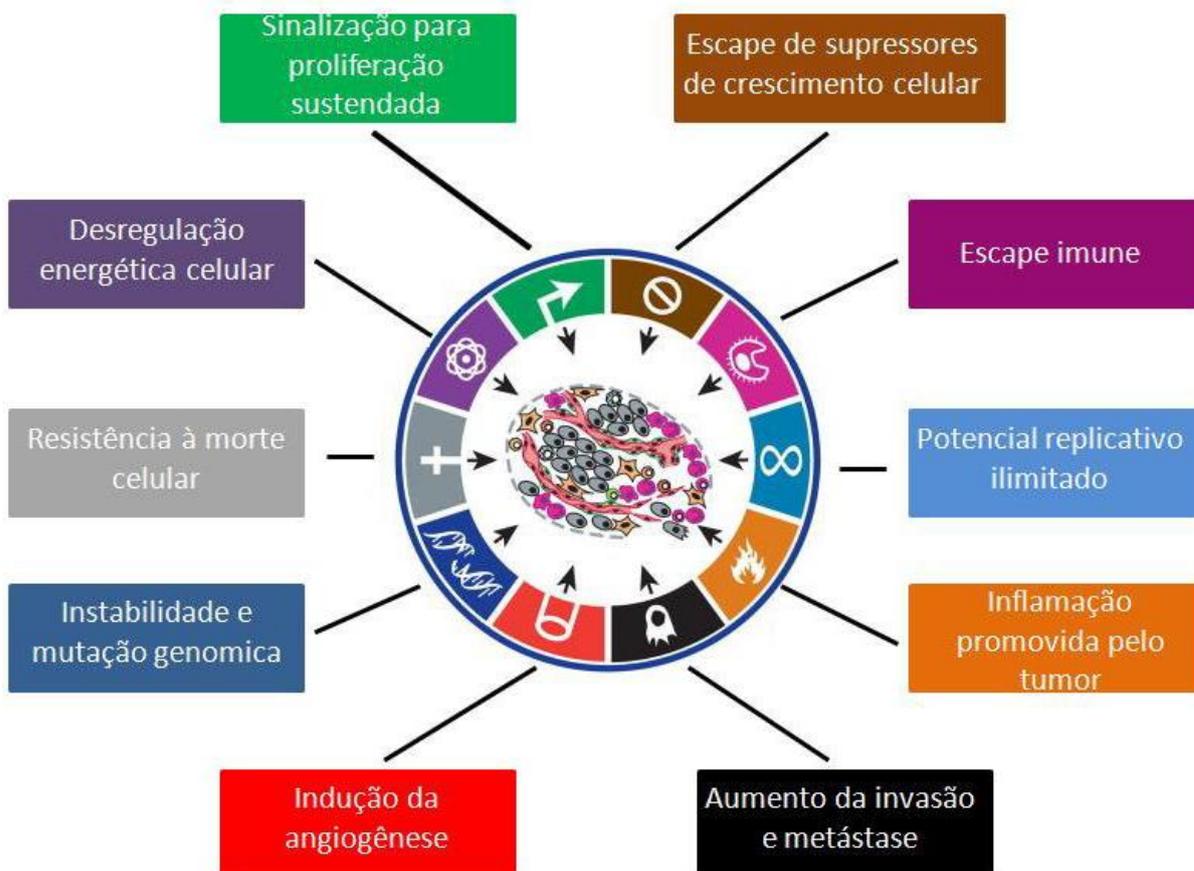
No câncer há a progressão de células normais para um estado neoplásico adquirindo características que as permitem tornarem-se tumorigênicas e, em uma última fase, células malignas (Hanahan e Weinberg, 2011). Para que isto ocorra, mutações genéticas devem ocorrer nas células normais, modificando-as e iniciando o processo tumorigênico. O câncer pode ser hereditário, decorrente de mutações genéticas pré-determinadas; ou ambiental, devido à ação de agentes mutagênicos relacionados a hábitos e costumes, tais como o tabagismo, alcoolismo, hábitos alimentares e exposição à radiação solar ou radioatividade, denominados carcinógenos (Garcia e col., 2007; Civetta e Civetta, 2011).

Existem três etapas pelas quais uma célula tumoral passa antes de originar um tumor visível. Na etapa de *iniciação*, primeira etapa da carcinogênese, as células sofrem alterações no genótipo celular, causadas por mutações pontuais, ampliações ou deleções nos genes. Na etapa de *promoção*, as células geneticamente alteradas sofrem efeito dos agentes carcinógenos, 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 (Ministério da Saúde, 1996; Civetta e Civetta, 2011). Quando há uma alteração genética em uma única célula,

essa alteração é propagada à medida que a célula se divide. Já a divisão celular, um evento normal do organismo de todos os indivíduos, é propensa a sofrer os efeitos de inúmeros carcinógenos ambientais. Para isso, entretanto, a célula tumoral deve ser capaz de romper uma série de barreiras fisiológicas e mecanismos de checagens para se tornar cancerígena (Hanahan e Weinberg, 2011).

Nesse contexto o desenvolvimento tumoral depende de um conjunto de alterações essenciais na fisiologia da célula neoplásica, como a evasão da apoptose, autossuficiência de sinais de crescimento e insensibilidade a sinais anti-crescimento, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase. Além disso, apresentam potencial replicativo ilimitado, alterações no metabolismo celular, escape das células tumorais do sistema imune, inflamação, instabilidade e mutação genômica (Figura 1) (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011).

Figura 1 – As principais características do câncer.



Legenda: As principais alterações na fisiologia da célula neoplásica durante o desenvolvimento tumoral, para a compreensão da biologia do câncer

Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011, f. 647.

1.1.1 Melanoma

O câncer de pele é uma condição maligna que começa com o crescimento excessivo e descontrolado de células anormais da pele. Os três principais tipos de câncer de pele são: carcinoma basocelular; carcinoma espinocelular e o melanoma. O melanoma forma-se a partir da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de melanina sendo, entre as neoplasias de pele, o de pior prognóstico (INCA, 2016). A incidência de câncer de pele não-melanoma e de melanoma vem aumentando nas últimas décadas. Atualmente, ocorrem globalmente entre 2 e 3 milhões de casos de câncer de pele não-melanoma e 132 mil casos de câncer de pele melanoma, o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase, sendo 10 a 20 vezes mais frequente em caucasianos (Barnhart, 2015; WHO, 2015). Estimam-se para 2016 no Brasil 5.670 novos casos, sendo 3.000 em homens e 2.670 em mulheres (INCA, 2015). 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). Nos últimos anos houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor (Sociedade brasileira de dermatologia, 2003). 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 melanoma apresenta uma fase inicial de crescimento radial, principalmente intraepidérmico, seguida por uma fase de crescimento vertical, com invasão da derme e dos vasos, iniciando a disseminação metastática. Quando não diagnosticado e, portanto, não tratado no início, o tumor tende a aumentar de tamanho em extensão e altura, com progressiva alteração de suas cores e formas originais. Posteriormente há ulceração, sangramento ou sintomas como prurido, dor ou inflamação (Freedberg e col., 2003; Atkins e col., 2008).

1.2 Inflamação

A inflamação é um processo fisiológico decorrente de uma resposta a danos no tecido que pode ser originária de infecção por patógeno microbiano, irritação química ou injúria tecidual. Na inflamação há o envolvimento de várias células do sistema imune chamadas de leucócitos. Na sua fase inicial, as primeiras células a migrar para o sítio inflamatório são os neutrófilos. Posteriormente há a participação de outros tipos de leucócitos que serão ativados e migrarão para o local inflamado através da ativação de cascata de sinalização por fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, culminando no reparo tecidual e a defesa contra a injúria tecidual (Coussens LM, Werb Z. 2002; Nathan C, 2002; Philip e col., 2004; Haitian Lu e col., 2006).

No processo inflamatório são descritos sinais cardinais: o *rubor* da área inflamada, resultado da vasodilatação local; o *edema* é resultado do acúmulo de líquido no local; a percepção de *calor* proveniente do acúmulo de sangue arterial com temperatura mais elevada na região; a *dor* que apresenta um mecanismo mais complexo envolvendo a distensão dos tecidos, a estimulação de terminações nervosas livres e a lesão tecidual direta pelo agente agressor (Kumar e col.; 2004). Estes sinais foram descritos há mais de 2000 anos e no século XIX, o patologista Rudolf Virchow adicionou o quinto sinal a esta lista: a perda de função tecidual (Kumar e col., 2010).

A inflamação aguda é autorregulada, pois a produção inicial de citocinas pró-inflamatórias é seguida pela liberação de citocinas anti-inflamatórias por leucócitos presentes no local culminando na resolução desse processo inflamatório. Já na inflamação crônica, as células do sistema imune recrutadas irão agir simultaneamente no reparo e destruição de tecidos, ativando eventos centrais neste processo, tais como angiogênese e fibrose (Philip M, 2004).

1.2.1 Monócitos

Os monócitos são células do sistema fagocítico mononuclear que consiste em células provenientes da medula óssea a partir de um precursor comum e inclui os monócitos circulantes e os macrófagos (Cotran e col., 1994). Os monócitos são recrutados da medula óssea para a circulação sanguínea, de onde migram para diversos tipos de tecido até se diferenciarem em macrófagos ou células dendríticas. Monócitos compõem a população de leucócitos mononucleares que constituem aproximadamente 10% das células no sangue periférico dos seres humanos (Chávez G, 2015).

Monócitos possuem uma grande heterogeneidade morfológica, variando de tamanho, granulosidade e morfologia nuclear. Em camundongos podemos classificar os subtipos de monócitos com diferentes marcadores, como pode ser visto na tabela 1. Em humanos, a grande diversidade fenotípica se dá pela expressão diferencial de marcadores, inicialmente identificados pela expressão de grandes quantidades de CD14, co-receptor associado a *Toll-like receptors* e pela expressão de CD16 também conhecido como receptor FcγIII. A expressão diferencial de CD14 e CD16 permite a divisão dos monócitos em diferentes subconjuntos (Gordon e Taylor, 2005).

Inicialmente foram descritas apenas 2 populações de monócitos, as CD14^{high}CD16⁻ e as CD16⁺ (Ziegler-Heitbrock e col., 1989). Atualmente tem-se descritas as 3 subpopulações de monócitos: CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺. Os monócitos CD14⁺CD16⁻, ou também CD14⁺⁺CD16⁻, são chamados de monócitos clássicos, porque este fenótipo assemelha-se a descrição original de monócitos. Este subtipo representa aproximadamente 90% dos monócitos circulantes, são os principais responsáveis pela fagocitose e produção de ROS e caracterizados pela alta expressão de CCR2 e baixos níveis de CX3CR1, além de produzirem IL-10, ao invés de TNFα e IL-1 em resposta ao LPS, *in vitro*; monócitos CD14⁺ CD16⁺ ou CD14⁺⁺ CD16⁺, conhecidos como intermediários, possuem características semelhantes aos macrófagos residentes do tecido maduro. Monócitos clássicos e intermediários apresentam, de forma geral, a mesma expressão de CD14. Os monócitos intermediários representam 5% dos monócitos

circulantes e, globalmente, são caracterizados pela expressão de CX3CR1, HLA-DR e CCR5, MHC de classe II, além da expressão de genes envolvidos no processamento de antígenos e na reciclagem de proteínas; monócitos CD14^{dim}CD16⁺ ou CD14⁺CD16⁺⁺, que apresentam uma menor expressão de CD14, são chamados de monócitos não-clássicos e são considerados os monócitos patrulhadores. Estas células correspondem a aproximadamente 7% dos monócitos, caracterizando-se por não apresentarem CCR2 e expressarem níveis baixos de CCR5. Os mesmos representam uma subpopulação de monócitos capaz de patrulhar os vasos sanguíneos, detectar seletivamente células infectadas por vírus e células danificadas, produzindo citocinas pró-inflamatórias e são capazes de responder de maneira eficaz a vírus e ácidos nucleicos via TLR7 e TLR8 (Geissmann e col., 2003; Ancuri e col., 2003; Cross e col., 2010; Qian e col., 2011; Mantovani e Allavena, 2015) (Figura 2).

Não há muitos estudos sobre a população de monócitos intermediária, uma vez que a maioria dos estudos clínicos e experimentais analisa os monócitos intermediários e não-clássicos como uma única população (Rogacev e Heine, 2010). No entanto, diversos estudos vêm caracterizando com detalhes as populações de monócitos clássicos e não-clássicos. Os monócitos CD14⁺CD16⁺, por exemplo, possuem uma baixa atividade de peroxidase e uma maior capacidade de produção e liberação IL1 β e TNF α em resposta a LPS (Cross e col., 2010).

Os monócitos CD14⁺CD16⁻ são caracterizados pela sua alta expressão de CCR2. Um estudo aponta que CCL2 sintetizados por células tumorais metastáticas é crítico para o recrutamento de uma população de monócitos expressam CCR2 que melhoram o extravasamento das células tumorais (Qian e col., 2011).

Os monócitos CD14^{dim}CD16⁺ são caracterizados pela alta expressão de CX3CR1, que é um receptor de fractalquina (CX3CL1). Fractalquina é uma quimiocina estruturalmente distinta dos outros tipos de quimiocinas. Esta molécula contém um motivo CX3C único, sendo importante para a migração de monócitos para sítios inflamatórios (Bazan e col., 1997; Imai e col., 1997). Além disso, a expressão de CX3CL1 pelas células tumorais também pode conduzir o recrutamento de monócitos (Marchesi e col., 2010). A função do eixo CX3CL1 / CX3CR1 em particular durante as fases posteriores do crescimento do tumor é bastante complexa (Tardaguila e Manes, 2014; Schmall e col., 2015). A ativação de CX3CR1 em monócitos por CX3CL1 liberado pelas células endoteliais é crítico para o recrutamento de

monócitos não-clássicos para locais de extravasamento tumoral, mediando a remoção de material de tumor durante a metástase (Hanna e col., 2015).

Recentemente, estudos demonstraram que os monócitos patrulhadores, ou não-clássicos, estabelecem as primeiras relações com as células metastáticas pulmonares, eliminando-as da vasculatura pulmonar e promovendo a ativação e recrutamento das células *natural-Killer* (NK), contribuindo para imunovigilância tumoral e, por isto, podem ser futuros alvos para imunoterapia do câncer (Hanna e col., 2015). Movahedi e colaboradores demonstraram que os monócitos clássicos são os principais precursores de macrófagos em tecido tumoral (Movahedi e col., 2010). Contrariando esta constatação, foi demonstrado que os macrófagos tumorais geralmente diferenciam a partir de monócitos não clássicos (MacDonald e col., 2010; Lee e col., 2013).

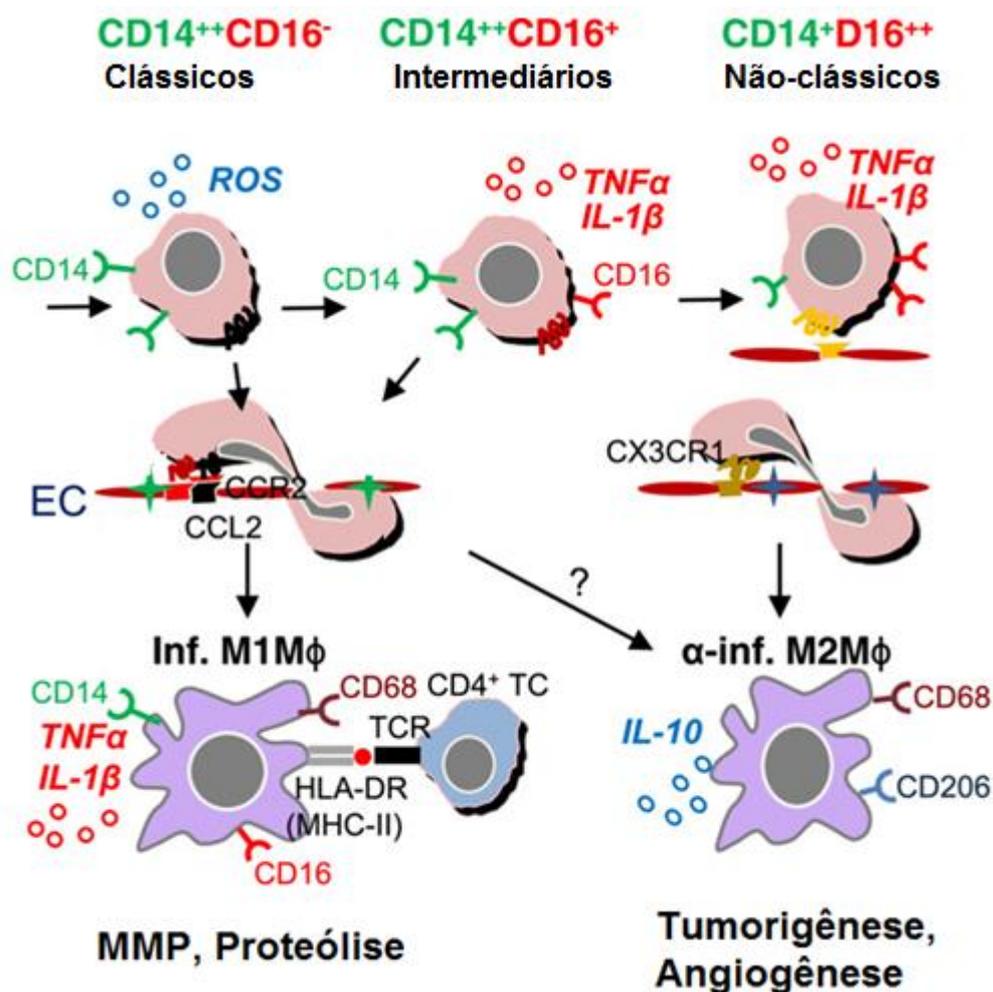
Tabela 1: Subpopulações de monócitos em humanos e em camundongos.

Espécie	População	Marcadores	Receptores de Quimiocinas	Funções
Humano	Clássica	CD14 ⁺ CD16 ⁻	CCR2 ⁺ CX3CR1 ⁻	Fagocitose e Efeitos inflamatório
	Intermediária	CD14 ⁺ CD16 ⁺	CCR2 ⁻ CX3CR1 ⁺	Efeitos inflamatórios
	Não-clássica	CD14 ^{dim} CD16 ⁺	CCR2 ⁻ CX3CR1 ⁺	Patrulhador e reparo tecidual
Camundongo	Clássica	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ⁺		Fagocitose e
	Não-clássica	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ⁻		Patrulhador e reparo tecidual

Legenda: As subpopulações de monócitos em humanos e camundongos, seus principais marcadores e suas funções

Fonte: Adaptada Italiani e Boraschi, 2014.

Figura 2 - Subpopulações de monócitos em humanos.



Legenda: As três subpopulações de monócitos em humanos e suas funções. Macrófagos M1 se distinguem pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNFα e contribuem para a degradação do tecido. Os macrófagos M2 são caracterizados pela secreção de citocinas anti-inflamatórias e promovem a angiogênese e a progressão tumoral

Fonte: Adaptada de Yang e col., 2014.

1.2.2 Macrófagos

Os macrófagos são células apresentadoras de antígenos (APC) do sistema imune inato, provenientes de monócitos derivados da medula óssea que migram para os tecidos alvos e se diferenciam em resposta aos diferentes estímulos. Os macrófagos possuem funções na manutenção da homeostase tecidual, na resposta imune a patógenos e na resolução da resposta inflamatória (Gordon e Taylor, 2005). Dependendo do estímulo presente os macrófagos adquirem dois diferentes perfis de

ativações: um perfil denominado M1, com características pró-inflamatórias e um perfil M2, com propriedades principalmente anti-inflamatórias.

No perfil M1, a ativação dos macrófagos é chamada de clássica e tem acentuada expressão de citocinas envolvidas com as respostas das células T *helper* do tipo T1 (Th1). Esta população é ativada pelo interferon gama (IFN- γ) e através de receptores *Toll-like* (TLRs) sendo caracterizada pela elevada expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, da expressão de interleucina12 (IL-12) e do fator α de necrose tumoral (TNF α). Além disso, os macrófagos M1 apresentam alta geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), bem como a capacidade de matar agentes patogênicos e células tumorais (Taylor e Gordon, 2003; Sica e col., 2008; Hume, 2015). A ativação deste perfil é mediada por várias vias envolvendo os fatores de transcrição STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição) e NF κ B (*nuclear factor-kB*), bem como pela via das MAPs 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-B. Além disso, promovem a angiogênese devido à alta expressão de VEGF. Macrófagos M2 podem ser ainda subdivididos em diferentes subtipos: M2a, quando estimulados com 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).

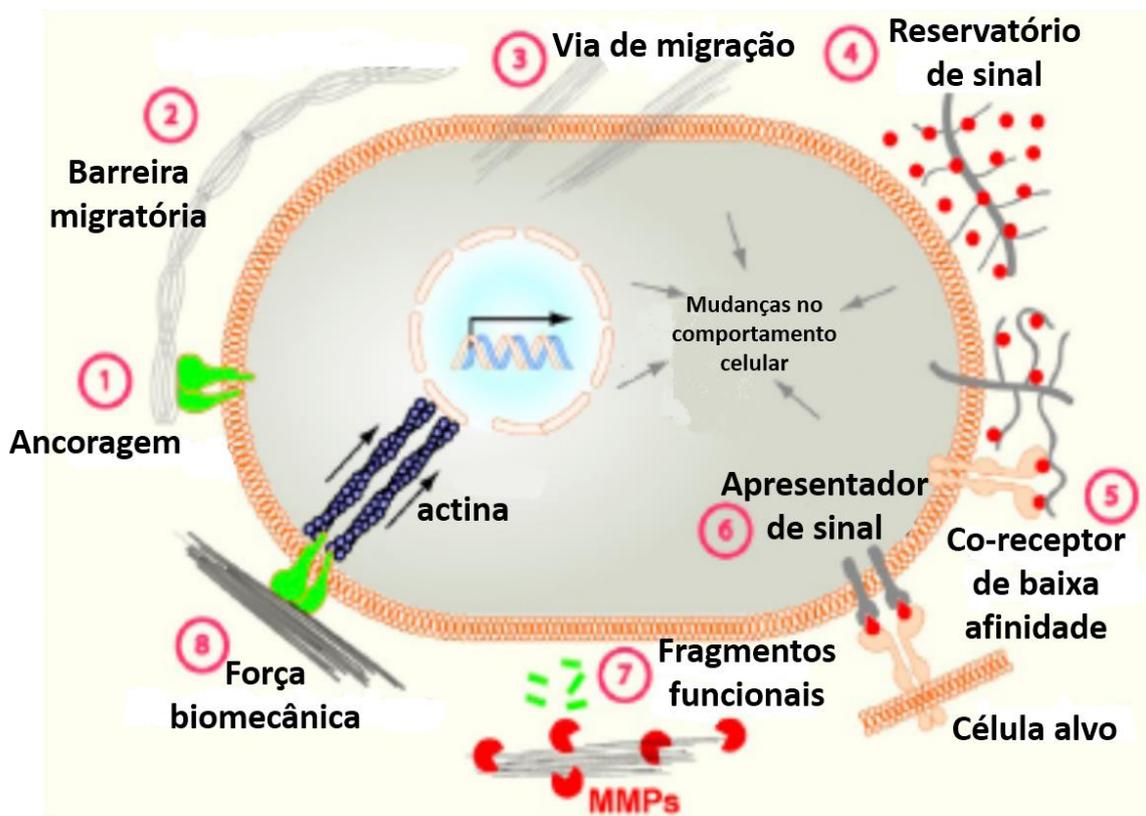
Podemos distinguir os 2 perfis de ativação dos macrófagos através da expressão diferencial de alguns marcadores celulares. Um dos principais marcadores utilizado é a relação entre Arginase-1 e a óxido nítrico sintase (iNOS), devido a utilização de L-arginina. Os macrófagos M1 geram NO através da iNOS, que cataboliza L-arginina em NO e citrulina, enquanto macrófagos M2 induzem altos níveis de arginase-1, que metaboliza a L-arginina em ornitina, diminuindo a produção 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). Os diferentes perfis M1 e M2 indicam a heterogeneidade dos macrófagos.

1.3 Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC), também denominada de membrana basal, tem de 50 a 200 nm de espessura e é uma rede complexa composta de macromoléculas: proteínas, glicoproteínas, proteoglicanas e polissacarídeos, que montam uma estrutura tridimensional com propriedades bioquímicas e biomecânicas que servem de estrutura para os tecidos (Alberts, 2010; Lu e col., 2012). Localiza-se adjacente a membrana plasmática das diversas células circundantes e alinha-se também abaixo do revestimento epitelial dos vasos sanguíneos, regulando a homeostase, a disponibilidade de fatores de crescimento e citocinas, além do nível de hidratação e pH do local. A matriz consegue se remodelar e adaptar a sua estrutura para cada órgão e tecido, refletindo seu estado fisiológico (Whittaker e col., 2006; Albert, 2010; Ozbek e col., 2010).

A MEC pode funcionar ainda como uma barreira, local de ancoragem ou de movimento, tendo papéis negativos ou positivos na migração celular. As suas propriedades bioquímicas referem-se à capacidade de sinalizar direta e indiretamente permitindo às células interagir com seu microambiente através da transdução de sinais que vão da superfície da célula para o núcleo. Isso resulta não somente na modulação da expressão de genes ou em outras alterações no comportamento das células, como também na ativação direta de metaloproteinases de matriz (MMPs) para degradar a matriz durante a invasão celular, por exemplo (Lue col.; 2012) (Figura 3).

Figura 3 – As principais funções da matriz extracelular.



Legenda: As principais funções desempenhadas pela MEC em condições fisiológicas normais. A MEC possui várias propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas.

Fonte: Adaptada de Lu e col., 2012.

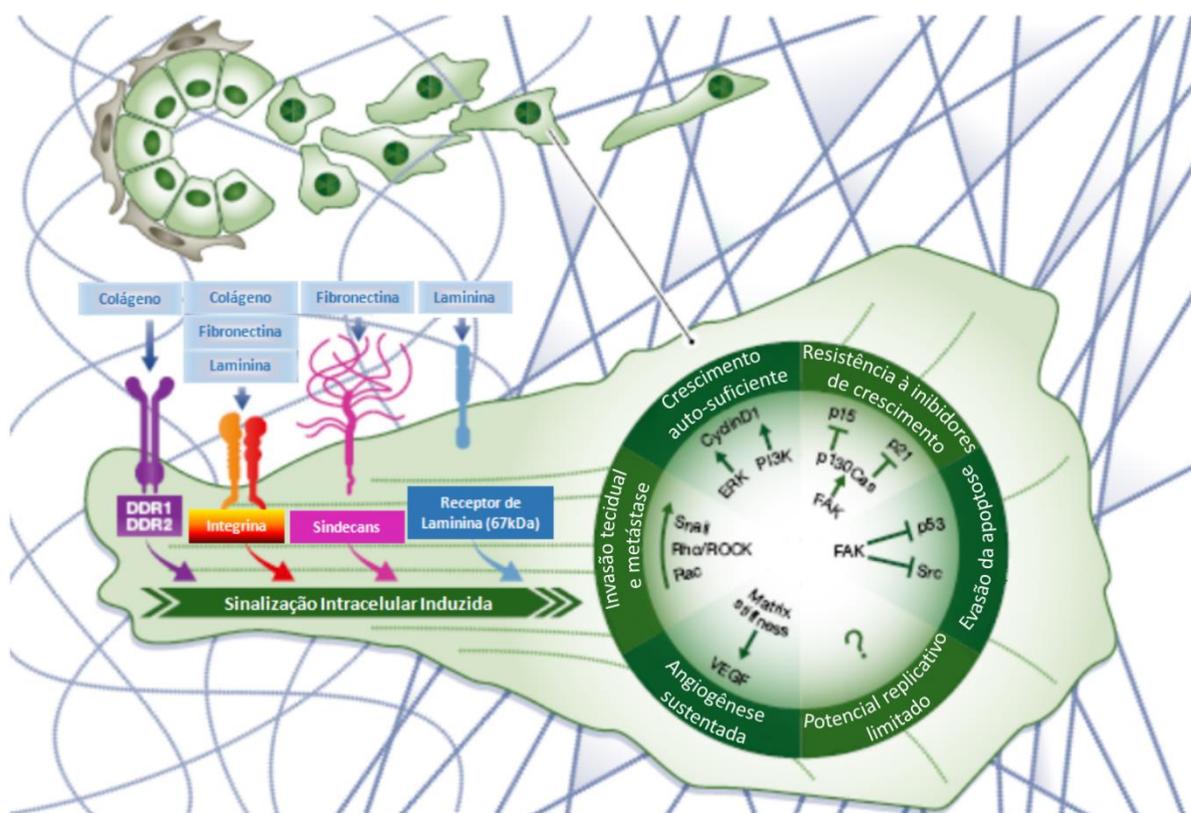
Dependendo do estímulo, a MEC funciona como um reservatório de moléculas que secretam fatores de crescimento, citocinas, MMPs e enzimas, cuja disponibilidade é regulada através do seu rearranjo, como pode ocorrer durante o processo de cicatrização de feridas, por exemplo. A MEC não é somente uma estrutura para as células do microambiente do estroma, mas provoca também uma profunda influência no comportamento das células afetando o crescimento, diferenciação, motilidade e viabilidade (Marastoni S. e col., 2008). A degradação dos componentes da matriz extracelular dá origem a fragmentos que desempenham um papel-chave no controle de inúmeros eventos, incluindo remodelação de tecidos, inflamação, angiogênese, crescimento tumoral e metástases (Adair-Kirk T. L. e Senior R. M., 2008).

A MEC pode regular grande parte das mesmas respostas celulares que caracterizam o câncer, como proposto por Hanahan e Weiberg (2011) (Figura 4). Esta característica sugere que a sobreposição das propriedades bioquímicas e

biofísicas da MEC devem ser investigadas para o entendimento do desenvolvimento tumoral.

A MEC tem uma importante função na metástase e angiogênese, dois eventos principais durante a progressão tumoral. Para que as células tumorais invadam um novo tecido ocorrem inúmeros eventos de sinalização e, principalmente, a invasão celular por ativação de um conjunto de adesão focal (Parekh e col., 2011). Uma vez que as barreiras físicas em torno de um tumor estão comprometidas, a migração das células tumorais é conduzida através da atividade de Rho e Rac GTPases (Parri e col., 2010; Pickup e col., 2014).

Figura 4 - A MEC e Câncer.



Legenda: A partir da iniciação do tumor até a metástase a MEC pode regular grande parte das mesmas respostas celulares que caracterizam o câncer que foram descritos por Hanahan e Weinberg.

Fonte: Adaptada de Pickup e col., 2014.

1.4 Inflamação e Câncer

A relação entre câncer e inflamação é de alta relevância, uma vez que estudos recentes têm expandido cada vez mais o conceito de que a inflamação é um componente crítico para progressão do tumor. Os estados de inflamação crônica associado com infecção e irritação podem ocasionar danos no DNA e com isso a iniciação do tumor, sendo que este processo ocorre principalmente através da produção de radicais livres para combater a infecção microbiana (Coussens e Werb, 2002). Além disso, fatores pró-inflamatórios tem um crítico papel na progressão tumoral mediando a angiogênese, invasão e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000).

Estudos mostram que o sistema imune pode controlar o desenvolvimento tumoral devido a sua propriedade de vigilância tumoral, disparando um mecanismo capaz de perceber e eliminar as células malignas. Dependendo do contexto, as células imunes podem ter papel benéfico e/ou prejudicial, estando envolvidas na patogênese de diversas doenças, incluindo as neoplasias (Coussens e Werb, 2002). No entanto, o tumor modula o microambiente local, fazendo com que o efeito final produzido pelo sistema inflamatório afete positivamente o desenvolvimento do tumor (Rakoff-Nahoum, 2006; Smyth e col., 2006).

1.4.1 Microambiente Tumoral

O microambiente tumoral é caracterizado pela presença de componentes celulares e não celulares que circundam o tumor (Figura 5), que desempenham funções na iniciação tumoral através das respostas inflamatórias a vários estímulos (Balkwill e Mantovani, 2012). Este ambiente é formado a partir da fuga da vigilância imunológica pelas células tumorais que se estabelecem juntamente com outras células e fatores solúveis, responsáveis pela ativação de diferentes vias de sinalização (Mohamed e col.; 2014).

Muitas evidências mostram que a inflamação crônica não resolvida desempenha um papel crítico na iniciação e promoção do tumor, levando à

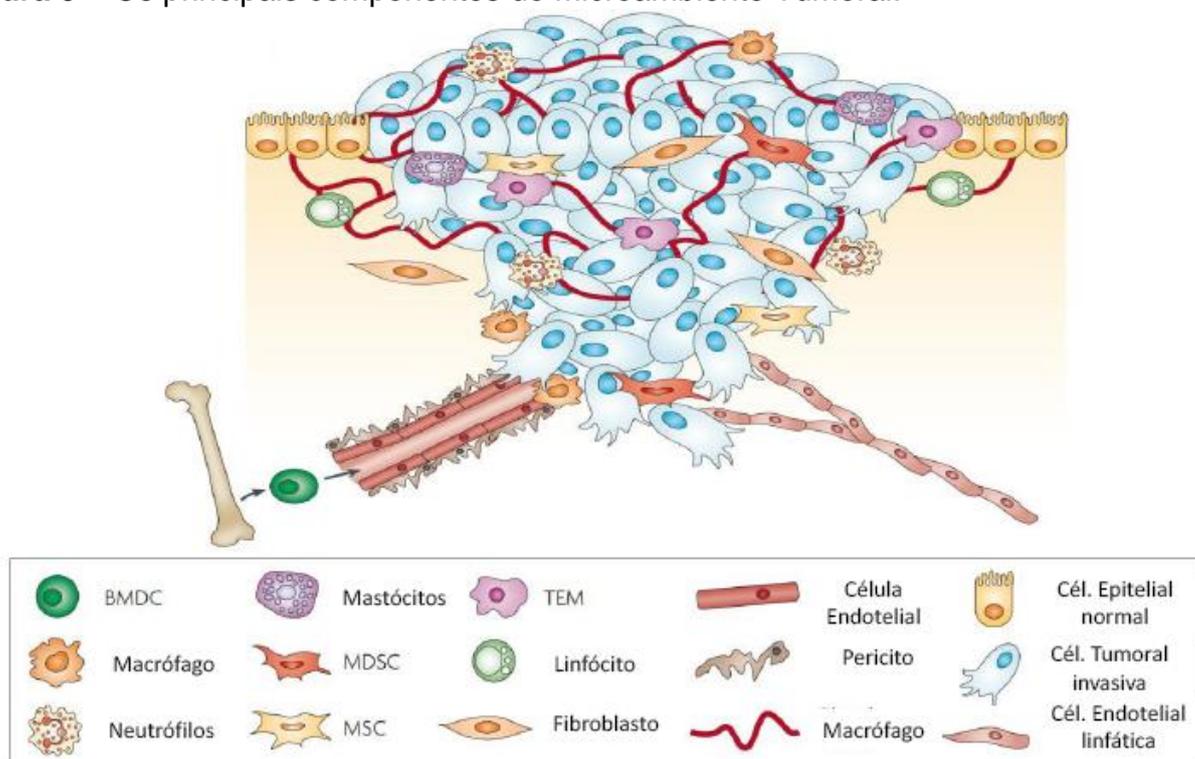
formação do microambiente tumoral (Nagaraj e Gabrilovich, 2008; Abastado, 2012). Vários mediadores liberados durante a inflamação crônica promovem a proliferação celular e invasão, induzem a mutagênese e aumentam a angiogênese (Hanahan e Weinberg, 2000). Estes mediadores inflamatórios levam a transformação e a iniciação de um fenótipo maligno e, a partir de uma expressão sustentada, promovem a progressão do tumor. Ao mesmo tempo, outros fatores liberados pelas células inflamatórias podem levar, direta ou indiretamente, a uma supressão da resposta imune, podendo ter um importante papel no desenvolvimento do tumor (Coussens e Werb, 2002).

O microambiente tumoral é constituído por componentes da matriz extracelular tumoral, fatores de crescimento, interleucinas e citocinas (Okuyama e Inoue, 2011; Allen e Louise, 2011). Em conjunto, esses fatores são capazes de regular a homeostase tecidual e o comportamento celular no tumor. Neste microambiente, existe ainda a presença de uma grande população de células heterogêneas, como fibroblastos, pericitos, células musculares lisas, células do sistema imune e células endoteliais (Zhang e Liu, 2013).

O infiltrado inflamatório de um tumor pode incluir populações de diferentes leucócitos, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos, todos sendo capazes de produzir diversos tipos de mediadores (Wahl e Kleinman, 1998) (Figura 5). Vale destacar que no microambiente tumoral as células presentes em maior número são os macrófagos, podendo representar mais da metade das células não tumorais (Sica e col., 2002).

Conforme mencionado anteriormente, tumores adquirem mutações em oncogenes ou genes supressores de tumor, que promovem a sua malignidade. Enquanto a maioria das pesquisas sobre o câncer tem se concentrado nessas mudanças, através do desenvolvimento de agentes terapêuticos dirigidos diretamente contra as células tumorais, se torna agora evidente que as células não-malignas presentes no microambiente evoluem junto com o tumor e fornecem apoio essencial para o desenvolvimento do seu fenótipo maligno (Joyce e Pollard, 2009; Roy e Pollard, 2010).

Figura 5 – Os principais componentes do Microambiente Tumoral.



Legenda: As diferentes populações de células do sistema imune que compõe o microambiente tumoral.

Fonte: Adaptada de Joyce, 2009.

1.4.2 Macrófagos Associados ao Tumor

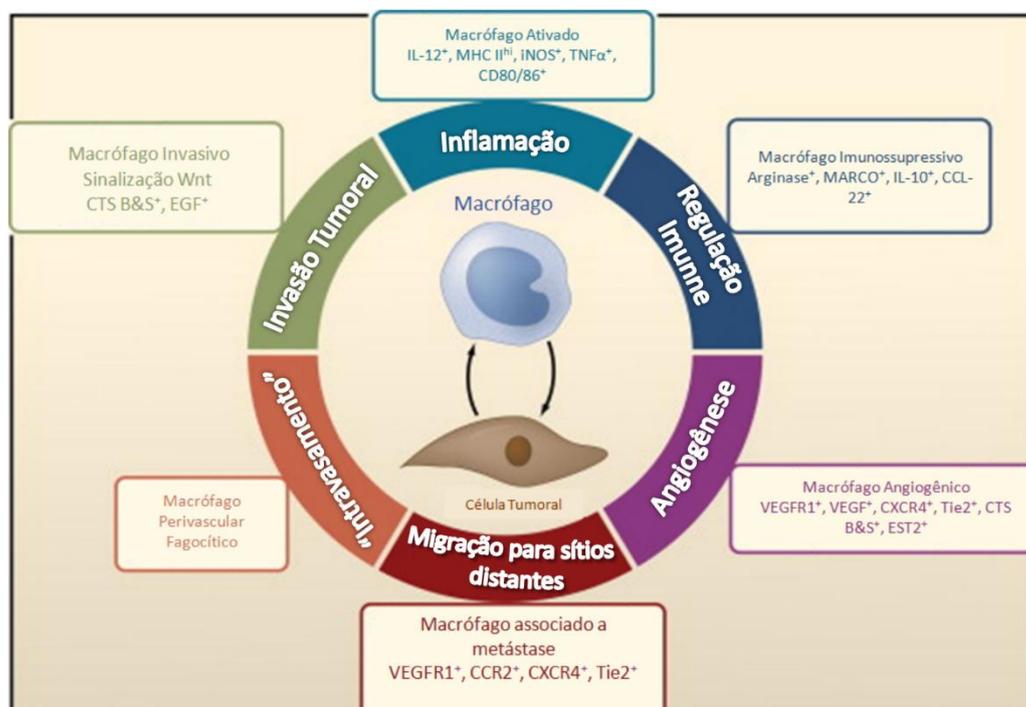
Os macrófagos são as células do sistema imune mais abundantes no infiltrado tumoral e uma vez presente no microambiente são então denominados como macrófagos associados ao tumor (TAM, do inglês, *tumor associated macrophages*), e também desenvolvem uma complexa função na interação com células neoplásicas. A análise dessa função conduziu ao entendimento maior dos mecanismos da resposta inflamatória na indução de tumores (Mantovani e col., 1992; Sica e Mantovani, 2012; De Palma e Lewis, 2013; Noy e Pollard, 2014). 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, e capazes de promover as respostas imunes que provocam perturbações de células tumorais. Durante a progressão do tumor os TAMs geralmente adquirem um fenótipo

M2-like caracterizado pela alta expressão de IL-10 e baixa expressão de IL-12, possuindo uma baixa atividade tumoricida (Sica e Mantovani, 2012). Estudos demonstram que os TAMs possuem um perfil semelhante à polarização M2, podendo ser também caracterizados como subtipo M2d (Chanmee, e col., 2014). Qiane Pollard (2010) sugerem, ainda, uma nova classificação para os macrófagos em seis diferentes tipos: angiogênicos; imunossupressor; invasivo; associado a metástases; perivascular, e macrófagos ativados (Figura 6).

Vários estudos indicam os TAMs como condutores de progressão tumoral, promovendo a proliferação, a sobrevivência do tumor; a angiogênese e a metástase através do aumento da secreção de fatores pró-angiogênicos, como o fator vascular endotelial de crescimento (VEGF) e pelo extravasamento das células tumorais pelos novos vasos formados (Lin e col., 2006; DeNardo e col., 2009; Ostuni e col., 2015).

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.

Figura 6: Diferentes fenótipos dos TAM na tumorigênese.



Legenda: São mostradas seis funções dos macrófagos que fornecem suporte extrínseco a um tumor. Cada uma destas atividades extrínsecas pode ser atribuída a uma única subpopulação de macrófagos.

Fonte: Adaptada de Qian e Pollard, 2010.

1.5 Lipoxinas

As lipoxinas (LX) são mediadores lipídicos derivadas do ácido araquidônico (AA). São eicosanóides contendo triidroxitetraeno gerados a partir de interações entre leucócitos, através da 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, 2008, Bonnans e col., 2007).

Inicialmente foram descritas duas vias de formação de LX, atuando de forma independente ou em conjunto (Serhan e col., 1984). A primeira via de biossíntese LX envolve a cooperação entre células epiteliais 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 AA 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-epoxytetraeno e, em seguida, para LX. A geração de LX no trato respiratório pode ser gerada principalmente por esta via (Lea e col., 1990; Serhan e col., 1984; Serhan e col., 1995). A segunda 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 AA pela 5-LO, o LTA₄ formado é então convertido em LXA₄ e LXB₄ pela ação da 12-LO plaquetária (Serhan e Sheppard, 1990).

A terceira via de geração de LX foi descoberta posteriormente e envolve a participação da Aspirina®, produzindo uma classe adicional de LX, as 15-epi-LX. Elas são geradas pela acetilação da ciclooxigenase-2 (COX-2) pela aspirina. A COX-2 acetilada metaboliza o AA 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., 2007). Os ATL 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 7).

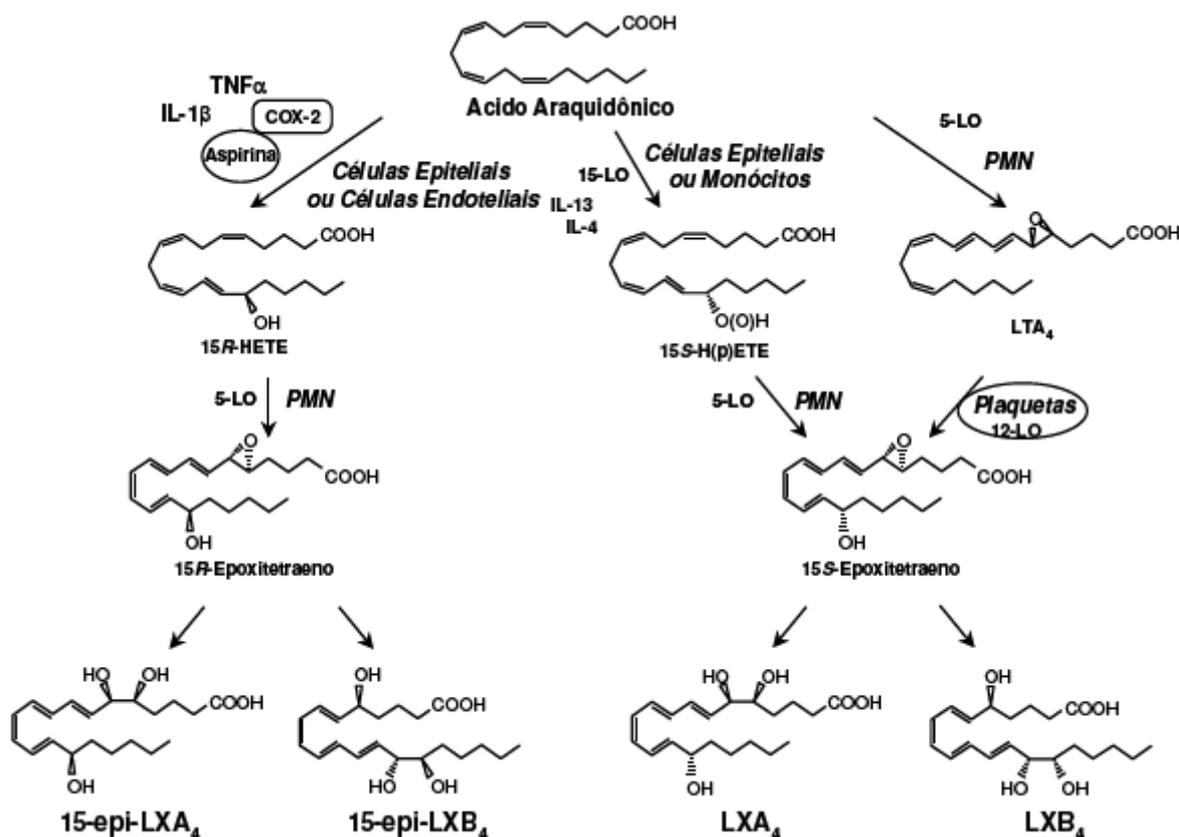
As LX são rapidamente metabolizadas tendo as principais vias de degradação a sua desidrogenação em C-15 e a ω -oxidação em C-20 (Romano, 2006). Para contornar tal inativação metabólica, estáveis análogos sintéticos têm sido desenvolvidas que são modificados em C-15, C-16, e / ou C-20. Estes compostos por apresentarem uma atividade biológica semelhante a LX nativas foram mostrados para se ligar com uma afinidade mais elevada para o seu receptor, resultando em maior estabilidade e potência (Romano e col., 2007).

A LXA₄ e os ATL atuam principalmente em um receptor acoplado à proteína G (GPCR) pertencente à família dos receptores FPR (*formylpeptide receptor*), possuindo bastante importância na resposta imune e na inflamação. Há três receptores descritos em humanos: FPR1, FPR2/ALX e FPR3 (Ye e col., 2009; DuftonePerreti, 2010). O FPR2/ALX é o receptor ao qual a LX e o ATL se ligam e é expresso em diversos tecidos, como baço e pulmão, e distintos tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos e microglia, tendo vias de sinalização específicas para cada tipo celular (Chiang e col., 2006). A ligação de diferentes moléculas ao receptor ocorre com distinta afinidade e em diferentes locais de interação, facilitando a ativação de vias de sinalização distintas dependendo do tipo celular (Bae e col., 2003). LX também interagem com outros receptores, como receptor L acoplado à proteína 32 (GPR 32), do receptor de Aril-hidrocarbonetos, receptor de estrogênio e possui elevada afinidade ao receptor cisteína-leucotrieno (Schaldach e col., 1999; Gronert e col., 2001; Russell e col., 2011; Jayashree e col., 2015).

A internalização do receptor ALX / FPR2 após a estimulação com LX ocorre de maneira tempo-dependente. Um estudo mostra que nas células não estimuladas, a ALX é encontrada predominantemente na superfície da célula. Após 5 minutos de estimulação com a LX pode ser encontrado face interna e externa da membrana plasmática. Após 15 minutos é encontrado no endossomo e, subsequentemente, no compartimento do endossomo-lisossoma. Após 120 minutos a expressão do

receptor na superfície é reestabelecida (Mitchell *et al.*, 2002; Maderna *et al.*, 2010) (Jayashree *et al.*, 2015).

Figura 7- Biossíntese das Lipoxinas e “aspirin-triggered-lipoxins” (ATL).



Legenda: As três vias de síntese das lipoxinas.

Fonte: Adaptada de Fierroe Serhan, 2001

1.5.1 Efeitos Biológicos

As LX e seus análogos possuem vários efeitos em diferentes tipos celulares, contrastando com os mediadores lipídicos que são, geralmente, pró-inflamatórios, exercendo sinais reguladores anti-inflamatórios e pró-resolutivos. As LX exibem mecanismos de ação variados em diferentes tipos celulares e em modelos animais de doenças inflamatórias, promovendo a resolução de inflamações orais, pulmonares, oculares, renais, dérmicas e gastrintestinais (Serhan *et al.*, 2008).

A LXA $_4$ e o ATL parecem regular negativamente o desenvolvimento de respostas inflamatórias e regulam positivamente os mecanismos relacionados com a

resolução da inflamação. No entanto, estes compostos podem desempenhar um complexo papel na modulação da resposta imune. Em PMN as LX inibem a quimiotaxia, a aderência e a transmigração (Serhan e col., 1995), além de reduzir a produção de superóxido e citocinas (Canny e col., 2002). Em eosinófilos estes lipídeos inibem a quimiotaxia, além de diminuírem a citotoxicidade de células T ativadas (Maddoxe Serhan, 1996).

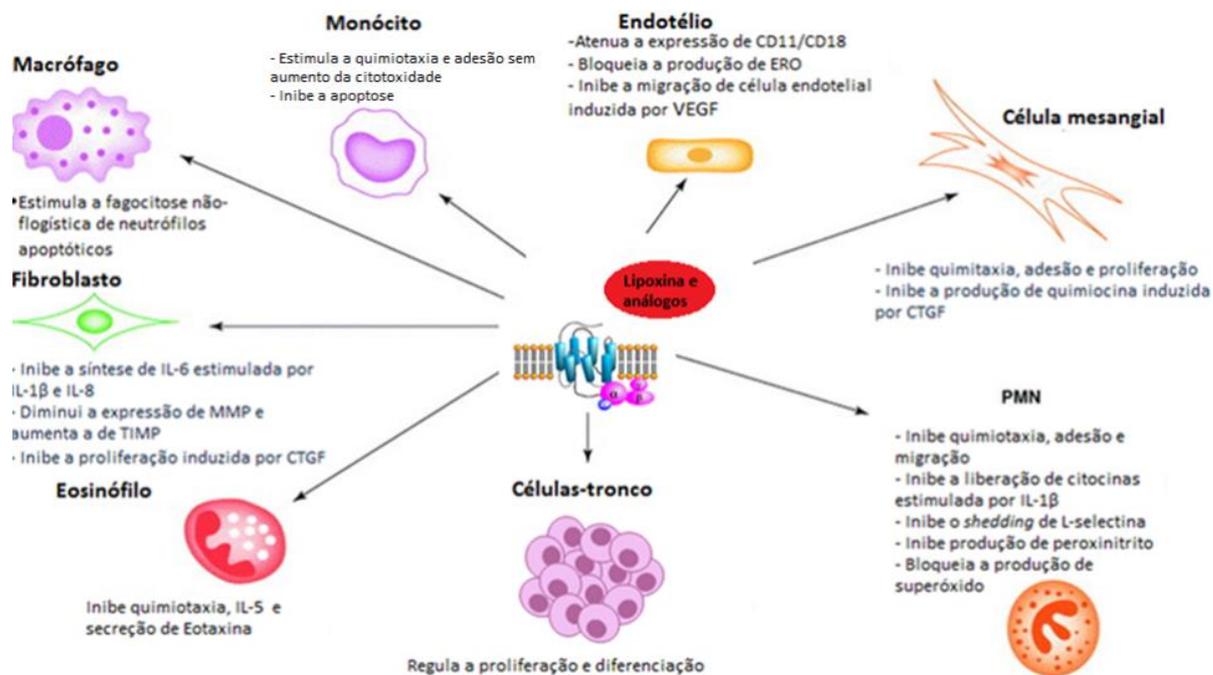
Além disso, a LXA₄ regula a migração de células dendríticas, induz a produção de IL-12 (Aliberti e col., 2002) e a expressão de supressor de sinalização de citocinas (SOCS-2) (Machado e col., 2006), contribuindo assim para a resposta antimicrobiana. Ao longo destas linhas, a LXA₄ inibe a migração e desgranulação de eosinófilos *in vitro* (Soyombo e col., 1994), bem como o tráfico de eosinófilos induzida por alérgeno *in vivo* (Bandeira-Melo e col., 2005). As LX reduzem a expressão de P-selectina em células endoteliais, controlando assim a fase inicial do recrutamento de leucócitos para locais inflamatórios (Scalia e col., 1997). Em células endoteliais, concentrações nanomolares de ATL regulam a expressão de heme-oxigenase-1, que é reconhecida como uma proteína anti-inflamatória (Nascimento-Silva e col., 2005). A LXA₄ também regula as funções de fibroblastos na remodelação de tecidos da inflamação. Em particular, inibe a produção de MMP-3 ao mesmo tempo em que aumenta a expressão do inibidor tecidual de MMP, TIMP-1 e TIMP-2 (Sodin-Semrl e col., 2000; Romano e col., 2007).

Nosso grupo demonstrou que LX induz a migração e aumenta a sobrevivência, reduzindo a apoptose de monócitos humanos a partir da regulação de vias de sinalização clássicas dependentes de ALX (Simões e Fierro, 2005, Simões e col., 2010). Considerando que a LX aumenta significativamente a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, o aumento de sua sobrevivência contribui com seu papel resolutivo da inflamação no foco inflamatório (Godson e col., 2000). Alguns estudos indicam que as LX e seus análogos têm efeitos inibitórios na angiogênese induzida por VEGF (Fierro e col., 2002; Cezar-de-Mello PF e col., 2008).

Esses efeitos produzidos pelas LX e por seus análogos, bem como a ideia da associação do câncer com a resposta inflamatória, tornam estes lipídeos importantes alvos de estudo para o controle e progressão do câncer. Em pesquisas realizadas pelo nosso grupo já foi visto que o ATL-1 é capaz de modificar o fenótipo

de TAMs humanos *in vitro*, além de induzir a apoptose das células tumorais (Figura 8).

Figura 8 – Lipoxinas e seus efeitos.



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

Fonte: Adaptado de McMahon e col., 2001

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Diante das evidências apresentadas é necessário compreender a estrutura do microambiente do tumor para o entendimento e o desenvolvimento futuro de novas abordagens eficazes para controlar a doença. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi investigar o papel de componentes desse microambiente tumoral na ativação e modulação dos monócitos e macrófagos.

2.2 Objetivos específicos

Dentro do objetivo geral proposto neste estudo, investigaremos o papel do microambiente tumoral, analisando dois principais componentes envolvidos na progressão tumoral: o meio condicionado secretado pela célula tumoral e a matriz extracelular produzida pela célula tumoral. Além disso, analisaremos o efeito do ATL-1 na modulação de monócitos e macrófagos ativados pelo microambiente tumoral, observando:

- o perfil fenotípico de monócitos humanos;
- a viabilidade dos macrófagos;
- a migração, invasão e adesão de monócitos;
- a polarização de macrófagos.

3. MATERIAIS E PROTOCOLOS

- **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

- **DMEM Completo**

DMEM Incompleto;

10% de SFB (Cultilab);

Ajustar pH para 7,2.

- **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-Qq.s.p.;

Ajustar pH para 7,2.

- **RPMI completo**

- RPMI incompleto;

- Soro fetal bovino 10%

- Ajustar pH para 7,2.

- **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.

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

16 g de NaCl;

0,4 g de KCl;

0,4 de KH_2PO_4 ;

4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$;

Água destilada q.s.p.

- **PBS/Cálcio(1 Litro)**

2,7 mM de KCl;

1,4 mM de KH_2PO_4 ;

68,3 mM de NaCl;

8 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

1 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;

1 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

Ajustar pH para 7,2.

- **Tampão de obtenção da MEC**

0,1% de Triton X-100;

0,1M de NH_4OH ;

1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de coquetel de inibidores (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aprotinina, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de leupeptina, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de pepstatina e 1 mM de PMSF).

- **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.

- **EDTA 5%**

5% de EDTA;

PBS estéril q.s.p.

- **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 gde Vermelho de fenol;
0,35 g de Bicarbonato de sódio;
Água Mili-Qq.s.p.;
Ajustar pH para 7,2.

- **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 gde Vermelho de fenol;
0,35 g de Bicarbonato de sódio;
Água Mili-Qq.s.p.;
Ajustar pH para 7,2.

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

HBSS 1x q.s.p.;
0,146 g de EDTA;
Ajustar pH para 7,4.

- **Solução de Turk (100 mL)**

Cristal violeta (Merck) - q.s.p.;
2 mL de Ácido acético glacial 2% (Merck) ÁguaMili-Qq.s.p.

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

2,0g de BSA;

5mL de SFB;

0,1g de Ázida Sódica;

PBS q.s.p.

- **Tampão de Ligação**

10mM de Hepes;

150mM de NaCl;

5mM de KCl;

1mM de MgCl₂;

1,8mM de CaCl₂.

- **Solução de Percoll (5 mL)**

2,3 mL Percoll GE;

250uL de Hank's 10x Concentrado;

2,45 mL de Hank's 1x.

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

30 g de Acrilamida (Pharmacia);

Água destilada q.s.p.

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

100 mg de APS (Pharmacia);

água destilada q.s.p.

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

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

água destilada q.s.p.

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

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

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

água destilada q.s.p.

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

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

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

água destilada q.s.p.

- **SDS 10% (100 mL)**

SDS (Pharmacia) – 10 g;

água destilada q.s.p.

- **Tampão de corrida 10x (500 mL)**

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

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

50 ml SDS (Pharmacia) 10%;

Água destilada q.s.p.

- **Tampão de transferência (3 Litros)**

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

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

Água destilada q.s.p.

- **T-PBS (100 mL)**

50 µL de Tween–20 (Pharmacia) 0,05%;

PBS q.s.p.

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

20 mg de Ponceau Rouge 0,2%;

De 300 mg Ácido Tricloroacético 3%;

Água destilada q.s.p.

- **Gel de poliacrilamida**

Gel de Separação	8%	10%	12%	15%
Tampão Gel de Separação	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

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 MiliQ;

25 µL de SDS 10%;

50 µL de APS 10%;

50 µL de TEMED.

- **Tampão de Lise**

Triton X-100 1%;

Tris-HCl 25 mM;

NaCl 150 mM;

EGTA 2 mM;

Ortovanadato 10 µL/mL;

Coquetel de inibidores 1 µL/mL de coquetel de inibidores (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.

- **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.

- **Tampão de Gel Fracionador) (200 mL)**

36,34 g de Tris HCl - 1,5 M;

8,0 mL de SDS 10%;

Água Mili-Q q.s.p.;

Ajustar o pH para 8,8.

- **Tampão de Gel Concentrador (100 mL)**

6,06g de Tris HCl- 0,5 M;

4,0 mL de SDS 10%;

Água Mili-Q q.s.p.;

Ajustar o pH para 6,8.

- **Tampão de Cuba (1 Litro)**

3,03 g de Tris - 0,025 M;

14,4 g de Glicina - 0,192 M;

1,0 g de SDS;

Água Mili-Q q.s.p.;

Ajustar o pH para 8,3.

- **Tampão de desenvolvimento (1 Litro)**

6,06 g de Tampão Tris-HCl 50 mM;

11,7 g de NaCl 0,2 M;

1,47 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM;

100 μl de ZnCl_2 10 M;

2 mL de Azida Sódica 10%;

Água Mili-Q q.s.p.;

Ajustar o pH para 7,5.

- **Acrilamida 30% Bis-Acrilamida 0,8% (100 mL)**

30 g de Acrilamida;

0,8 g de Bis-Acrilamida;

Água Mili-Q q.s.p.

- **Solução de Renaturação**

25 mL Triton X-100;

1000 mL de Água Mili-Q.

- **Comasie Blue 0,2% (200 mL)**

0,4 g de Comasie Blue;

40 mL de Isopropanol;

20 mL de Ácido acético;

Água Mili-Q q.s.p.

- **Solução Descorante (200 mL)**

40 mL de Isopropanol;

20 mL de Ácido Acético;

Água Mili-Q q.s.p.

- **Gel para Zimografia**

Gel Fracionador

7,5 mL de Tampão de Gel Fracionador Tris-HCl 1,5M 0,4% SDS;

6,0 mL de Acrilamida 30% Bis-Acrilamida 8%;

13,46 mL de Água Mili-Q;

3,0 mL de Gelatina 1%;

45 µl de APS 0,1%;

54 µl de TEMED.

Gel Concentrador

5 mL de Tampão de Gel Concentrador Tris-HCl 0,5M SDS 0,4%;

2,5 mL de Acrilamida 30% Bis-Acrilamida 0,8%;

12,5 mL de Água Mili-Q;

30 µl de APS 0,1%;

18 µL de TEMED.

4. METODOLOGIA

4.1 Linhagens celulares

Em nossos experimentos *in vitro*, utilizamos as células 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); NGM, uma linhagem de melanócitos humano (Nº 0190; tecido: epitélio; órgão: pele; tipo: melanócito; patologia: Nevo) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ, Brasil).

4.2 Cultura de Células

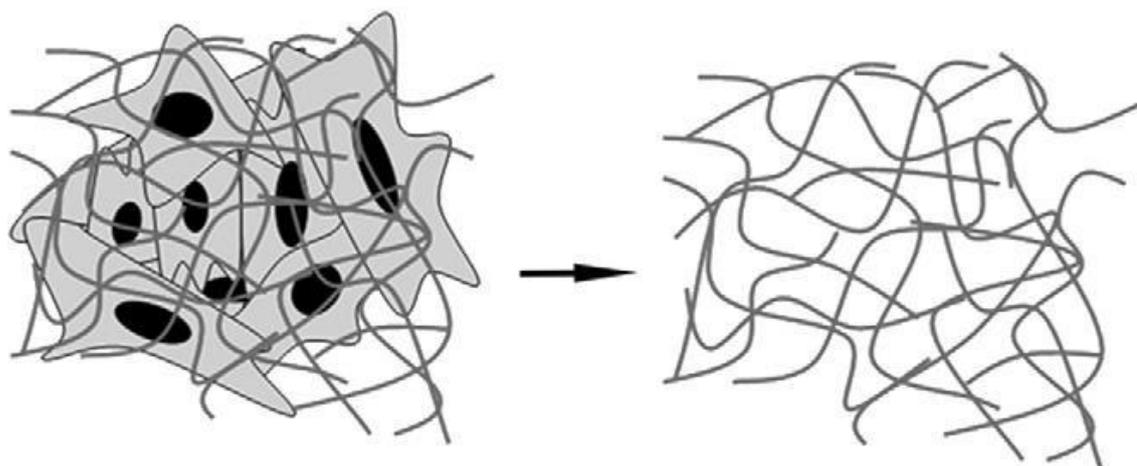
As células MV3 e NGM foram cultivadas em meio de cultura DMEM completo (Gibco Invitrogen Corporation), mantidas em cultura a 5% de CO₂ e a temperatura constante 37°C. Quando confluentes a cada 2 ou 3 dias, o meio de cultura foi renovado e/ou as células foram repassadas. Foi utilizada a solução Hank's EDTA (5 mM) 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 NGM foram centrifugadas a 1400 rpm e a MV3 a 900 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.

4.3 Obtenção da Matriz extracelular

A extração das matrizes é feita conforme descrito por Morandi e colaboradores (1994) e demonstrado na figura 9. As linhagens de MV3 e NGM (10^5 células por poço) foram semeadas em placa de 24 poços, cultivadas em DMEM suplementado com 10% SFB por 3 dias para a formação da MEC. No 3º dia, as células são lavadas 3 vezes com PBS ou PBS Cálcio, lisadas em tampão de extração para conservar a matriz produzida pelas células. Esse processo não pode ultrapassar 3 minutos. Após a retirada do tampão de extração, a matriz é lavada por 5 vezes cuidadosamente para a eliminação dos restos celulares, seguido pelo bloqueio por 40 minutos com PBS cálcio com 0,1% BSA. As matrizes foram imediatamente utilizadas para os experimentos.

Figura 9- Desenho esquemático do processo de obtenção da matriz extracelular.



Legenda: À direita, a matriz extracelular está representada como linhas envolvidas com células, e à esquerda a matriz extracelular após o procedimento de extração.

Fonte: Soucy e Romer, 2009, f. 274

4.4 Obtenção do meio condicionado da MV3 (M.C. MV3)

A cultura de células MV3 foi mantida como descrito anteriormente e após as células apresentarem confluência o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 1200 rpm e armazenado no freezer a -80°C até o uso. O meio condicionado foi adicionado ao experimento diluição 1:1 para manter a mesma concentração de SFB dos demais grupos experimentais.

4.5 Separação de PBMC

4.5.1 Separação de Monócitos Humanos

Monócitos humanos foram obtidos a partir de sangue periférico de doadores sadios como descrito em Simões e Fierro, 2005. O sangue retirado foi adicionado a EDTA 5% (20:1). Após isso, o sangue foi adicionado sobre o Ficoll (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. Após isso, a solução contendo células mononucleares foi adicionada a um solução de Percoll (1:1) e centrifugada durante 37 minutos (550 x g/25°C acc/dcc 2). A monocamada de monócitos foi retirada e lavada com RPMI incompleto. 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 (0,2% em PBS).

4.5.2 Geração de Macrófagos Humanos

Os monócitos purificados, como descrito previamente, foram mantidos em cultura durante 7 dias com RPMI 10% SFB para a diferenciação em macrófago. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Macrófagos foram caracterizados através de marcadores específicos em um ensaio de citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.8.

4.6 **Adesão Celular**

As células NGM e MV3 (2×10^4 por poço) foram semeadas em placa de 96 poços (placa preta Corning®) por 3 dias para a produção da MEC. As células foram lisadas e sua matriz preservada como descrito anteriormente. Os monócitos foram incubados com a sonda CMFDA durante 1 hora a 37°C e após serem lavadas foram tratadas ou não com ATL-1 (1-100 nM) por 15 minutos. As células foram lavadas e ressuspendidas em HBSS sem vermelho de fenol e cultivadas sob as diferentes matrizes por 3 horas na presença ou ausência de meio condicionado de MV3. Após a lavagem para a retirada das células que não aderiram, foi adicionado HBSS sem vermelho de fenol e a fluorescência emitida pelas células aderidas foi detectada a partir da fluorescência detectada pelo leitor de placas Envision® (Excitação 490 Emissão 517).

4.7 **Viabilidade Celular**

Os monócitos e macrófagos foram cultivados por diferentes períodos de tempo sobre as diferentes matrizes e a viabilidade foi analisada através da marcação com Anexina V conjugada a FITC e iodeto de propídio (PI). As células

foram retiradas da placa mecanicamente com a auxílio de um rodo e ressuspendida em tampão de ligação (100 µL) e marcada com Anexina-V-FITC (Abcam) por 20 minutos. Em seguida é adicionado o PI (40 ug) e marca-se por mais 20 min. A análise foi feita através de citometria de fluxo utilizando o citômetro Accuri C6 (BD Bioscience).

4.8 Caracterização fenotípica de monócitos e macrófagos

Para análise do perfil, monócitos humanos foram retirados da placa por força mecânica com o auxílio de uma ponteira ou rodo e ressuspendidos em tampão para citometria. Os anticorpos CD14-APC, CD16-FITC e CX3CR1-PE foram utilizados para a análise dos perfis.

Após os diferentes experimentos, macrófagos foram retirados da placa e ressuspendidos em tampão para citometria de fluxo (1×10^6 /mL). As células foram marcadas com anticorpos específicos marcadores característicos para macrófagos M2 (CD206-PE, CD163-APC, Biolegend).

Em todos os procedimentos, o isotipo controle recomendado foi utilizado.

4.9 Western Blotting

Após os diferentes tratamentos as células foram lisadas em tampão de lise RIPA. 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), no qual são separadas de acordo com o peso molecular. As proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF e bloqueadas por 45 minutos com solução de BSA 5% em TBS-Tween 0,1% (T-TBS) para evitar ligações inespecíficas. Para marcação das proteínas alvo, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C,

com anticorpo primário específico (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 (NIH/USA).

4.10 Quimiotaxia

A quimiotaxia foi investigada utilizando uma câmara de Boyden modificada. Os monócitos tratados ou não com ATL-1 por 15 minutos foram cultivados por 1 hora sobre as diferentes matrizes. Após isso os monócitos foram submetidos a quimiotaxia na câmara de Boyden por 90 minutos. As células foram ressuspensas em RPMI incompleto e adicionados na parte superior da câmara (15×10^4 cel/poço). Na parte inferior, foram adicionados os estímulos (28,5 μ L/poço) específicos para obtenção do gradiente quimiotático. As cavidades foram separadas por uma membrana de policarbonato (5 μ m). Após 1,5 horas, a membrana foi removida, lavada, fixada e corada usando o kit Diff-Quick (Baxter Travenol Laboratories, ON, Canada). As células que migraram através da membrana foram contadas em microscópio óptico (objetiva 100x) em pelo menos 5 campos escolhidos aleatoriamente.

4.11 Zimografia

Para o ensaio de Zimografia os monócitos tratados ou não com ATL-1 (10 nM) por 15 minutos foram cultivados por 24 horas sobre as diferentes matrizes com RPMI sem soro. O sobrenadante foi retirado e centrifugado a 1200 rpm. As amostras foram obtidas através da diluição 1:1 do sobrenadante com tampão de amostra para

zimografia e submetidas à eletroforese por 2 horas a 100V em refrigeração constante. Após a eletroforese o gel é lavado por 1 hora em solução de renaturação e a cada 15 min é feita a troca da solução. Após esse processo o gel é corado com Comasie Blue *overnight* e descora-se com a solução descorante até o aparecimento das bandas de digestão

4.12 Análise estatística

Os resultados obtidos são expressos como média e desvio padrão da média. Os dados foram analisados por teste t de Student, com auxílio do programa GraphPadPrism 6 para Windows, do Microsoft Excel 2007 e foram consideradas significativas diferenças cujo $P < 0,05$.

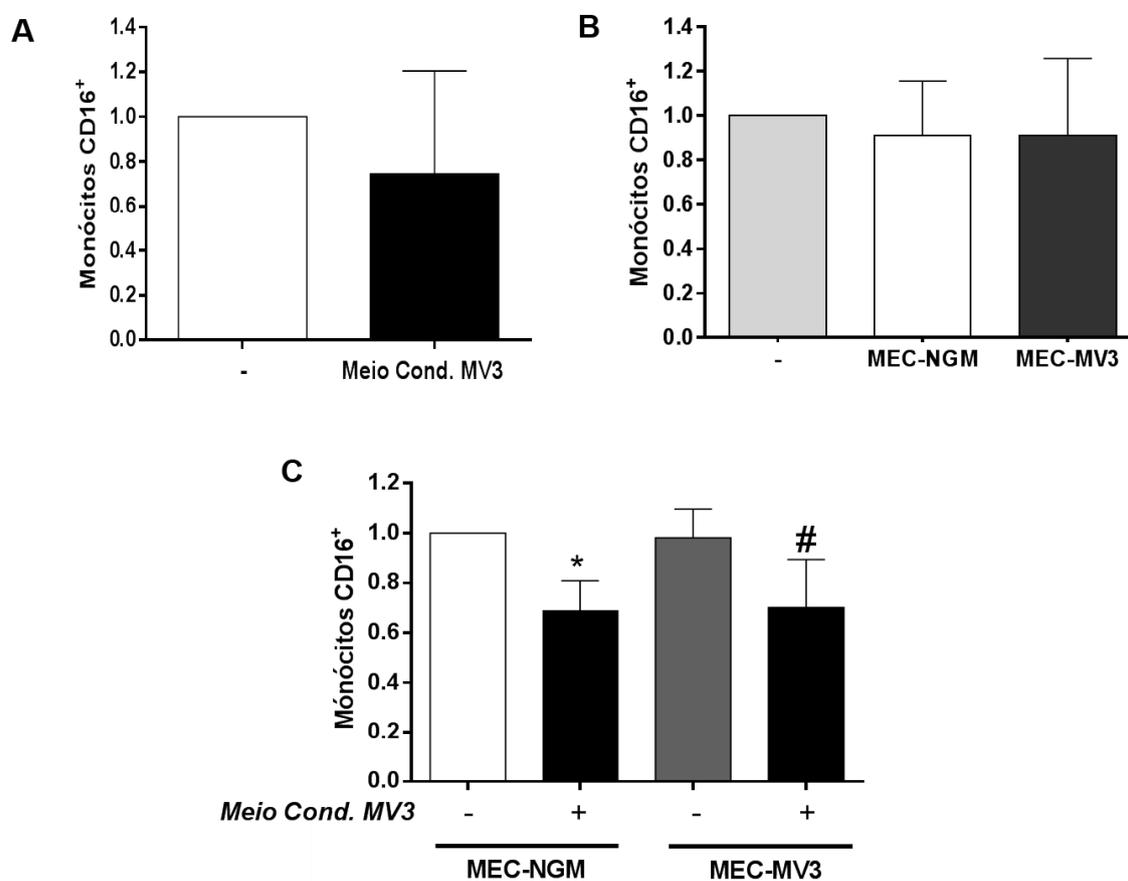
5. RESULTADOS

5.1 Componentes do microambiente tumoral retardam o aumento da expressão de CD16 em monócitos humanos

Monócitos CD14⁺CD16⁻, denominados clássicos, migram para o foco tumoral e participam de diversas etapas da tumorigênese (Biswas e Mantovani, 2010; Murray, T. A. Wynn 2011; Wynn e col., 2013; Franklin e col., 2014). A partir disso, investigamos o papel de componentes do microambiente tumoral na modulação do perfil fenotípico de monócitos. Para isso, os monócitos foram cultivados sobre as MECs produzidas por melanócitos ou células de melanoma, na presença ou não do meio condicionado da MV3 por 24 horas. Conforme demonstrado na figura 10 A e B, o estímulo com o meio condicionado ou as matrizes isoladamente não altera a expressão de CD16 em monócitos. No entanto, os monócitos cultivados sobre ambas as matrizes na presença do meio condicionado da MV3 demonstram menores níveis de CD16 (Figura 10 C).

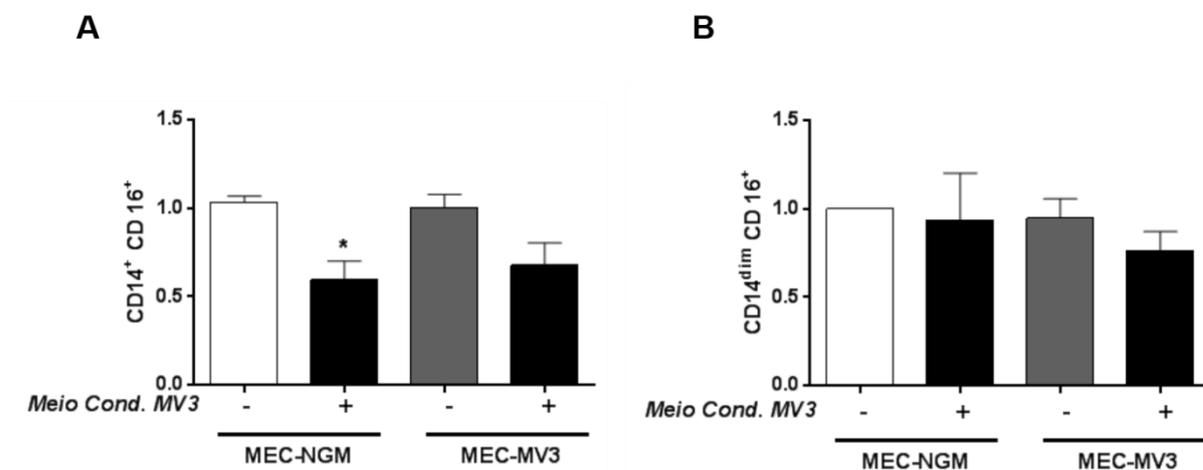
Fomos então investigar a expressão de CD16 nas diferentes subpopulações de monócitos: a intermediária CD14⁺ CD16⁺ e a não clássica CD14^{dim} CD16⁺. Para isto, cultivamos os monócitos sobre as diferentes matrizes na presença ou ausência do meio condicionado da MV3 por 24 horas. Através da análise por citometria de fluxo, observamos que o meio condicionado da MV3 diminui a população de monócitos intermediários cultivados sobre ambas as matrizes (Figura 11). Além disso, não vimos alteração significativa no percentual da população de monócitos CD14^{dim} e CD16⁺.

Figura 10 – Componentes do microambiente tumoral diminuem a expressão de CD16⁺ em monócitos humanos.



Legenda: **A)** Os monócitos (1×10^6 células) foram cultivados por 24 horas na ausência ou presença do meio condicionado da MV3 **B) e C)** Os monócitos foram cultivados sobre as MEC da NGM e MV3 por 24 horas na ausência ou presença do meio condicionado da MV3. Os monócitos foram analisados por citometria de fluxo utilizando anticorpo anti-CD16-FITC. A figura indica a média \pm D.P de 3 experimentos realizados separadamente. *, $p < 0,05$ em relação ao MEC-NGM e #, $p < 0,05$ em relação ao MEC- MV3.

Figura 11 – Componentes do microambiente tumoral diminuem a subpopulação de monócitos intermediários.



Legenda: A e B) Os monócitos (1×10^6 células) foram cultivados sobre as MEC da NGM e MV3 por 24 horas na presença ou ausência do meio condicionado da MV3. Os monócitos foram analisados por citometria de fluxo e suas populações separadas através do uso de anticorpos anti-CD14-APC e anti-CD16-FITC. A figura indica a média \pm D.P de 3 experimentos realizados separadamente. *, $p < 0,05$ em relação ao controle NGM.

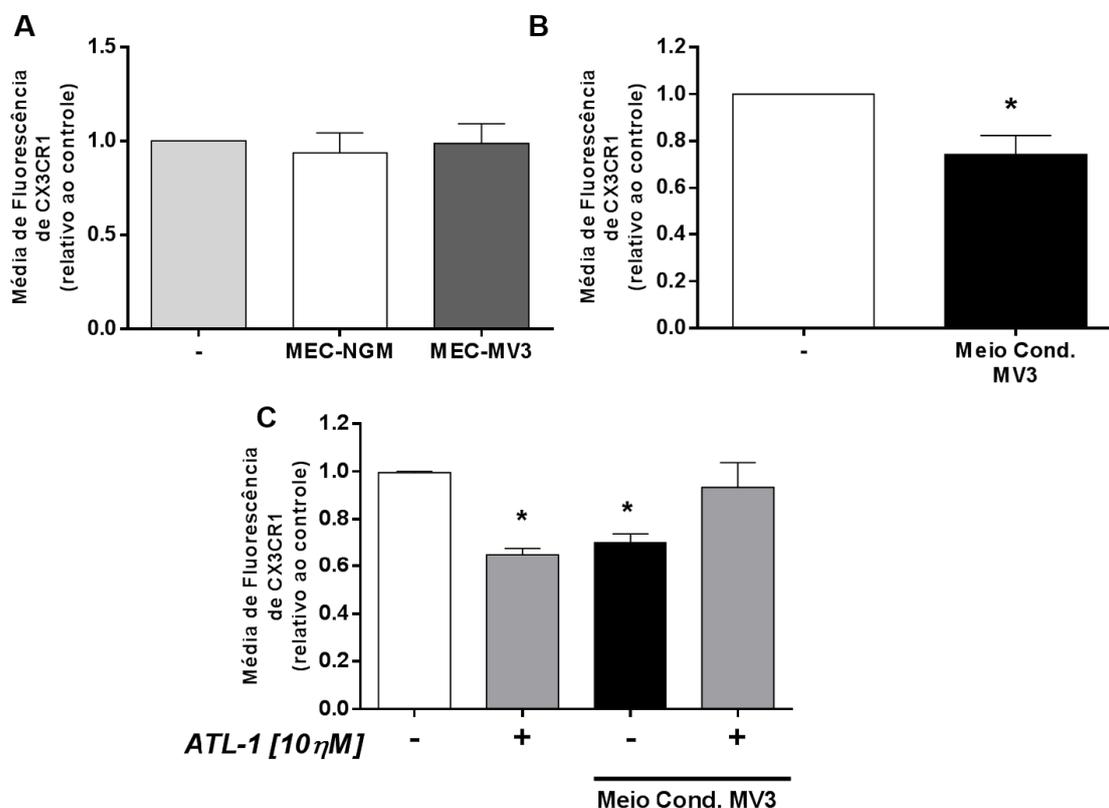
5.2 O ATL-1 inibe o efeito do meio condicionado sobre a expressão de CX3CR1 em monócitos humanos.

O CX3CR1 é um receptor de fractalquina expresso em monócitos não-clássicos e está relacionado com o recrutamento de monócitos patrulhadores (CD14^{dim} CD16⁺) para o foco tumoral (Hanna e col., 2015). Com isso analisamos o papel das matrizes e do meio condicionado de MV3 na expressão de CX3CR1. Monócitos humanos foram cultivados sobre as diferentes matrizes e estimulados com meio condicionado da MV3 por 24 horas. Enquanto a expressão de CX3CR1 não foi alterada quando monócitos foram cultivados sobre as diferentes matrizes, vimos que o meio condicionado da MV3 retarda o aumento da expressão de CX3CR1 de maneira significativa, conforme demonstrado na figura 12. De maneira interessante, o tratamento de monócitos com ATL-1 também retardou o aumento da expressão de CX3CR1 quando as células estão na ausência de meio Condicionado da MV3, enquanto reverte o efeito do meio condicionado de MV3 sobre expressão deste receptor, indicando uma modulação diferencial do ATL-1 em monócitos.

5.3 O ATL-1 aumenta a relação iNOS/Arginase-1 em monócitos na presença do meio Condicionado da MV3.

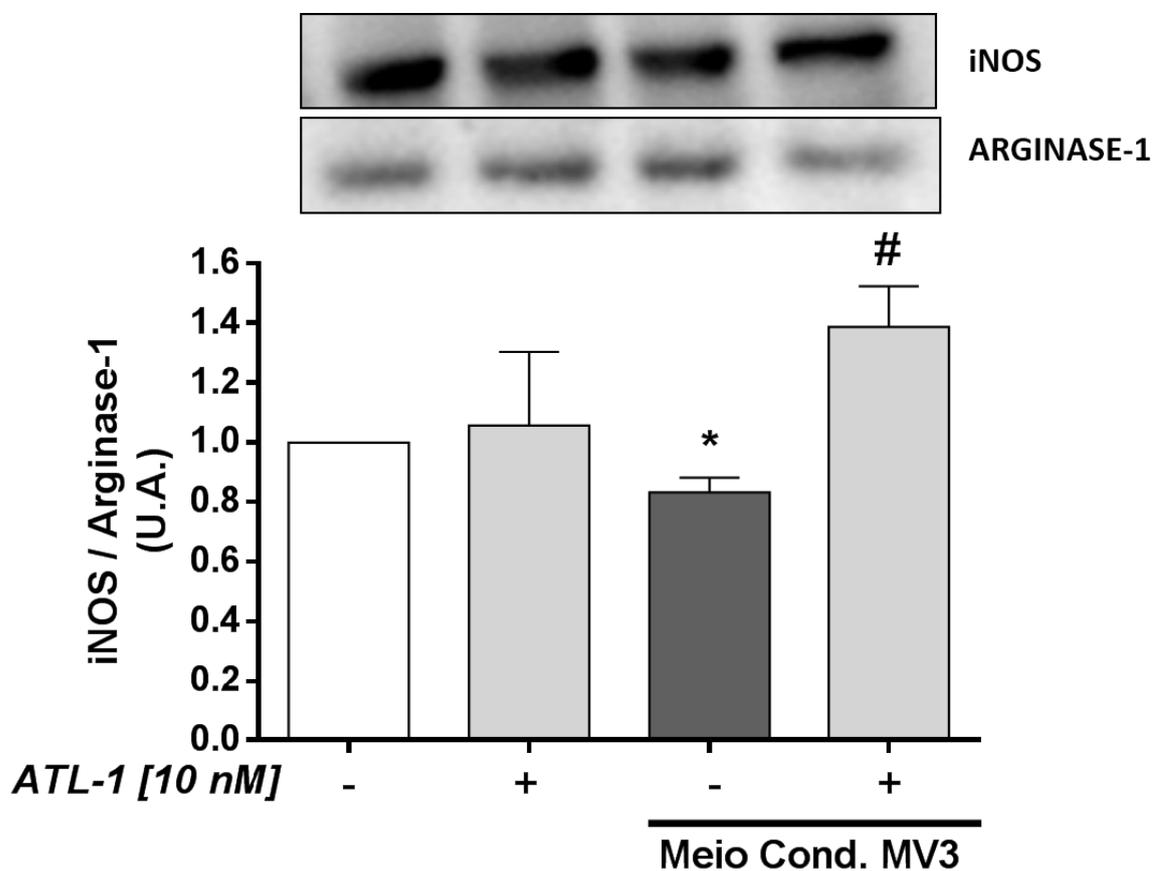
Dados anteriores do nosso grupo demonstram que o ATL-1 aumenta a relação iNOS/Arginase-1 em TAMs, alterando o perfil de M2 para um perfil M1. A partir disto, fomos investigar os efeitos de fatores solúveis liberados por células tumorais sobre monócitos humanos. Para isso cultivamos monócitos pré-tratados ou não com o ATL-1 (10 nM) por 15 minutos na ausência e presença do meio condicionado da MV3 por 60 minutos. Conforme demonstrado na figura 13, observamos que o meio condicionado da MV3 diminui a relação iNOS/Arginase em monócitos. Este efeito é consequência dos altos níveis de arginase-1 em monócitos cultivados na presença de meio condicionado da MV3, já que não observamos alteração na expressão de iNOS no tempo observado. Demonstramos, também, que o tratamento com ATL-1 reverte o efeito do meio condicionado, principalmente pela diminuição da expressão de arginase-1 em monócitos (Figura 13).

Figura 12 – O ATL-1 inibe o efeito do meio condicionado sobre a expressão de CX3CR1.



Legenda: A e B) Os monócitos (1×10^6 células) tratados ou não com ATL-1 (10 nM) foram cultivados na ausência ou presença do meio condicionado da MV3 por 24 horas. A análise foi feita por citometria de fluxo utilizando anticorpo anti-CX3CR1-PE. A figura indica a média \pm D.P de 2 experimentos realizados separadamente. **C)** Os monócitos foram cultivados sobre ambas as MEC por 24 horas. A figura indica a média \pm D.P de 3 experimentos realizados separadamente. *, $p < 0,05$ em relação às células sem tratamento.

Figura 13 - O ATL-1 aumenta a relação iNOS/Arginase-1 dos monócitos na presença do meio condicionado.



Legenda: A e B) Os monócitos (1×10^6 células) tratados ou não com ATL-1 (10 nM) por 15 minutos foram cultivados na ausência ou presença do meio condicionado da MV3 por 60 minutos. As células foram lisadas e a expressão proteica de iNOS/Arginase-1 foi analisada através de *Western Blotting*. A figura indica a média \pm D.P de 2 experimentos realizados separadamente. *, $p < 0,05$ em relação ao MEC-NGM e #, $p < 0,05$ em relação ao meio condicionado MV3.

5.4 A MEC tumoral não tem efeito na migração de monócitos em direção ao meio condicionado da MV3.

Para alcançarem o foco tumoral, os monócitos são ativados por fatores quimiotáticos liberados por células presentes no microambiente tumoral e precisam transmigrar pela MEC (Hanahan e Coussens, 2012). Neste experimento procuramos mimetizar o estímulo tumoral utilizando o meio condicionado da MV3 como um fator quimiotático. Os monócitos previamente incubados por 60 minutos sobre as matrizes da NGM e MV3 foram submetidos ao ensaio de quimiotaxia durante 90 minutos com diferentes estímulos quimiotáticos. Conforme demonstrado na figura 14, as matrizes não induziram aumento na migração randômica de monócitos humanos (Figura 14 A). No entanto, os monócitos migraram mais em direção ao meio condicionado da MV3 quando comparamos ao meio de cultura na presença de soro (Figura 14 B). De maneira interessante, o meio condicionado da MV3 não aumenta migração dos monócitos quando as células foram pré-incubadas com a MEC tumoral (Figura 14 C). Observamos ainda que o tratamento com o ATL-1 inibe a migração dos monócitos em direção ao meio condicionado (Figura 15). O fMLP foi utilizado como controle positivo do nosso experimento.

5.5 Componentes do microambiente tumoral regulam diferencialmente a atividade de MMP-9 / MMP-2.

As MMPs desempenham um papel crucial na invasão e metástase, além de regularem as vias de sinalização que controlam o crescimento celular, sobrevivência, invasão, angiogênese e inflamação. Elevados níveis de MMP-9/MMP-2 são encontrados em diversos tipos de tumores, inclusive o melanoma (Brigitte Bauvois, 2012). Diante desses dados, analisamos a atividade e expressão de MMP-9 e MMP-2 através de ensaio de zimografia. Os monócitos previamente tratados ou não com ATL-1 foram cultivados sobre as diferentes matrizes por 24 horas, com presença ou não do meio condicionado da MV3. De forma interessante, os monócitos cultivados na matriz tumoral apresentaram menor atividade de MMP-9

quando comparados a matriz de melanócitos (Figura 16 A). Observamos que o tratamento com ATL-1 aumentou a atividade de MMP-9 em monócitos cultivados sobre a matriz de melanoma. O meio condicionado da MV3 *per se* não foi capaz de induzir efeito na atividade de MMP-9 de monócitos incubados com as matrizes (Figura 16 B).

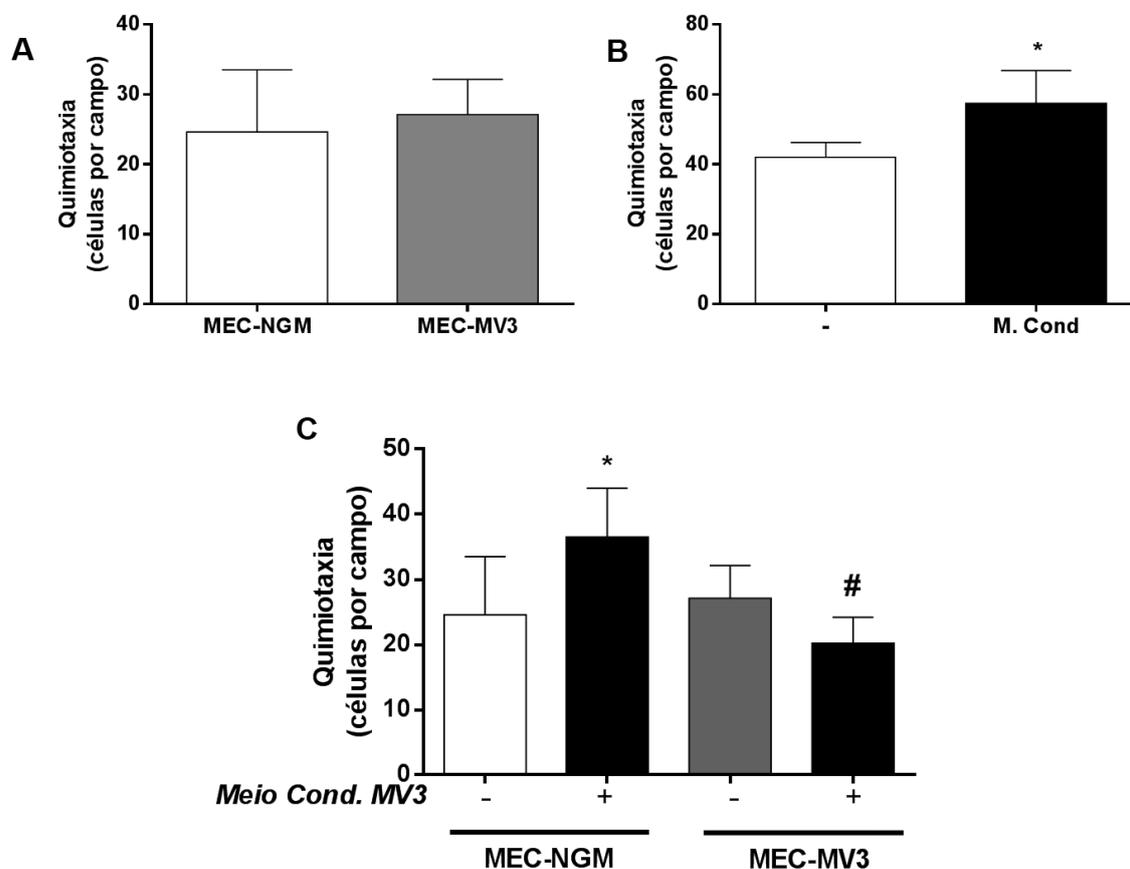
De maneira inversa ao encontrado no resultado avaliando a atividade de MMP-9, as matrizes não demonstraram efeito na atividade de MMP-2 em monócitos. De forma interessante, o meio condicionado da MV3 diminuiu a atividade de MMP-2 em monócitos cultivados sobre a matriz tumoral quando comparados as células na ausência de meio condicionado, enquanto o tratamento com ATL-1 foi capaz de induzir um aumento dessa atividade nos monócitos estimulados com meio condicionado, conforme demonstrado na figura 16 C e D.

5.6 O ATL-1 não tem efeito sobre a adesão de monócitos.

O processo de diapedese dos leucócitos depende da adesão dos monócitos às células endoteliais e proteínas de matriz (Kuijper e col., 1998). Com isso, analisamos a adesão de monócitos nas matrizes e com o meio condicionado. Para isso os monócitos foram previamente incubados com a sonda CMFDA (5 μ M) por 60 minutos, após serem lavados foram tratados ou não com ATL-1 (10 nM) e cultivados por 3 horas sobre as diferentes matrizes e na ausência ou presença do meio condicionado da MV3. Conforme demonstrado na figura 17 A e B, observamos que as matrizes e o meio condicionado da MV3 induziram aumento da adesão de monócitos.

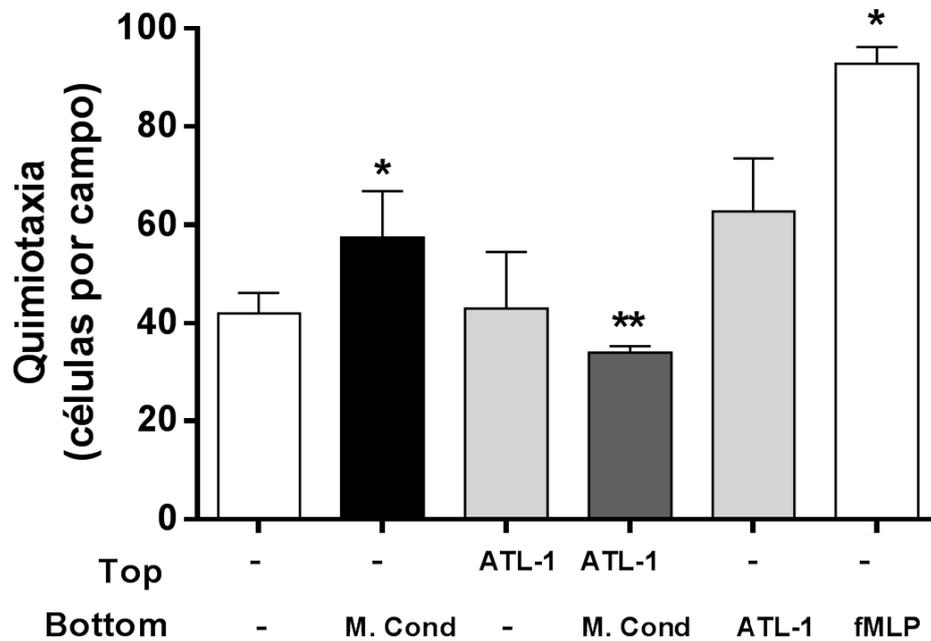
É bem descrito que a estimulação dos monócitos com LX aumenta significativamente a adesão de monócitos a proteínas de MEC, tais como laminina (Maddox e Serhan, 1996). Em nossos experimentos, o ATL-1 foi capaz de induzir aumento da adesão de monócitos sobre a matriz de melanócitos, mas não teve efeito sobre as células cultivadas na matriz tumoral (Figura 17 C). O análogo não demonstrou efeito em monócitos cultivados nas matrizes e na presença do meio condicionado da MV3 (Figura 17 D).

Figura 14 - A MEC tumoral diminui a migração de monócitos em direção ao meio condicionado da MV3.



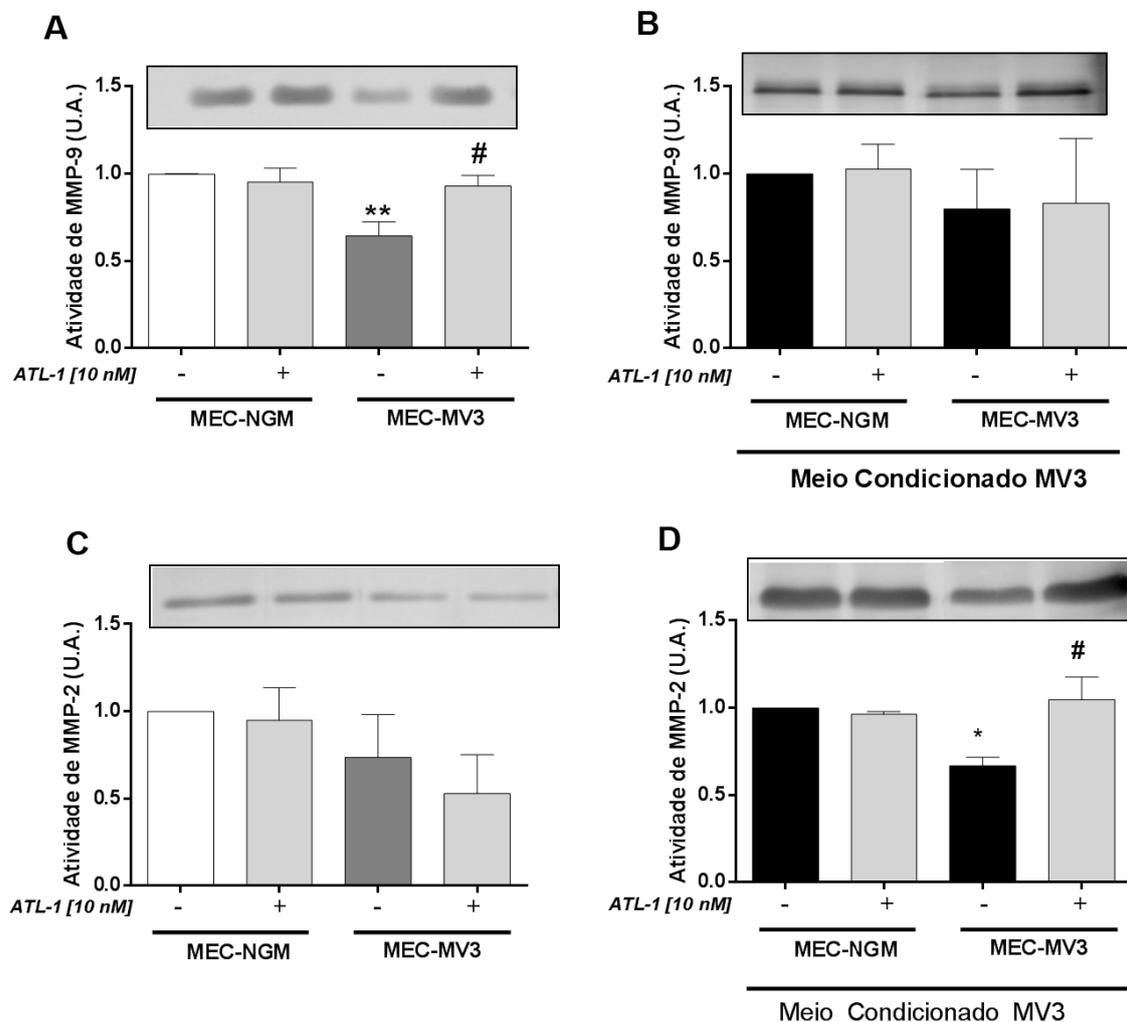
Legenda: Monócitos ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram ou não pré-incubadas com as diferentes MEC por 60 minutos. Após isso, os monócitos foram submetidos à quimiotaxia por 90 minutos utilizando como estímulos quimiotáticos: RPMI (**A**), o meio condicionado da MV3 (**B**). Monócitos incubados com as diferentes MEC migrando para o RPMI e para o meio condicionado da MV3 (**C**). *, $p < 0,05$ em relação ao controle. Resultados são mostrados como número de monócitos por campo. A figura indica a média \pm D.P de 3 experimentos realizados separadamente.

Figura 15 - O ATL-1 reduz a migração de monócitos para o meio condicionado tumoral.



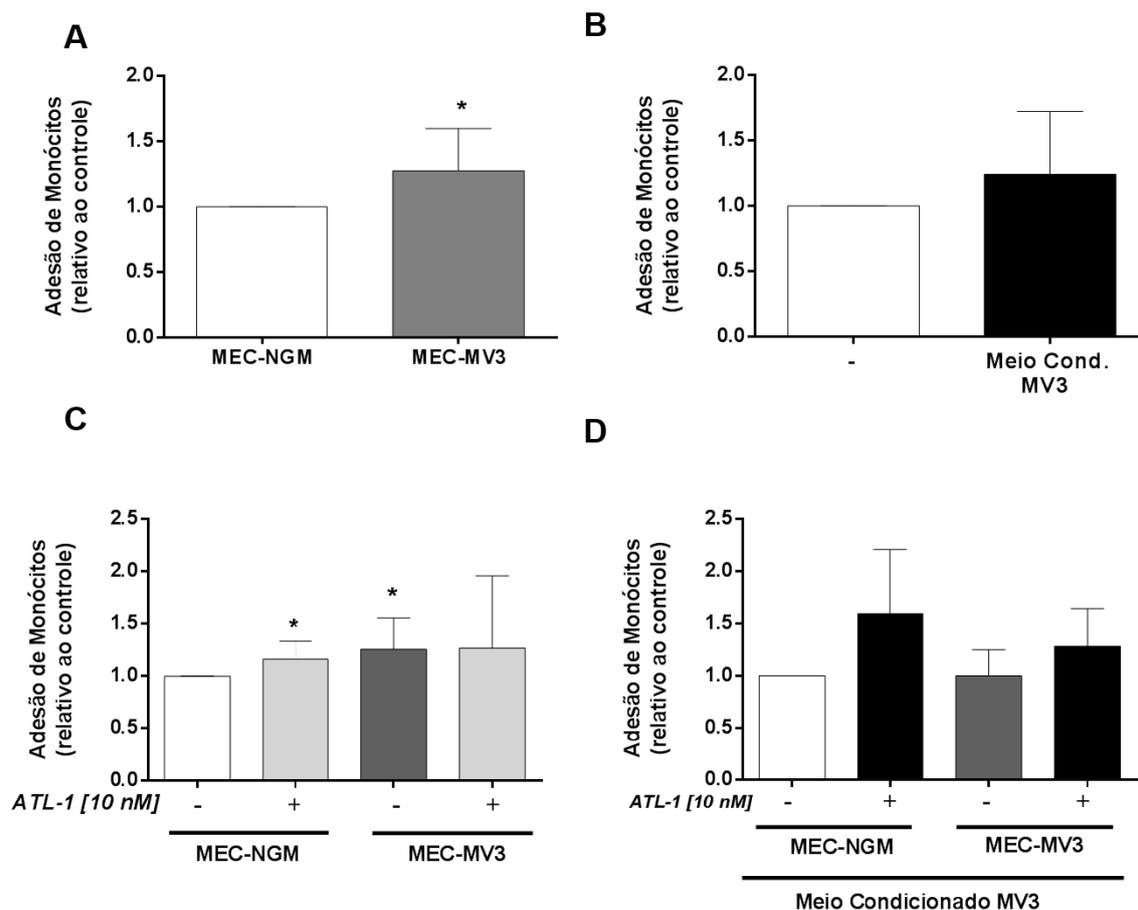
Legenda: Os monócitos ($1,5 \times 10^5$ células/poço) tratados ou não com ATL-1 migraram para RPMI ou meio condicionado de MV3 por 90 minutos. O fMLP foi utilizado como controle positivo desse experimento. *, $p < 0,05$ em relação ao controle. **, $p < 0,05$ em relação a monócitos estimulados com meio condicionado da MV3. Resultados são mostrados como número de monócitos por campo. A figura indica a média \pm D.P de 3 experimentos realizados separadamente.

Figura 16 - Componentes do microambiente tumoral regulam diferencialmente a atividade de MMP-9 / MMP-2.



Legenda: Os monócitos (1×10^6 células) foram pré-tratados ou não com ATL-1 (10 nM) por 15 minutos e cultivados sobre as diferentes MEC por 24 horas na ausência ou presença do meio condicionado da MV3 e o sobrenadante foi recolhido. **A) e B)** A atividade de MMP-9. **C) e D)** A atividade de MMP-2. A atividade de MMP-9 e MMP-2 foram analisadas através de um ensaio de zimografia com RPMI incompleto. A figura indica a média \pm D.P. de 2-4 experimentos realizados separadamente. *, $p < 0,05$ **, $p < 0,01$ em relação ao controle MEC-NGM e #, $p < 0,05$ em relação ao MEC- MV3.

Figura 17 – O ATL-1 não tem efeito sobre a adesão de monócitos.



Legenda: Monócitos (7×10^4 células/poço) incubados com CMFDA e tratados ou não com ATL-1 (10 nM) foram cultivados em placa preta de 96 poços sob a MEC da NGM e MV3 por 3 horas. Resultados são expressos como média \pm DP de 3 experimentos realizados separadamente. *, $p < 0,05$, quando comparado a MEC da NGM ausência de ATL-1. A figura indica a média \pm D.P de 3 experimentos realizados separadamente.

5.7 Componentes do microambiente tumoral não afetam a viabilidade de macrófagos.

Para investigar a viabilidade celular, realizamos ensaio para avaliar a ocorrência de apoptose através da marcação da célula com anexina V conjugada à FITC. Durante o processo de apoptose, a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana, ficando exposta e susceptível a ligação com anexina V. Como a translocação da fosfatidilserina também ocorre em processos de necrose, utilizamos o iodeto de propídio (PI), uma molécula que se intercala ao DNA quando a membrana celular está permeável, uma vez que não penetra na célula intacta em decorrência do seu grande peso molecular. Desse modo a marcação das células simultaneamente com Anexina V-FITC e PI permite a discriminação de três distintas situações: células viáveis, células no início da apoptose e células em apoptose tardia ou necróticas. Para isso os monócitos foram cultivados sobre a MEC da NGM e MV3 na ausência ou presença de meio condicionado da MV3 durante 7 dias para maturação em macrófagos. No 7º dia, os macrófagos foram tratados com ATL-1 por 15 minutos e a viabilidade foi analisada após 3 dias. Como descrito na figura 18 A e B, não observamos diferença significativa na viabilidade celular de macrófagos cultivados sobre as diferentes matrizes. Além disso, o tratamento com o meio condicionado da MV3 ou ATL-1 (10 nM) não foram capazes de alterar a viabilidade dessas células.

5.8 A MEC tumoral aumenta marcadores M2 nos macrófagos.

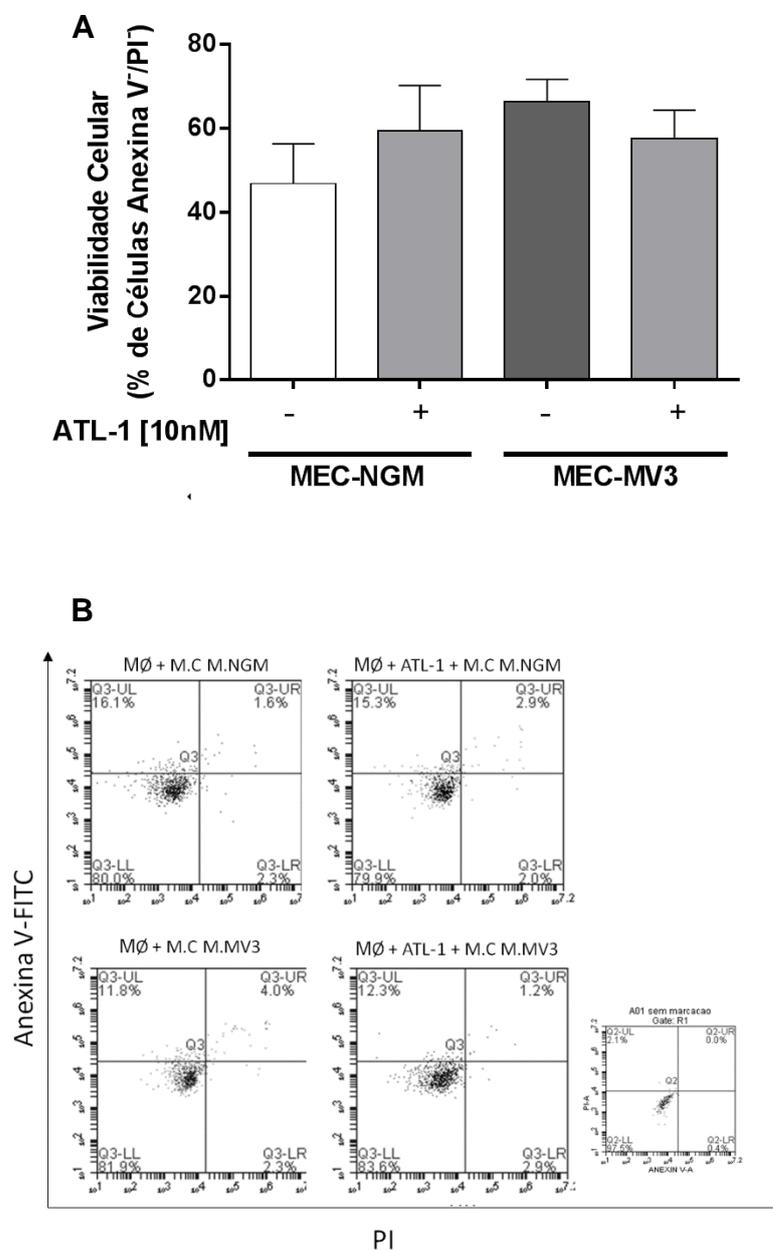
Nosso grupo já demonstrou anteriormente que o meio condicionado da MV3 induz um perfil M2 em macrófagos. No microambiente tumoral os macrófagos adquirem um perfil semelhante ao M2, sendo denominados TAM. O CD 206 é um receptor de manose que está expresso em macrófagos M2 juntamente com o CD163 que é um receptor *scavenger*. Nossos resultados apresentados até esta etapa evidenciam que o meio condicionado da MV3 e a MEC tumoral alteram o perfil da população de monócitos. Diante disso, investigamos o efeito da MEC na

modulação do perfil de macrófagos. Para isso cultivamos os monócitos por 7 dias sobre as diferentes matrizes na ausência ou presença do meio condicionado da MV3. Após o 7º dia os macrófagos foram tratados ou não com o ATL-1 (10 nM) por 15 minutos. No 10º dia, analisamos o perfil desses macrófagos utilizando os marcadores CD163-APC (M2) e CD206-PE (M2). Conforme demonstrado na figura 19, observamos que a MEC tumoral apresentam níveis maiores de CD206 (A) e CD163 (B), ambos marcadores do perfil M2. No entanto, o meio condicionado não foi capaz de potencializar o efeito induzido pela matriz tumoral (C).

5.9 O ATL-1 diminui a expressão de marcadores M2 nos macrófagos cultivados na MEC tumoral.

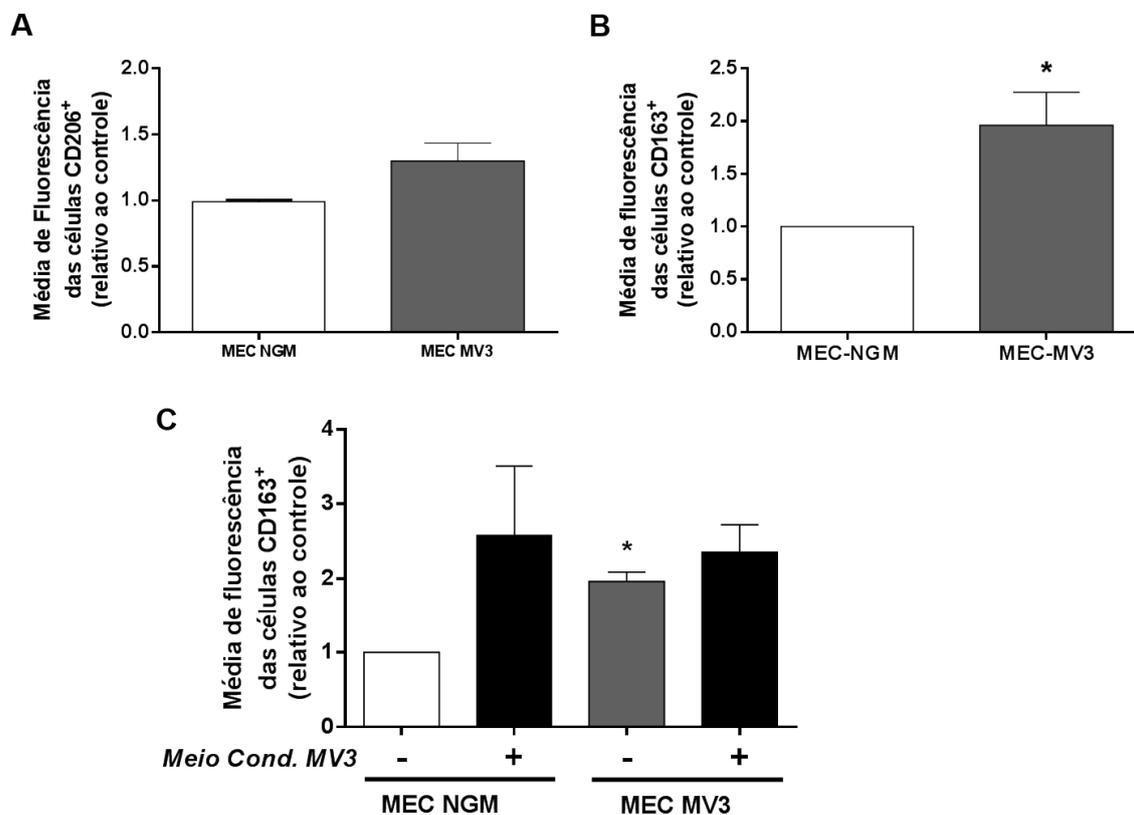
Como vimos que os macrófagos diferenciados sobre a MEC tumoral se assemelham ao perfil M2 dos TAM, investigamos se o ATL-1 modula o perfil desses macrófagos. Os macrófagos foram diferenciados por 7 dias sobre as MEC e no 7º dia foram tratados com ATL-1 (10 nM) por 15 minutos. No 10º dia as células foram analisadas por citometria de fluxo. Vimos que o ATL-1 aumenta a expressão de CD206 (Figura 20 A) e tende a aumentar os níveis de CD163 (Figura 20 B) em macrófagos cultivados sobre a matriz de melanócitos. Enquanto o ATL-1 aumenta a expressão de CD206 em macrófagos cultivados sobre a matriz de melanócitos, o ATL-1 tende a diminuir a expressão de marcadores M2 induzida pela matriz tumoral (Figura 20).

Figura 18 - Componentes do microambiente tumoral não afetam a viabilidade dos Macrófagos.



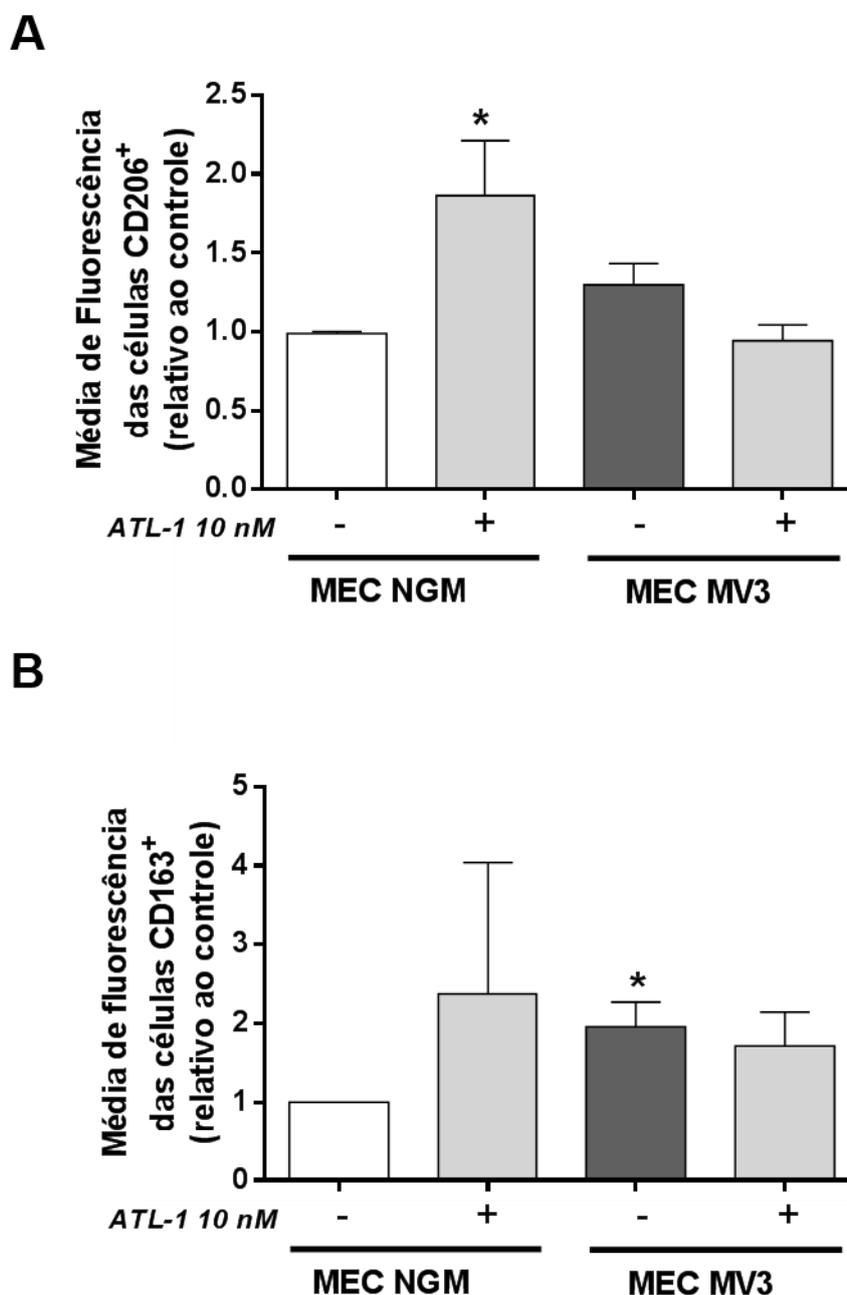
Legenda: A) Os monócitos (1×10^6 células) foram cultivados sobre as diferentes matrizes por 7 dias. No 7º dia as células foram tratadas ou não com ATL-1 por 15 minutos, e após 3 dias a análise da viabilidade foi feita. As células foram ressuspensas em tampão de ligação, marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. Gráfico representativo da porcentagem de fluorescência. **B)** Os monócitos foram cultivados em placas de 24 poços sob as diferentes matrizes por 7 dias na ausência ou presença do meio condicionado da MV3. No 7º dia as células foram tratadas ou não com ATL-1 por 15 minutos, e após 3 dias a análise da viabilidade foi feita. A figura é representativa de 3 experimentos realizados separadamente.

Figura 19 - A MEC da MV3 aumenta a expressão de marcadores M2 nos macrófagos.



Legenda: Os macrófagos (1×10^6 células) foram cultivados por 7 dias na ausência ou na presença do meio condicionado da MV3. No 7º dia as células foram analisadas por citometria de fluxo utilizando os marcadores CD206-PE e CD163-APC. **A)** Média de fluorescência dos macrófagos CD206⁺. **B)** Média de fluorescência dos macrófagos CD163⁺. A figura indica a média \pm D.P de 3 experimentos realizados separadamente. **C)** Média de fluorescência dos macrófagos CD163⁺ cultivados sobre diferentes matrizes e na presença do meio condicionado da MV3. A figura indica a média \pm E.P de 2 experimentos realizados separadamente.

Figura 20 - O ATL-1 diminui a expressão de marcadores M2 nos macrófagos cultivados na MEC tumoral.



Legenda: Os macrófagos (1×10^6 células) foram diferenciados por 7 dias sobre as MEC e no 7^o dia foram tratados com ATL-1 (10 nM) por 15 minutos. No 10^o dia as células foram analisadas por citometria de fluxo utilizando os marcadores CD206-PE e CD163-APC. **A)** Média de fluorescência dos macrófagos CD206⁺. **B)** Média de fluorescência dos macrófagos CD163⁺. A figura indica a média \pm D.P de 2 experimentos realizados separadamente.

6. DISCUSSÃO

Atualmente está bem estabelecida a importância do microambiente do tumor, apoiada no conceito de que células tumorais não manifestam a doença somente por si, mas sim recrutam as células normais do sistema imune para que estas possam servir como membros contribuintes para este microambiente (Hanahan e Coussens, 2012). No entanto, algumas interações que ocorrem entre o microambiente imunológico e tumoral precisam ser melhores elucidadas. A imunovigilância do hospedeiro protege contra o tumor, mas fatores como a inflamação crônica e fatores presentes no tumor estão envolvidos na expansão e progressão tumoral. Estes muitos fatores desempenham uma resposta antitumoral no microambiente do tumor, regulando células mielóides que atuam na inflamação tais como monócitos e macrófagos.

Os monócitos podem se diferenciar em macrófagos e participar da resposta antitumoral do hospedeiro (Dauer e col., 2003; Feng e col., 2011). Os macrófagos formam a população de células do sistema imune mais abundante presente no microambiente tumoral e possuem importantes papéis na progressão neoplásica, modulando a migração, invasão, angiogênese e metástase. Monócitos alcançam o foco tumoral, se diferenciam em macrófagos e polarizam diferentemente de acordo com a ação de mediadores presentes neste local (Sica e col., 2008; Mantovani e col., 2008). Logo é necessário compreender a estrutura do microambiente do tumor para a compreensão e o desenvolvimento futuro de novas abordagens eficazes para controlar a doença (Yu e col.; 2006; Mohamed e col.; 2014). Diante disso, o objetivo desse trabalho foi investigar o papel de dois elementos desse microambiente tumoral na ativação e modulação dos monócitos e macrófagos: o meio condicionado secretado pela célula tumoral; e a MEC produzida pela célula tumoral.

Nosso grupo já desenvolveu vários trabalhos com LX confirmando seus efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos em monócitos e em células endoteliais. Nas células mononucleares, as LX exibem atividades estimulatórias bastante específicas, inibindo a apoptose, além de estimular a migração e adesão, porém sem ativar propriedades tóxicas (Maddox e Serhan, 1996, Simões e col., 2010). Em outro trabalho, nosso grupo demonstrou que o ATL-1 *in vitro* e *in vivo* induz uma alteração fenotípica nos TAMs, induzindo um perfil M1-like com alta atividade citotóxica, resultando na apoptose das células tumorais (De Brito, 2013; Costa,

2014). Estes efeitos em macrófagos nos levaram a estudar o possível efeito da LX na modulação de monócitos e macrófagos por componentes do microambiente tumoral.

Inicialmente acreditava-se que a expressão de CD16 estava restrita a um subconjunto de macrófagos maduros. No entanto, também se verificou que um subconjunto de monócitos circulantes co-expressam CD14 e CD16. Estes monócitos CD14⁺CD16⁺constituem cerca de 10% de todos os monócitos em pessoas saudáveis e pouco se sabe sobre a atividade antitumoral desta subpopulação de monócitos (Ziegler-Heitbrock HW e col., 1992). Estudos clínico patológicos indicam que a sub-população de monócitos CD16⁺estão presentes no infiltrado de células mononucleares do tumor e localizada na proximidade de células tumorais (Van Ravenswaay CM, 1992).

Em nosso estudo vimos que a matriz e o meio condicionado isoladamente não alteram a expressão de CD16 em monócitos. No entanto, quando os monócitos são cultivados sobre a matriz, na presença de meio condicionado, ocorre um retardo na expressão CD16, o que nos leva a crer que o efeito na polarização de monócitos depende de algum fator secretado pelas células tumorais agindo sinergicamente com componentes da MEC. Estes resultados estão de acordo com dados anteriores do nosso grupo onde observamos, utilizando um modelo de melanoma murino, o aumento na população de monócitos Ly6C^{high} (correspondente aos monócitos clássicos em humanos) e a diminuição população Ly6C^{low}(correspondente aos monócitos não clássicos) no sangue de camundongos. Além disso, é bem conhecido que os monócitos clássicos migram para o sítio tumoral e participam de diferentes eventos relacionados ao desenvolvimento tumoral (Biswas e Mantovani, 2010; Murray, T. A. Wynn 2011; Wynn e col., 2013; Franklin e col., 2014). Sugerimos assim que a regulação do perfil fenotípico pelo microambiente tumoral é uma etapa fundamental para a progressão tumoral. Esta modulação depende da ação de mediadores liberados pelo tumor e também por proteínas presentes na matriz tumoral agindo em conjunto. No entanto, maiores estudos devem ser realizados para determinar os mecanismos pelos quais a regulação do perfil de monócitos é regulada.

Observamos, ainda, que a menor expressão de CD16 está associada a aos efeitos sobre a população intermediária CD14⁺CD16⁺, uma vez que não observamos diferença na população de monócitos não-clássicos. Há um grande paradoxo na

função dos monócitos intermediários no câncer. Schauer e colaboradores (2012) observaram que a incubação de células mononucleares com o sobrenadante das linhagens tumorais de cólon resulta na rápida indução de CD14⁺⁺CD16⁺ sugerindo assim que fatores derivados do tumor podem ser responsáveis pelo aumento do número de monócitos intermediários (Schauer, 2012). Estudos recentes demonstram que os monócitos não clássicos são vistos como patrulhadores e são responsáveis pela remoção de material tumoral em foco de metástase, controlando o processo metastático durante o desenvolvimento tumoral (Hanah e col., 2015). Logo, a diminuição de monócitos CD16⁺ pode ser um importante evento induzido pelo tumor para facilitar o estabelecimento e progressão tumoral.

Os monócitos CD14^{dim}CD16⁺ são caracterizados pela alta expressão de CX3CR1 (Qian e col., 2011). Muitos estudos têm relatado que a expressão de CX3CL1 pelas células tumorais ou células associadas ao tumor tem papel antitumoral e está correlacionado com bom prognóstico (Park e col., 2013; Kee e col., 2013). Em nossos resultados vimos que o meio condicionado diminui a expressão de CX3CR1 em monócitos, contribuindo para sua função pró-tumoral. De forma interessante, enquanto diminuiu a expressão de CX3CR1 em monócitos na ausência do meio condicionado, o ATL-1 aumentou a expressão deste receptor quando os monócitos foram cultivados na presença de meio condicionado de MV3. Estes resultados indicam que o análogo modula o perfil de monócitos por fatores liberados pelo tumor. Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que a LX possui um papel seletivo na polarização de macrófagos. LX altera o perfil M2 de TAM em direção a um perfil M1, enquanto não possui efeito em outros tipos de macrófagos M2. Em conjunto, estas evidências apontam um efeito seletivo da LX em células mononucleares moduladas por fatores presentes no microambiente.

Macrófagos M1 produzem óxido nítrico (NO) através do catabolismo da L-arginina mediado pela ativação de iNOS. Enquanto isso, a ativação do perfil M2 em TAMs induz a expressão de arginase-1, que compete com a iNOS pelo mesmo substrato metabolizando arginina em ornitina e poliaminas, precursores necessários para a síntese do colágeno e proliferação celular, respectivamente (Martinez e col., 2007). Dessa forma, a relação entre iNOS e arginase-1 é utilizada para a caracterização dos perfis de monócitos e macrófagos. Szaflarska e colaboradores (2004) demonstraram que a expressão de iNOS e a liberação de NO foi maior nos monócitos CD14⁺CD16⁺ estimulados por células tumorais enquanto não foi

observada em monócitos clássicos CD14⁺CD16⁻. Este autor não diferencia as populações de monócitos intermediários e não clássicos, logo esses resultados são de células positivas para CD16, onde estão inseridas as duas subpopulações. Dessa forma, sugerimos que a diminuição da produção de NO induzida pelo meio condicionado de MV3 pode estar relacionada a alteração do perfil fenotípico de monócitos e redução da população de monócitos CD16⁺.

Dados anteriores do nosso grupo demonstram que o ATL-1 aumenta a relação iNOS/Arginase, alterando o perfil de M2 de TAMs para um perfil M1. Em nossos resultados vimos que monócitos incubados com meio condicionado da MV3 apresentam altos níveis de arginase diminuindo assim, a relação iNOS/Arginase. Em nosso trabalho, demonstramos que o ATL-1 aumenta essa relação quando comparamos com os monócitos tratados com o meio condicionado, possivelmente ativando propriedades citotóxicas em monócitos. Estes dados corroboram resultados anteriores do nosso grupo em que a LX aumenta a produção de NO em TAMs através do aumento da razão iNOS/arginase-1. Em conjunto, estes dados sugerem que a LX pode regular o perfil de células mononucleares em diversas etapas do desenvolvimento celular.

Como analisamos as respostas iniciais na modulação dos monócitos e o efeito do ATL-1 nesta modulação, investigamos os principais eventos que ocorrem desde a saída de monócitos do sangue até a chegada ao foco tumoral, tais como migração, liberação de MMPs e adesão celular, além da diferenciação em macrófagos no microambiente tumoral.

Monócitos são recrutados para os sítios de lesões e inflamação bem como locais de tumor através de estímulos inflamatórios. Já está bem estabelecido que ocorrem interações específicas entre células inflamatórias e componentes da MEC. A maioria dos estudos nesta área dizem respeito aos efeitos de fragmentos da MEC sobre a produção proteases ou citocinas pelos monócitos e macrófagos (Horton e col., 1999; Horton e col., 2000; Xie e col., 1998; Adair-Kirk e col., 2008). Em nosso trabalho observamos as respostas de células mononucleares ao atravessarem a MEC tumoral em direção ao tumor, aqui mimetizado pelo meio condicionado tumoral. Nossos resultados mostram que o meio condicionado tumoral aumenta a migração de monócitos humanos, podendo ser pelo fato dos monócitos já estarem sendo polarizados, visto a diminuição da relação iNOS/Arginase, e então aumentaria sua migração em direção ao tumor.

Além disso, observamos que, surpreendentemente, monócitos não migram para o meio condicionado de MV3 quando pré-incubados com a matriz tumoral. Diversos autores mostram que vários tumores, incluindo o melanoma, expressam CCL2, uma citocina altamente quimiotática para monócitos e macrófagos (Graves e col., 1992; Ansari e col., 2011; Heon-Woo e col., 2013). Dessa forma, sugerimos que a inibição da migração para o meio condicionado da MV3 em monócitos que foram ativados pela adesão a matriz tumoral pode estar relacionada com mecanismo de dessensibilização do receptor CCR2. No entanto, estudos mais detalhados serão realizados para investigarmos os mecanismos envolvidos na migração de monócitos para o meio condicionado da MV3.

LX e o ATL estimulam a quimiotaxia de monócitos (Maddox e Serhan, 1996, Simões e Fierro, 2005). Em nossos resultados vimos um efeito duplo do ATL-1 nos monócitos. Confirmando os dados da literatura, vimos que o ATL-1 age como estímulo quimiotático. No entanto, quando os monócitos são tratados com ATL-1, ocorre a diminuição da migração de monócitos em direção ao meio condicionado da MV3, demonstrando, mais uma vez, um efeito seletivo da LX na modulação dessas células no microambiente tumoral.

A migração celular e invasão são processos complexos que envolvem a ativação de diferentes MMPs, resultando na degradação da matriz tumoral (Qian, 2012). Além disso, MMPs com propriedades de gelatinases desempenham um papel dominante nos eventos de invasão pela membrana basal devido a sua capacidade para degradar o colágeno IV (Egeblad e Werb, 2002; Bauvois, 2011). Em nossos resultados vimos uma regulação diferencial da atividade de MMP-2 e MMP-9 pelos componentes do microambiente tumoral. Demonstramos, ainda, que monócitos cultivados na matriz da MV3 ou na presença de meio condicionado apresentam uma redução na atividade de MMP-9 e MMP-2, respectivamente. Estes dados contrastam alguns trabalhos demonstrando que níveis elevados de MMP-2 e/ou MMP-9 são encontrados vários tipos de câncer inclusive o melanoma (Turpeenniemi-Hujanen, 2005). No entanto, Helal e colaboradores (2016, dados não publicados) observaram que a matriz do melanoma apresenta uma diminuição de fibronectina e aumento de laminina e tenascina quando comparados à matriz produzida por melanócitos. A adesão mediada por fibronectina é necessária para a indução da expressão gênica de MMP-9 durante a diferenciação de monócitos (Xie e col., 1998). Sugerimos então que a diminuição da atividade de MMP-9 pode estar associada com a diminuição de

fibronectina na matriz do melanoma. Entretanto, a investigação da produção MMPs por monócitos e macrófagos *in vitro* possui limitações, pois os métodos de preparação de células, a pureza das populações e condições de cultura podem ter uma grande influência sobre a expressão das MMPs. É importante salientar, no entanto, que o tratamento com ATL-1 aumenta a atividade de MMP-2 e MMP-9 em monócitos estimulados por componentes do microambiente tumoral, demonstrando que a alteração fenotípica induzida pela LX em monócitos resulta na modulação da atividade MMPs no microambiente tumoral.

A adesão dos monócitos circulantes através de receptores de adesão é um primeiro passo importante na resposta inflamatória. Os monócitos do sangue periférico expressam uma ampla variedade de moléculas de adesão que os permitem aderir a células endoteliais e proteína da MEC (Kuijper e col., 1998). As interações entre célula matriz são cruciais para a diferenciação de monócitos em macrófagos. Kamoshida e col (2012) relataram que a adesão de células a proteínas de MEC possui um papel fundamental na diferenciação de monócitos em TAM (Kamoshida e col., 2012). Em nosso trabalho, demonstramos que a matriz tumoral induz a adesão de monócitos. Isso pode ser justificado pela presença de diversas proteínas produzidas diferencialmente pelo melanoma, tais como laminina e tenascina (Helal e col., 2016). Apesar do tratamento com o ATL-1 não apresentar diferença significativa em monócitos sobre a matriz de melanoma, aumenta a adesão quando monócitos são cultivados sobre a matriz de melanócitos, corroborando com dados da literatura demonstrando que ATL-1 aumenta a adesão de monócitos à laminina-5 (Maddox e Serhan, 1996).

Nosso grupo já vem demonstrando que o ATL-1 tem capacidade de modular o perfil dos macrófagos que, quando cultivados na presença do meio condicionado da MV3, exibem um perfil semelhante ao M2. Em nosso trabalho demonstramos que a matriz tumoral também modula o perfil desses macrófagos. Conforme já demonstrado pelo nosso grupo utilizando apenas o meio condicionado de MV3, o ATL-1 também possui potente efeito antitumoral, alterando o perfil M2 induzido pela matriz tumoral. Estes dados sugerem que o fenótipo de TAM é regulado por diferentes componentes do microambiente tumoral, tais como proteínas de matriz e fatores solúveis produzidos pelas células tumorais. No momento, estamos realizando alguns experimentos para investigar quais seriam esses fatores e os

possíveis mecanismos pelos quais o microambiente regula o perfil de TAM e como a LX exerce seus efeitos antitumorais.

Neste estudo observamos a contribuição de dois importantes componentes do microambiente para a progressão tumoral. Além do meio condicionado isoladamente, vimos que em conjunto com MEC estes atuam como fatores responsáveis pelos principais eventos na progressão tumoral, como a regulação fenotípica de monócitos e macrófagos, através da expressão de CD16, CX3CR1 e marcadores M2. Além disso, estes componentes regulam efeitos funcionais como aumento da relação iNOS/Arginase, aumento da migração e adesão celular. O conhecimento da composição da matriz tumoral e dos fatores presentes no meio secretado pelas células tumorais possibilita a compreensão da modulação de monócitos e macrófagos. Em conjunto, estes resultados apontam para um importante papel da LX no controle tumoral, possibilitando o desenvolvimento de novas ferramentas a serem utilizadas no tratamento desta doença.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, traz um componente do microambiente tumoral, a matriz extracelular em uma visão diferente para a progressão tumoral. Além do meio condicionado isoladamente ou conjunto com MEC atuam nos principais eventos na progressão tumoral, no aumento da migração e adesão celular, como na regulação fenotípica de monócitos e macrófagos. E vimos também o efeito do ATL-1 na modulação de alguns desses eventos. O conhecimento da composição da matriz tumoral e dos fatores presentes no meio secretado pelas células tumorais possibilita a compreensão da modulação de monócitos e macrófagos. Em conjunto, estes resultados apontam para um importante papel da LX no controle tumoral, possibilitando o desenvolvimento de novas ferramentas a serem utilizadas no tratamento desta doença.

REFERÊNCIAS

ABASTADO, Jean-Pierre. The next challenge in cancer immunotherapy: controlling T-cell traffic to the tumor. **Cancer research**, v. 72, n. 9, p. 2159-2161, 2012.

ADAIR-KIRK, Tracy L.; SENIOR, Robert M. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 6, p. 1101-1110, 2008.

ADIL, AA Mohamed et al. Cancer immunotherapy: Targeting immunosuppressive tumor microenvironment. **Oncobiology and Targets**, v. 1, n. 1, p. 16, 2014.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Biologia Molecular da Célula*. 5a Edição. Artmed, 2010. 1396p.

ALIBERTI, Julio; SERHAN, Charles; SHER, Alan. Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 196, n. 9, p. 1253-1262, 2002.

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.

ANSARI, Abdul W. et al. CCL2: A potential prognostic marker and target of anti-inflammatory strategy in HIV/AIDS pathogenesis. **European journal of immunology**, v. 41, n. 12, p. 3412-3418, 2011.

ATKINS, Michael B. et al. Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 35, p. 5748-5754, 2008.

BAE, Yoe-Sik et al. Differential activation of formyl peptide receptor signaling by peptide ligands. **Molecular pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 841-847, 2003.

BALKWILL, Frances R.; MANTOVANI, Alberto. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2012. p. 33-40.

BANDEIRA-MELO, Christianne et al. Inhibition of Allergen-Induced Eosinophil Migration by Lipoxin (LX) A4 and Aspirin-Triggered 15-Epi-LXA4. In: **Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury**, 5. Springer US, 2002. p. 211-216.

BARNHART, Carrie. Pembrolizumab: First in Class for Treatment of Metastatic Melanoma. **Journal of the advanced practitioner in oncology**, v. 6, n. 3, p. 234, 2015.

BAUVOIS, Brigitte. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1825, n. 1, p. 29-36, 2012.

BAZAN, J.F, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. **Nature**, v.385, p. 640-644, 1997.

BISWAS, Subhra K.; MANTOVANI, Alberto. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature immunology**, v. 11, n. 10, p. 889-896, 2010.

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.

CANNY, Geraldine et al. Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 6, p. 3902-3907, 2002.

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.

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.

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.

CIVETTA MT, CIVETTA JD. Carcinogenesis. *SaludPublica Mex.* 2011; 53:405-14.

CLARIA, Joan; SERHAN, Charles N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 21, p. 9475-9479, 1995.

COTRANR.S., KUMAR V., ROBBINS S.L. AND SCHOEN F.J. Robbins pathologic basis of disease.W.B. Saunders. 1994; pp 1-35

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

CROS, Jérôme et al. Human CD14 dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. **Immunity**, v. 33, n. 3, p. 375-386, 2010.

- DAUER, Marc et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 8, p. 4069-4076, 2003.
- DE PALMA, Michele; LEWIS, Claire E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. **Cancer cell**, v. 23, n. 3, p. 277-286, 2013.
- DENARDO, David G. et al. CD4+ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. **Cancer cell**, v. 16, n. 2, p. 91-102, 2009.
- DUFTON, Neil; PERRETTI, Mauro. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. **Pharmacology & therapeutics**, v. 127, n. 2, p. 175-188, 2010.
- EDENIUS, Charlotte; HAEGGSTRÖM, Jesper; LINDGREN, Jan Åke. Transcellular conversion of endogenous arachidonic acid to lipoxins in mixed human platelet-granulocyte suspensions. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 157, n. 2, p. 801-807, 1988.
- EGEBLAD, Mikala; WERB, Zena. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161-174, 2002.
- FENG, A.-L. et al. CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 164, n. 1, p. 57-65, 2011.
- FERRETTI, Elisa; PISTOIA, Vito; CORCIONE, Anna. Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor in the pathogenesis of inflammatory and malignant diseases with emphasis on B cell malignancies. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014.
- FIERRO, I. M.; SERHAN, C. N. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 5, p. 555-566, 2001.
- 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.
- FRANKLIN, Ruth A. et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. **Science**, v. 344, n. 6186, p. 921-925, 2014.
- FREEDBERG I, Eisen A, Wolff K, Austen F, Goldsmith L, Katz S. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2003.
- GEISSMANN, Frederic et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.

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.

GORDON, Siamon; TAYLOR, Philip R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005.

GRAVES, D. T. et al. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human melanoma in vivo. **The American journal of pathology**, v. 140, n. 1, p. 9, 1992.

GRONERT, Karsten et al. 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. **The American journal of pathology**, v. 158, n. 1, p. 3-9, 2001.

HANAHAN, Douglas; COUSSENS, Lisa M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer cell**, v. 21, n. 3, p. 309-322, 2012.

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

HANNA, Richard N. et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. **Science**, v. 350, n. 6263, p. 985-990, 2015.

HANNA, Richard N. et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. **Science**, v. 350, n. 6263, p. 985-990, 2015.

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

HARISI, Revekka; JENEY, Andras. Extracellular matrix as target for antitumor therapy. **OncoTargets and therapy**, v. 8, p. 1387, 2015.

HORTON Maureen R. et al. Induction and regulation of macrophage metalloelastase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. **J Immunol**, v. 162, p. 4171–4176, 1999.

HORTON Maureen R. et al. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. **Am J Physiol Lung Cell MolPhysiol**, v. 279, p. 707–715, 2000.

HUME, David A. The many alternative faces of macrophage activation. **Frontiers in immunology**, v. 6, 2015.

IMAI T. mai T, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. **Cell**, v. 91, p. 521-530, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, Estimativa 2016.dísonível em:
<<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/sobre-as-estimativas.asp>>Acesso em: 29 de novembro de 2015.

ITALIANI, Paola; BORASCHI, Diana. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. **M1/M2 Macrophages: The Arginine Fork in the Road to Health and Disease**, p. 47, 2015.

JAYASHREE, B. S. et al. Targets in anticancer research—A review. **Indian journal of experimental biology**, v. 53, p. 489-507, 2015.

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

KAMOSHIDA, Go et al. Monocyte differentiation induced by co-culture with tumor cells involves RGD-dependent cell adhesion to extracellular matrix. **Cancer letters**, v. 315, n. 2, p. 145-152, 2012.

KEE, Ji-Ye et al. Antitumor immune activity by chemokine CX3CL1 in an orthotopic implantation of lung cancer model in vivo. **Molecular and clinical oncology**, v. 1, n. 1, p. 35-40, 2013.

KOMOHARA, Yoshihiro et al. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. **Advanced drug delivery reviews**, 2015.

KUIJPER, P. H. et al. P-selectin and MAC-1 mediate monocyte rolling and adhesion to ECM-bound platelets under flow conditions. **Journal of leukocyte biology**, v. 64, n. 4, p. 467-473, 1998.

KUMAR, V., FAUSTO, N., ABBAS, A. Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 8ª edição. Elsevier, 2010. 1480p.

KUMAR, V., FAUSTO, N., ABBAS, A. Robbins and Cotran. Pathological Basis of Disease, W.B. 7th Edition. Saunders Company. Philadelphia, 2004. 1525p.

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.

LEE, Heon-Woo et al. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1835, n. 2, p. 170-179, 2013.

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.

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

LU, Pengfei; WEAVER, Valerie M.; WERB, Zena. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **The Journal of cell biology**, v. 196, n. 4, p. 395-406, 2012.

MACDONALD, Kelli PA et al. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3955-3963, 2010.

MACHADO, Fabiana S. et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nature medicine**, v. 12, n. 3, p. 330-334, 2006.

MADDOX, Jane F.;SERHAN, Charles N. Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 1, p. 137-146, 1996.

MADDOX, Jane F.;SERHAN, Charles N. Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 1, p. 137-146, 1996.

MADERNA, Paola et al. Lipoxins induce actin reorganization in monocytes and macrophages but not in neutrophils: differential involvement of rho GTPases. **The American journal of pathology**, v. 160, n. 6, p. 2275-2283, 2002.

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

MANTOVANI, Alberto; ALLAVENA, Paola. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. **The Journal of experimental medicine**, v. 212, n. 4, p. 435-445, 2015.

MARASTONI, Stefano et al. Extracellular matrix: a matter of life and death. **Connective tissue research**, v. 49, n. 3-4, p. 203-206, 2008.

MARCHESI, F. M. et al. Role of CX₃CR1/CX₃CL1 axis in primary and secondary involvement of the nervous system by cancer, **Journal of Neuroimmunology**, v. 224, n. 1-2, p. 39-44, 2010.

MARTINEZ, Fernando Oneissi et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 13, p. 453-461, 2007.

MCCMAHON, Blaithe et al. Lipoxins: revelations on resolution. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 8, p. 391-395, 2001.

MENDES, Gelcio LQ; KOIFMAN, Rosalina Jorge; KOIFMAN, Sergio. Mortality frequency and trends attributed to melanoma in Brazil from 1980-2005. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 73, n. 13-14, p. 850-857, 2010.

MITCHELL, Siobhan et al. Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 10, p. 2497-2507, 2002.

MOHAMED Adil A et al. Cancer immunotherapy: Targeting immunosuppressive tumor microenvironment. **Oncobiology and Targets**, v. 1, n. 1, p. 16, 2014.

MORANDI, V. et al. PROINFLAMMATORY CYTOKINES DOWN-REGULATE SYNTHESIS AND SECRETION OF THROMBOSPONDIN BY HUMAN ENDOTHELIAL-CELLS. In: **FASEB JOURNAL**. 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL, 1994. p. A37-A37.

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

MURRAY, Peter J.; WYNN, Thomas A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.

NAGARAJ, Srinivas; GABRILOVICH, Dmitry I. Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. **Cancer research**, v. 68, n. 8, p. 2561-2563, 2008.

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.

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

NHI, National Health Institute. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>> Acesso em: 29 de novembro de 2015.

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

OKUYAMA, H.; INOUE, M. [Hypoxic microenvironment and cancer dormancy]. **Gan to kagakuryoho. Cancer & chemotherapy**, v. 38, n. 10, p. 1559-1564, 2011.

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

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

ÖZBEK, Suat et al. The evolution of extracellular matrix. **Molecular biology of the cell**, v. 21, n. 24, p. 4300-4305, 2010.

PAREKH, Aron et al. Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. **Biophysical journal**, v. 100, n. 3, p. 573-582, 2011.

PARK, Catherine C.; BISSELL, Mina J.; BARCELLOS-HOFF, Mary Helen. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. **Molecular medicine today**, v. 6, n. 8, p. 324-329, 2000.

PARRI, Matteo; CHIARUGI, Paola. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. **Cell Commun Signal**, v. 8, n. 23, p. 10.1186, 2010.

PHILIP, Mary; ROWLEY, Donald A.; SCHREIBER, Hans. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2004. p. 433-439.

PICKUP, Michael W.; MOUW, Janna K.; WEAVER, Valerie M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO reports**, p. e201439246, 2014.

QIAN, Bin-Zhi et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 222-225, 2011.

QIAN, Bin-Zhi; POLLARD, Jeffrey W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39-51, 2010.

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

ROGACEV, Kyrill S.; HEINE, Gunnar H. Human monocyte heterogeneity—a nephrological perspective. **Néphrologie & thérapeutique**, v. 6, n. 4, p. 219-225, 2010.

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.

SCALIA, Rosario et al. Lipoxin A4 stable analogs inhibit leukocyte rolling and adherence in the rat mesenteric microvasculature: role of P-selectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 18, p. 9967-9972, 1997.

SCHALDACH, C. M.; RIBY, Jacques; BJELDANES, Leonard F. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. **Biochemistry**, v. 38, n. 23, p. 7594-7600, 1999.

SCHAUER, Dominic et al. Intermediate monocytes but not TIE2-expressing monocytes are a sensitive diagnostic indicator for colorectal cancer. **PloSone**, v. 7, n. 9, p. e44450, 2012.

SCHMALL, Anja et al. Macrophage and cancer cell cross-talk via CCR2 and CX3CR1 is a fundamental mechanism driving lung cancer. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 191, n. 4, p. 437-447, 2015.

SETHI, Tariq et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. **Nature medicine**, v. 5, n. 6, p. 662-668, 1999.

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

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

SIMOES, R. L. et al. A synthetic analog of 15-epi-lipoxin A 4 inhibits human monocyte apoptosis: Involvement of ERK-2 and PI3-kinase. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 91, n. 1, p. 10-17, 2010.

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.

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.

SODIN-SEMRL, Snezna et al. Lipoxin A4 inhibits IL-1 β -induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 5, p. 2660-2666, 2000.

SOUCY, Patricia A.; ROMER, Lewis H. Endothelial cell adhesion, signaling, and morphogenesis in fibroblast-derived matrix. **Matrix Biology**, v. 28, n. 5, p. 273-283, 2009.

SOYOMBO, O.; SPUR, B. W.; LEE, T. H. Effects of lipoxin A4 on chemotaxis and degranulation of human eosinophils stimulated by platelet-activating factor and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. **Allergy**, v. 49, n. 4, p. 230-234, 1994.

SZAFLARSKA, Anna et al. Antitumor response of CD14⁺/CD16⁺ monocyte subpopulation. **Experimental hematology**, v. 32, n. 8, p. 748-755, 2004.

TARDÁGUILA, Manuel; MAÑES, Santos. CX3CL1 at the crossroad of EGF signals: Relevance for the progression of ERBB2+ breast carcinoma. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 9, p. e25669, 2013.

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

TURPEENNIEMI-HUJANEN T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers, **Biochimie**, v. 87, p. 287–297, 2005.

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

VAN RAVENSWAAY, Claasen HH; KLUIN, Ph M.; FLEUREN, G. J. Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 67, n. 2, p. 166-174, 1992.

WAHL, Larry M.; KLEINMAN, Hynda K. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 21, p. 1583-1584, 1998.

WHITTAKER, Charles A. et al. The echinoderm adhesome. **Developmental biology**, v. 300, n. 1, p. 252-266, 2006.

WYNN, Thomas A.; CHAWLA, Ajay; POLLARD, Jeffrey W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445-455, 2013.

WHO, World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index2.html> Acesso em: 29 de novembro de 2015.

XIE, Bei; LAOUAR, Amale; HUBERMAN, Eliezer. Fibronectin-mediated Cell Adhesion Is Required for Induction of 92-kDa Type IV Collagenase/Gelatinase (MMP-9) Gene Expression during Macrophage Differentiation THE SIGNALING ROLE OF PROTEIN KINASE C- β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 19, p. 11576-11582, 1998.

YANG, Jiyeon et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker research**, v. 2, n. 1, p. 1, 2014.

YU, Ping et al. The role of stroma in immune recognition and destruction of well-established solid tumors. **Current opinion in immunology**, v. 18, n. 2, p. 226-231, 2006.

ZHANG, Jing; LIU, Jinsong. Tumor stroma as targets for cancer therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 137, n. 2, p. 200-215, 2013.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. et al. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. **European journal of immunology**, v. 23, n. 9, p. 2053-2058, 1993.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. L. et al. Small (CD14+/CD16+) monocytes and regular monocytes in human blood. **Pathobiology**, v. 59, n. 3, p. 127-130, 1991.