



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

Daniel Arthur Guimarães Bastos

**Efeito de vesículas extracelulares liberadas por células de melanoma MV3
na polarização de macrófagos humanos**

Rio de Janeiro

2021

Daniel Arthur Guimarães Bastos

Efeito de vesículas extracelulares liberadas por células de melanoma MV3 na polarização de macrófagos humanos

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

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

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

Rio de Janeiro

2021

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

B327 Bastos, Daniel Arthur Guimarães.
Efeito de vesículas extracelulares liberadas por células de melanoma MV3 na polarização de macrófagos humanos / Daniel Arthur Guimarães Bastos. - 2021.
77 f.

Orientador: Prof. Dr. João Alfredo de Moraes Gomes Silva
Coorientador: Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

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

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

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Daniel Arthur Guimarães Bastos

**Efeito de vesículas extracelulares liberadas por células de melanoma MV3 na
polarização de macrófagos humanos**

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

Aprovada em 31 de março de 2021.

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

Universidade Federal do Rio de Janeiro

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

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. José Andrés Morgado-Díaz

Instituto Nacional de Câncer

Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Mariana Renovato Martins

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

A todos que me ajudaram.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Arthur e Sandra, que sempre lutaram pela minha felicidade e pela de minha irmã, nunca deixando de nos apoiar e de amar não importando o obstáculo pela frente.

À minha irmã Clarisse, que sempre me mostrou por outros pontos de vista como encarar a vida e que, não importando nossas diferenças, nunca deixou de estar ao meu lado.

À professora Thereza Christina pela confiança ao me aceitar como estudante de Iniciação Científica em 2012, e desde então pelas oportunidades, além do conhecimento compartilhado que contribuiu muito à minha formação.

Ao professor João Alfredo de Moraes por todos esses anos de orientação e amizade. Obrigado pela confiança, oportunidades, ensinamentos e por sempre estar nos incentivando e mostrando que de alguma forma, as coisas vão melhorar.

À amiga Clara Frony, presente da UERJ, por todos esses anos de amizade e inúmeras vezes que me ajudou quando eu precisei, dentro e fora da vida acadêmica.

Às amigas Carolinne Amorim e Fátima dos Anjos, presentes da UFRJ, pelas experiências e por me ajudarem com os meus surtos ao longo das etapas finais do doutorado.

Ao apoio técnico dos amigos Gabriele Muniz, Genilson Rodrigues, Helber Valença, Ingrid Waclawiak e Vanderlei Fraga, crucial para o andamento dos experimentos.

Ao pessoal do LFCM e Labio-Redox pelas experiências e ensinamentos divididos. Apreendi um pouquinho com cada um durante esses anos todos.

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

RESUMO

BASTOS, Daniel Arthur Guimarães. *Efeito de vesículas extracelulares liberadas por células de melanoma MV3 na polarização de macrófagos humanos*. 2021. 77 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Para o entendimento dos mecanismos envolvidos no crescimento tumoral é necessária a compreensão detalhada do seu microambiente, formado por diferentes componentes de matriz extracelular, fatores de crescimento, citocinas e diversos tipos celulares. Células do sistema imune presentes no microambiente podem apresentar suas funções modificadas de forma a auxiliar o crescimento tumoral. Nessa direção, a polarização de macrófagos nos fenótipos M1 e M2, bem como suas implicações no microambiente tumoral vem sendo amplamente descrita. Evidências também apontam que este microambiente é rico em vesículas extracelulares (VE), produzidas abundantemente pelas células tumorais. As VE não apenas transportam informações moleculares de suas células de origem, mas também são capazes de modular a atividade de células alvo. Já foi demonstrado que VE provenientes de células tumorais são capazes de interagir com diferentes tipos celulares no microambiente e recentemente mostramos que VE derivadas da linhagem tumoral de melanoma humano MV3 são capazes de polarizar neutrófilos para um fenótipo pró-tumoral *in vitro*. No entanto, seus efeitos sobre macrófagos humanos ainda não foram elucidados. O objetivo deste estudo foi investigar se VE produzidas por uma linhagem de melanoma humano modulariam a atividade de macrófagos, alterando seu fenótipo em direção a um fenótipo semelhante ao M2 (tipo-M2). As VE foram obtidas isoladas a partir do meio secretado (meio condicionado) por células da linhagem celular MV3, posteriormente sendo quantificadas através de microscopia em tempo real (ZetaView[®]) e marcação para anexina-V por citometria de fluxo. Neste estudo vimos que as VE induziram a quimiotaxia de monócitos de maneira concentração-dependente, a qual é dependente da fosfatidilserina presente na membrana das VE, uma vez que a utilização de anexina-V bloqueadora reverteu este efeito. As VE também foram capazes de aumentar a expressão de CD206, marcador M2, na membrana dos macrófagos, bem como a liberação de IL-10 e TGF- β por estas células. Além disso, os macrófagos estimulados com VE apresentaram maior produção de ROS, porém seus níveis de NO não sofreram alterações. Corroborando o dado anterior, os macrófagos estimulados com VE apresentaram maior atividade de arginase e não demonstraram citotoxicidade contra células MV3 em cocultura. Além disso, após a inoculação intravenosa de VE em camundongos nude, observamos sua biodistribuição para diversos órgãos, como fígado, intestino, rins e pulmões, o que poderia contribuir para a metástase do tumor primário para o pulmão. Nossos dados revelam um possível mecanismo através do qual as VE modulam a atividade de TAM, sugerindo-as como possível alvo terapêutico visando a reversão da polarização de macrófagos e consequente inibição tumoral.

Palavras-chave: Macrófagos. Macrófagos-associados ao tumor. Câncer. Vesículas extracelulares. Melanoma.

ABSTRACT

BASTOS, Daniel Arthur Guimarães. *Melanoma MV3 cells-derived extracellular vesicles effect on the polarization of human macrophages*. 2021. 77 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

To acknowledge the mechanisms involved on tumor growth, it is necessary to understand its microenvironment, composed by several extracellular matrix components, like growth factors, cytokines and different cell types. Immune cells present in the microenvironment may have their functions modified in order to support tumor growth. The macrophage polarization into M1 and M2 phenotypes, as well as their implications in the microenvironment have been extensively described. Evidences also show that in the tumor microenvironment there is a huge presence of extracellular vesicles (EV), produced abundantly by the tumor cells. EV not only transport molecular information from their origin cells, but are also capable of modulating the activity of target cells. It has already been shown that tumor-derived EV are able to interact with different cell types present in the microenvironment and recently our group has shown that human melanoma-derived MV3 EV were able to skew neutrophils into a pro-tumoral phenotype in vitro. However, their effects on human macrophages have not been elucidated yet. The aim of this study was to investigate if MV3-EV would modulate macrophages activity, shifting these cells towards a M2-like phenotype. EV were released from human melanoma MV3 cells and quantified through real-time microscopy ZetaView™ and flow cytometry. We have observed that EV induced monocytes chemotaxis in a concentration-dependent manner, and that such effect was dependent on the phosphatidylserine exposed on their membranes, since the blockage of phosphatidylserine with annexin V reverted this effect. EV were also capable of inducing the expression of CD206, a M2 marker, on the membrane of macrophages, as well as increased the secretion of IL-10 and TGF- β and the mRNA expression of CCR5 and CCL3. Moreover, EV-stimulated macrophages exhibited increased ROS production, although their NO levels remained at basal levels. Corroborating this, EV-stimulated macrophages presented increased arginase activity, and did not demonstrate cytotoxicity properties against melanoma cells in coculture. Furthermore, EV were biodistributed to several organs, such as liver, intestine, kidneys and lungs, what could contribute to primary tumor metastasis to secondary sites such as the lungs in nude mice. Our data reveal a possible mechanism in which EV may modulate TAM activity, suggesting them as a potential therapeutic target, aiming the reversal of macrophages polarization and tumor inhibition.

Keywords: Macrophages. Tumor-associated macrophages. Cancer. Extracellular vesicles. Melanome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Etapas do processo de carcinogênese.....	14
Figura 2 –	<i>Hallmarks</i> envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral.....	15
Figura 3 –	Fases de crescimento do melanoma.....	17
Figura 4 –	Componentes da inflamação.....	19
Figura 5 –	Polarização de macrófagos ao longo do processo de cicatrização.....	23
Figura 6 –	Polarização de monócitos em TAM.....	27
Figura 7 –	Origens das principais classes de vesículas extracelulares.....	30
Figura 8 –	Obtenção de meio condicionado (MC) e VE de células de melanoma MV3	34
Figura 9 –	Isolamento de monócitos através de gradiente contínuo de Ficoll.....	36
Figura 10 –	Representação esquemática de uma Câmara de Boyden modificada.....	37
Figura 11 –	Dimensões das VE liberadas por células MV3.....	44
Figura 12 –	Quantificação de MP liberadas por células de melanócito NGM e melanoma MV3.....	45
Figura 13 –	Western blotting das VE.....	46
Figura 14 –	Efeito das VE sobre a quimiotaxia de monócitos.....	47
Figura 15 –	Efeito das VE sobre a expressão de CD206 em macrófagos.....	48
Figura 16 –	Efeito das VE sobre a secreção de marcadores M2 por macrófagos.....	49
Figura 17 –	Efeito das VE sobre a expressão gênica de marcadores moleculares envolvidos em respostas quimiotáticas, inflamatórias e antioxidantes em macrófagos.....	52
Figura 18 –	Efeito das VE sobre a ativação da via NF- κ B em macrófagos.....	53
Figura 19 –	Efeitos das VE sobre a produção de ROS por macrófagos.....	54
Figura 20 –	Efeito das VE sobre a produção de NO por macrófagos.....	55
Figura 21 –	Efeito das VE sobre a atividade de arginase em macrófagos.....	56
Figura 22 –	Efeito das VE sobre a capacidade citotóxica de macrófagos.....	57
Figura 23 –	Biodistribuição das VE liberadas na circulação de camundongos nude.....	58
Figura 24 –	Efeito das VE sobre a metástase do tumor primário e a polarização de macrófagos <i>in vivo</i>	60
Figura 25 –	Esquema representativo de conclusão do estudo.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Aloficocianina
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CCL3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>
CCL7	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 7</i>
CCR2	Receptor de quimiocina CC tipo 2
CCR3	Receptor de quimiocina CC tipo 3
CCR5	Receptor de quimiocina CC tipo 5
CD11b	<i>Cluster of differentiation 11B</i>
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CD16	<i>Cluster of differentiation 16</i>
CD163	<i>Cluster of differentiation 163</i>
CD206	<i>Cluster of differentiation 206</i>
CD301	<i>Cluster of differentiation 301</i>
CX3CR1	Receptor de quimiocina CX3C tipo 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Exo	Exossomos
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HIF-1a	<i>Hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>
HO-1	Heme oxigenase 1
IFN-g	Interferon gama
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2	Imunoglobulina G2
IL-1b	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10

IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-23	Interleucina 23
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LPS	Lipopolissacarídeo
LY6C	<i>Lymphocyte antigen 6 complex</i>
MC	Meio condicionado
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MMP-9	Metaloproteinase 9
MP	Micropartículas
mRNA	RNA mensageiro
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
NOS2	<i>Nitric oxide synthase 2</i>
NRF2	<i>Nuclear erythroid 2-related factor 2</i>
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
OXSRI	<i>Oxidative stress responsive kinase 1</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	Ficoeritrina
PE-Cy7	Ficoeritrina-cianina 7
PS	Fosfatidilserina
PSGL1	<i>P-selectin ligand 1</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
STAT3	<i>Signal transducers and activators of transcription 3</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TH1	<i>T helper 1</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Treg	Linfócitos T regulatórios
UV	Ultravioleta
VE	Vesículas extracelulares
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa
Δ	Delta
μm	Micrômetro
nm	Nanômetro
μg	Micrograma
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ng/mL	Nanograma por mililitro
mg/mL	Miligrama por mililitro
Ca^{+2}	Íon cálcio
CO_2	Molécula de gás carbônico
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
$^{\circ}\text{C}$	Grau celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Objetivo Geral.....	32
1.2	Objetivos Específicos.....	32
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1	Linhagens celulares utilizadas.....	33
2.2	Obtenção de meio condicionado (MC) e VE de células de melanoma MV3.....	33
2.3	Quantificação de VE.....	34
2.4	<i>Western Blotting</i> de VE.....	35
2.5	Isolamento de monócitos e diferenciação em macrófagos.....	35
2.6	Modelo experimental de tratamento <i>in vitro</i> de macrófagos.....	36
2.7	Ensaio de quimiotaxia em Câmara de Boyden.....	37
2.8	Investigação da expressão dos marcadores moleculares CD86 e CD206 por citometria de fluxo.....	38
2.9	ELISA.....	38
2.10	Microarranjo de DNA.....	38
2.11	Ensaio de atividade de luciferase.....	39
2.12	Ensaio de produção de ROS e NO.....	40
2.13	Ensaio de atividade de arginase.....	40
2.14	Ensaio de viabilidade celular.....	41
2.15	Biodistribuição de VE.....	41
2.16	Polarização de macrófagos <i>in vivo</i>.....	42
2.17	Análises estatísticas.....	43
3	RESULTADOS.....	44
3.1	Análise das dimensões das vesículas extracelulares liberadas por células de melanoma humano MV3.....	44
3.2	As células de melanoma humano MV3 liberam grande quantidade de micropartículas.....	45
3.3	Deteção do marcador exossomal sintenina-1 nas VE.....	46
3.4	Efeito das VE sobre a quimiotaxia de monócitos.....	47
3.5	Efeito das VE sobre a expressão de CD206 em macrófagos.....	48

3.6	Efeito das VE sobre a secreção de marcadores M2 por macrófagos.....	49
3.7	Efeito das VE sobre a expressão gênica de marcadores moleculares envolvidos em respostas quimiotáticas, inflamatórias e antioxidantes de macrófagos.....	51
3.8	Efeito das VE sobre a ativação da via NF-κB em macrófagos.....	53
3.9	Efeito das VE sobre a produção de ROS por macrófagos.....	54
3.10	Efeito das VE sobre a produção de NO por macrófagos.....	55
3.11	Efeito das VE sobre a atividade de arginase em macrófagos.....	56
3.12	Efeito das VE sobre a capacidade citotóxica de macrófagos.....	57
3.13	Biodistribuição das VE liberadas na circulação de camundongos nude.....	58
3.14	Efeito das VE sobre a metástase do tumor primário e a polarização de macrófagos <i>in vivo</i>	60
4	DISCUSSÃO	62
	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70

INTRODUÇÃO

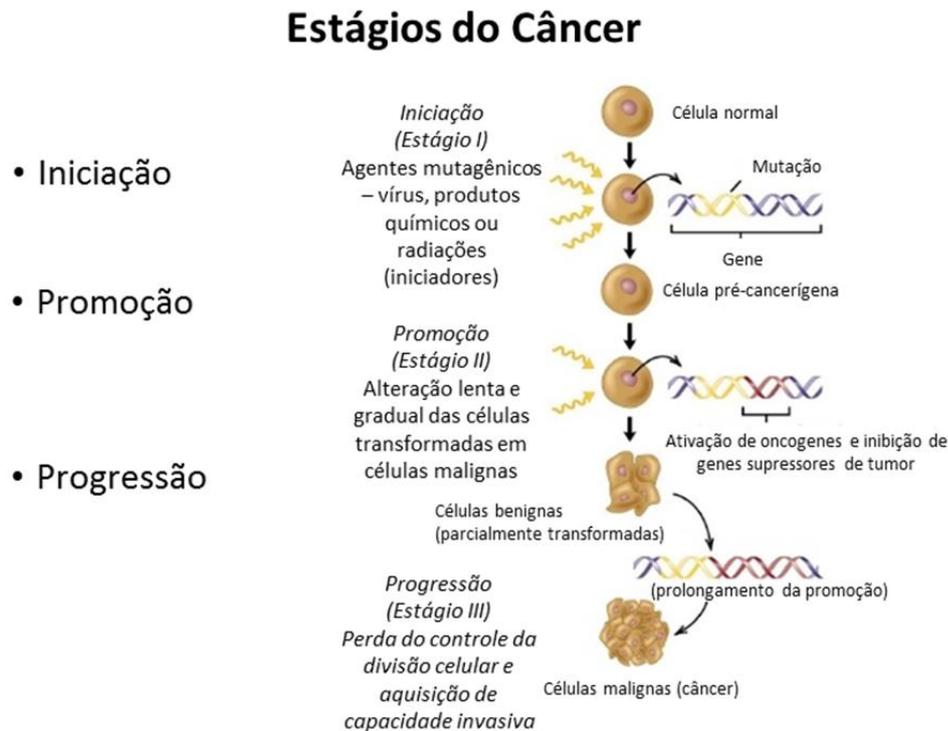
Câncer

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

O processo de geração do câncer, ou carcinogênese, ocorre lentamente e sabe-se que a geração de um tumor maligno a partir de uma célula cancerosa pode levar anos (CIVETTA; CIVETTA, 2011). Esse processo pode ser dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, as células sofrem danos diretos em seu DNA pela ação de agentes químicos, físicos, virais ou ainda mutações geradas espontaneamente, levando à ativação de oncogenes e/ou supressão de genes supressores de tumor (KARIN; GRETEN, 2005). Na promoção, as células geneticamente alteradas são transformadas de forma lenta e gradual em células malignas. Na última etapa, a progressão, ocorre a multiplicação descontrolada e irreversível das células malignas (Fig. 1) (CIVETTA; CIVETTA, 2011).

A elevada proliferação celular leva à formação de uma massa anormal de tecido, a massa tumoral, que excede os limites anatômicos do tecido normal. Essa massa tumoral pode ser benigna, caso permaneça em seu local de origem, ou pode se tornar maligna, caso invada tecidos adjacentes ou realize metástase para sítios distantes. Conforme as células progressivamente evoluem a um estado neoplásico, podem adquirir uma série de alterações em sua fisiologia conduzindo a um fenótipo maligno (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1 – Etapas do processo de carcinogênese



Legenda: As células normais podem acumular mutações em seu genoma pela ação de agentes externos ou mutações espontâneas. Essas alterações podem lenta e gradualmente transformá-la em uma célula maligna, perdendo o controle da divisão celular e adquirindo capacidade invasiva local ou metástase para focos secundários distantes.

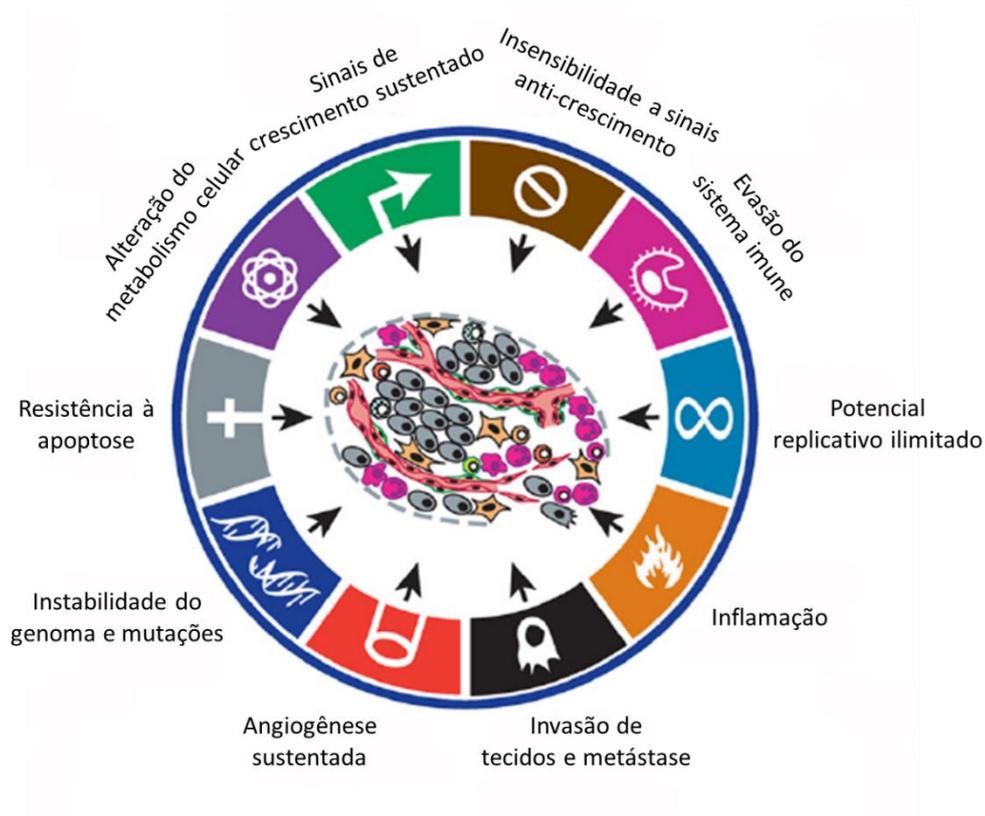
Fonte: O autor, 2021.

Inicialmente, Hanahan e Weinberg (2000) descreveram algumas “assinaturas” (*hallmarks*) relacionadas ao desenvolvimento e progressão tumoral, como auto-suficiência de sinais de crescimento celular, insensibilidade a sinais anti-crescimento, evasão da apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase. Recentemente, outras “assinaturas” foram acrescentadas à lista, incluindo alterações no metabolismo celular, escape das células tumorais do sistema imune, instabilidade genômica e mutação, e a inflamação (Fig. 2). A aquisição destes múltiplos *hallmarks* depende em grande parte de sucessivas alterações no genoma das células neoplásicas (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As causas do câncer estão relacionadas a fatores de risco que podem ser fatores intrínsecos, como mutações herdadas e condições imunes e também fatores ambientais ou externos, como tabagismo, alcoolismo, alimentos e exposição à radiação. Esses fatores podem agir conjunta ou sequencialmente para iniciar o processo de carcinogênese. Dentre todos os

casos de câncer, 80% a 90% em média estão associados a fatores ambientais (JEMAL et al., 2007).

Figura 2 – *Hallmarks* envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral



Legenda: As células normais podem evoluir progressivamente para um estado neoplásico, no qual podem adquirir diversas características que contribuem ao desenvolvimento e progressão tumoral.

Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

Melanoma

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

A incidência do melanoma tem aumentado em populações brancas, normalmente, na quarta década de vida, sendo responsável por quase 60% das neoplasias fatais de pele. Sua epidemiologia é igual entre os sexos, sendo incomum em crianças (BANDARCHI et al., 2010). Apesar do câncer de pele do tipo não melanoma ser o mais comum, a mortalidade do melanoma pode atingir níveis até três vezes maiores (ILKOVITCH; LOPEZ, 2008). O INCA (Instituto

Nacional de Câncer) estimou cerca de 8450 (4200 em homens e 4250 em mulheres) novos casos no Brasil para o ano de 2020, sendo mais da metade (4830) na região Sudeste (INCA, 2021). Tal fato vem atraindo a atenção das autoridades de saúde pública para o desenvolvimento de campanhas de prevenção e diagnóstico precoce do câncer.

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

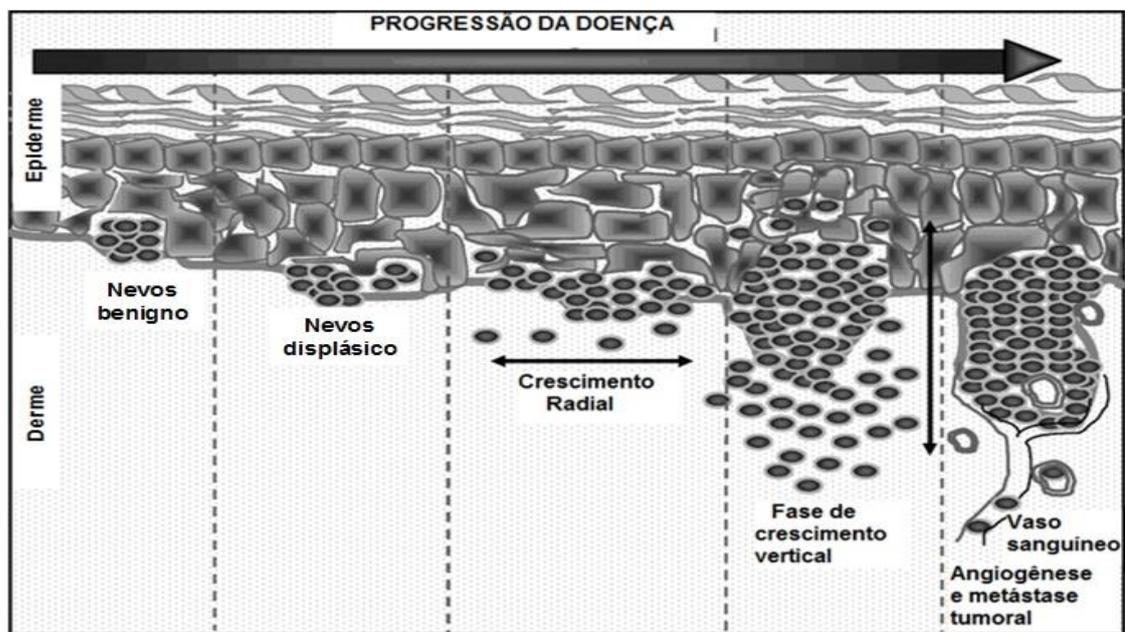
As mutações não corrigidas por sistemas de reparo fazem com que os melanócitos normais comecem a proliferar desordenadamente, formando o nevo benigno. A rápida proliferação dos melanócitos transformados forma o nevo displásico, assimétrico, com bordas irregulares, seguido por uma rápida fase de crescimento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

A última fase do crescimento do melanoma é a fase vertical, também chamada de fase de invasão da derme. Nesta fase, as células conseguem se desenvolver independentemente dos queratinócitos, apresentando propriedades metastáticas em pacientes e em modelos experimentais em animais (MAHABELESWAR; BYZOVA, 2007), e expressam moléculas importantes possibilitando a invasão e a metástase, sendo capazes de se disseminar para a derme e o tecido subcutâneo (HSU; MEIER; HERLYN, 2002). A capacidade invasiva das células

transformadas se dá pela perda de contato entre o melanócito transformado e o queratinócito (SARRAY et al., 2009). Nesta última fase, as células apresentam alto potencial metastático (BANDARCHI et al., 2010), alcançando a circulação sanguínea (Fig. 3) e disseminando-se para órgãos como o pulmão, fígado e cérebro (MAHABELESWAR; BYZOVA, 2007).

Vale ressaltar que apesar de ser um tumor imunogênico, o melanoma pode desenvolver mecanismos de evasão do sistema imune, como sub-regulação de antígenos de superfície ou indução de tolerância imunológica, aumentando suas chances de sucesso de crescimento e metástase (KUBICA; BREWER, 2012).

Figura 3 – Fases de crescimento do melanoma



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

Fonte: Adaptado de MAHABELESWAR; BYZOVA, 2007.

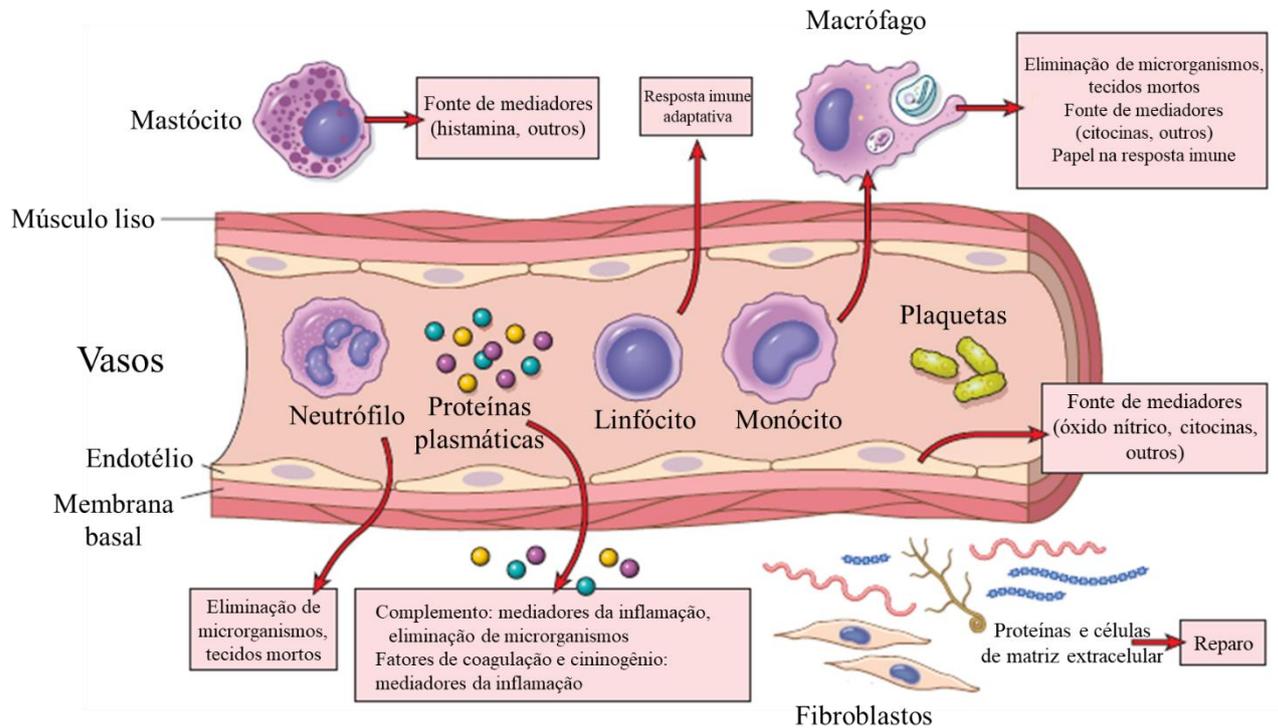
Inflamação

A inflamação é um mecanismo protetor do organismo saudável, a qual envolve leucócitos, células endoteliais, proteínas e mediadores inflamatórios, visando a eliminação do agente causador da lesão celular, seguida do processo de reparo tecidual (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2010). A inflamação possui sinais cardinais bem descritos: o rubor da área inflamada, decorrente da vasodilatação; edema, resultante do acúmulo local de líquido e células; a percepção do calor, devido ao rápido aumento do aporte sanguíneo com temperatura mais elevada na região devido ao processo pirogênico; a dor, originada por mecanismos mais complexos, como estímulo de fibras nervosas locais, devido ao acúmulo de líquidos e de células, além da lesão tecidual direta pelo agente causador (CHANDRASOMA; TAYLOR, 1998). Estes sinais foram descritos há mais de 2000 anos, e no século XIX, o patologista Rudolf Virchow adicionou o quinto sinal a esta lista: a perda de função tecidual (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2010).

Em resposta ao dano tecidual, que pode ser causado por uma infecção, uma rede multifatorial de sinalização celular inicia e mantém uma resposta do hospedeiro de modo a reparar o tecido afetado, envolvendo a produção de citocinas, interleucinas e quimiocinas. Este processo envolve a ativação e migração direcionada de neutrófilos polimorfonucleares da corrente sanguínea para o foco infeccioso. Monócitos, que se diferenciam em macrófagos nos tecidos, são as próximas células a se dirigirem aos locais de injúria. Uma vez ativados, os macrófagos podem atuar como fontes principais de citocinas e fatores de crescimento, o que pode afetar a atividade de vários tipos celulares no microambiente como células endoteliais, epiteliais e mesenquimais (COUSSENS; WERB, 2002).

A inflamação aguda inicia-se rapidamente, durando poucos minutos ou dias, caracterizada pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, resultando em extravasamento de líquido rico em proteínas e acúmulo de leucócitos nos tecidos extravasculares. Estas células fagocitam os agentes infecciosos e, caso não contenham a infecção ou a resposta inflamatória seja exacerbada, a imunidade adaptativa é ativada, através da produção de citocinas e quimiocinas adicionais (CHEN; NUÑEZ, 2010). Quando o organismo falha em eliminar o agente lesivo, não ocorre ativação de mecanismos antiinflamatórios para contrabalancear a inflamação aguda e esta pode progredir para um estado crônico, cuja duração pode variar de dias a anos (Fig. 4) (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2010).

Figura 4 – Componentes da inflamação



Legenda: Componentes da inflamação aguda e crônica e suas respectivas funções.
 Fonte: Adaptado de KUMAR et al., 2014.

Monócitos

Os monócitos da corrente sanguínea são células originárias a partir de precursores da medula óssea e são subdivididos em classes com base no tamanho, destino, expressão de receptores de quimiocinas, moléculas de superfície e na sua habilidade em se diferenciarem pela ação de citocinas e/ou moléculas provenientes de microorganismos (AUFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009). Sua grande heterogeneidade e plasticidade não são encontradas em nenhum outro tipo celular, sendo características destas células (SICA et al., 2015).

Monócitos murinos são subclassificados de acordo com os níveis de expressão de LY6C e CD11b. Monócitos com alta expressão de LY6C e baixa de CD11b correspondem a um subtipo de monócitos que expressam altos níveis de CCR2, e baixos níveis de CX3CR1 (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003). Estas células são comumente chamadas de

monócitos clássicos ou LY6C^{hi} e são rapidamente recrutadas para sítios de infecção e inflamação (SHI; PAMER, 2010).

Em contrapartida, o outro fenótipo de monócitos circulantes em camundongos expressa altos níveis de CX3CR1 e baixos níveis de CCR2 e de LY6C (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003). Na corrente sanguínea, estes monócitos LY6C^{low} (também comumente chamados de CX3CR1^{hi}) são menos prevalentes que os monócitos LY6C^{hi} e estudos envolvendo microscopia intravital demonstraram que estas células são capazes de se aderir e migrar ao longo da superfície endotelial de vasos sanguíneos – processo referido como patrulhamento – para a manutenção da homeostase tecidual (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009; SHI; PAMER, 2010).

No caso de monócitos humanos, estas células são classificadas de acordo com a expressão dos marcadores de superfície CD14 e CD16. Monócitos CD14⁺⁺CD16⁻, são chamados de monócitos clássicos, sendo a subclasse mais prevalente no sangue humano, e de forma similar às suas contrapartes murinas, expressam CCR2. A população de monócitos CD16⁺ é posteriormente subdividida em CD14⁺⁺CD16⁺ e CD14⁺CD16⁺⁺, também chamados de monócitos intermediários e não-clássicos, respectivamente (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). Os monócitos não clássicos, em termos de patrulhamento *in vivo*, são similares à população murina LY6C^{low} (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009; CROS et al. 2010).

Os monócitos podem ser recrutados para os tecidos mediante uma série de estímulos. Por exemplo, estudos com modelos murinos de infecção mostram que citocinas como CCL2 (também conhecida como MCP1) e CCL7 (também conhecida como MCP3) possuem prioritariamente ação quimiotática sobre monócitos LY6C^{hi} (TSOU et al., 2007; JIA et al., 2008), enquanto que CX3CL1, também conhecida como fractalquina, pode desempenhar ação sobre monócitos LY6C^{low} (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009).

O recrutamento de monócitos aos locais de inflamação segue os mesmos passos gerais de adesão, rolamento e transmigração já conhecidos na migração de neutrófilos (SHI; PAMER, 2010). Estudos envolvendo ablação genética em camundongos evidenciam a importância da L-selectina na adesão do monócito e seu recrutamento aos tecidos (TEDDER; STEEBER; PIZCUETA, 1995). Outros estudos mostram, através do uso de anticorpos neutralizantes, que a migração de monócitos envolve o *crossstalk* entre a molécula PSGL1 expressa pelo monócito e P- e E-selectina expressas pelo endotélio, mediando seu rolamento (LEON; ALDARVIN, 2008).

Além de desempenhar atividade antimicrobiana ao serem recrutados aos tecidos, os monócitos também podem ser recrutados para focos de inflamação estéril, como no caso da aterosclerose, no qual os monócitos migram para as camadas íntima e subíntima dos vasos sanguíneos (SHI; PAMER, 2010). Além disso, também podem dar origem aos macrófagos tumorais (COUSSENS; WERB, 2002).

Macrófagos

Sinais presentes no microambiente, como patógenos intracelulares, tecidos danificados ou células efectoras da imunidade adaptativa podem ativar vias distintas de diferenciação de macrófagos, induzindo estados de polarização funcional diferentes. O paradigma atual descreve dois estados de ativação distintos: M1 ou macrófagos classicamente ativados e M2 ou macrófagos alternativamente ativados. Vale ressaltar que estes fenótipos funcionais representam dois extremos de um espectro amplo de estados de ativação (SICA et al., 2015).

Estímulos microbianos, como o LPS, isoladamente ou em conjunto com citocinas do tipo TH1, como IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF, induzem a ativação clássica de macrófagos, em direção ao fenótipo M1. Estas células atuam ativamente na resposta do hospedeiro contra bactérias intracelulares e produzem citocinas com perfil pró-inflamatório como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-23 e outras moléculas efectoras da resposta inflamatória, como ROS (do inglês *reactive oxygen species*) (SICA et al., 2015).

Por outro lado, citocinas de resposta TH2, como IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β (do inglês *transforming growth factor beta*) podem induzir a ativação alternativa M2 de macrófagos (IL-12^{low}/IL-1 β ^{low}/IL-10^{high}), que são células com baixo potencial de apresentação de antígenos e supressoras de resposta TH1 (GORDON, 2003; MURRAY, 2014).

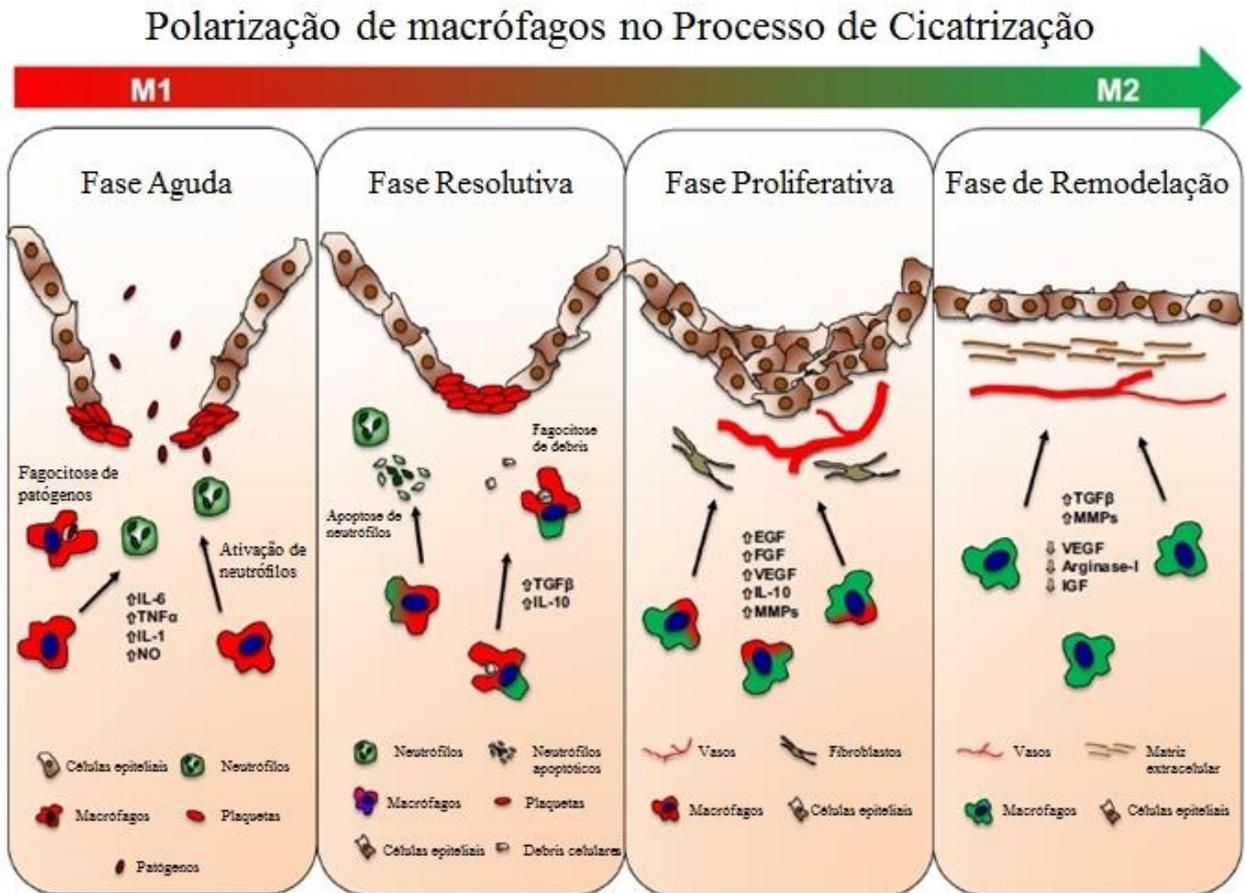
Os macrófagos podem exercer funções duais dependendo dos seus estados de ativação: podem tanto proteger a integridade do tecido, exercendo também papel na cicatrização, quanto provocar lesões, devido a sua produção de citocinas inflamatórias e enzimas proteolíticas (SICA et al., 2015). Enquanto a persistência de macrófagos M1 e seus produtos reativos podem induzir dano tecidual (em condições de inflamação crônica, por exemplo), a presença de macrófagos polarizados para o tipo M2 está associada ao abrandamento da inflamação, eliminação de debris celulares, angiogênese e reparo tecidual (SICA; MANTOVANI; 2012, NOVAK; KOH, 2013).

Estudos mostram que em muitos tecidos, os macrófagos participam ativamente de todas as fases do processo inflamatório: fase aguda, fase resolutive, proliferação e remodelação tecidual (NOVAK; KOH, 2013; SICA et al., 2015). No decorrer das diferentes fases do processo de reparo, os macrófagos transitam por mudanças dinâmicas: macrófagos M1 são essenciais para incitar a resposta inflamatória após a lesão tecidual, enquanto que a mudança para um fenótipo antiinflamatório M2 é fundamental para a resolução da inflamação e a regeneração de tecidos lesionados (SICA; MANTOVANI; 2012, NOVAK; KOH, 2013; SICA et al., 2015).

O principal papel dos macrófagos na fase aguda da inflamação é produzir mediadores inflamatórios, estimulando também a resposta imune inata (como ativação de neutrófilos) e defender o hospedeiro da colonização pelo patógeno (SICA et al., 2015). Durante a fase resolutive, os macrófagos começam a mudar progressivamente o seu perfil para um fenótipo mais antiinflamatório, diminuindo assim a produção de mediadores inflamatórios e aumentando a liberação de citocinas antiinflamatórias como TGF- β e IL-10, fagocitando neutrófilos apoptóticos e células teciduais lesionadas (SICA et al., 2015). Durante a fase de proliferação, os macrófagos produzem uma série de mediadores e fatores de crescimento como EGF, FGF e VEGF, induzindo assim a proliferação de diversos tipos celulares envolvidos no processo de cicatrização, como células epiteliais e endoteliais, e fibroblastos (SICA et al., 2015). Finalmente, na fase de remodelação tecidual, os macrófagos aumentam a expressão de marcadores como CD206 e CD163, mantêm a produção de TGF- β e proteases de matriz, enquanto diminuem a expressão de fatores como VEGF e arginase, fornecendo suporte na reorganização da matriz extracelular, vasculatura e formação do tecido cicatricial (SICA et al., 2015) (Fig. 5).

No entanto, estas células são importantes não apenas na defesa do organismo contra patógenos e na iniciação de respostas imunes adaptativas, mas também podem contribuir à proliferação e disseminação tumoral (SICA et al., 2015).

Figura 5 – Polarização de macrófagos no decorrer do processo de cicatrização



Legenda: Os macrófagos durante as fases do processo inflamatório gradualmente partem de um fenótipo M1, pró-inflamatório, para um fenótipo M2 com funções pró-resolutivas, fornecendo aporte à regeneração e cicatrização de tecido.

Fonte: Adaptado de SICA et al., 2015.

Inflamação e Câncer

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

A ligação entre a inflamação e o câncer consiste em duas vias: uma extrínseca, dirigida por condições inflamatórias que aumentam o risco de câncer (tais como pancreatite devido ao alcoolismo ou colite ulcerativa devido à infecções bacterianas); e uma intrínseca, dirigida por alterações genéticas que causam inflamação e neoplasia (tais como ativação de oncogenes e repressão de genes supressores de tumor). Estas vias convergem, resultando na ativação de

fatores de transcrição (como STAT3 e HIF-1 α), coordenando a expressão de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e prostaglandinas e recrutando leucócitos para o foco tumoral. As citocinas, por sua vez, podem ativar os mesmos fatores nas células inflamatórias, resultando na produção adicional de mediadores de modo a manter um microambiente inflamatório (MANTOVANI, 2008).

Microambiente Tumoral

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

O microambiente tumoral é indispensável no processo de tumorigênese, promovendo a sobrevivência, proliferação e migração das células tumorais (COUSSENS; WERB, 2002). As células inflamatórias são consideradas primordiais na promoção da progressão tumoral, devido à sua capacidade de liberar grande variedade de citocinas, quimiocinas, mediadores genotóxicos (como ROS) e enzimas remodeladoras de matriz extracelular (como MMP-9), promovendo assim a proliferação e invasão celular, induzindo a mutagênese e estimulando a angiogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Devido a estas características, os mediadores inflamatórios podem levar à transformação e à iniciação de um fenótipo maligno e a partir de uma expressão sustentada promover a progressão do tumor (COUSSENS; WERB, 2002).

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

A inibição do crescimento tumoral pelo sistema imune é parte do processo denominado vigilância imune, no qual os leucócitos circulantes ou teciduais eliminam células tumorais. Por outro lado, os leucócitos podem secretar fatores que estimulam a angiogênese, remodelam a

matriz extracelular e promovem crescimento celular, facilitando assim o crescimento e disseminação do tumor. O balanço entre essas ações opostas é coordenado por múltiplos fatores secretados pelas células tumorais, estroma tumoral e as próprias células do sistema imune. Os tumores frequentemente produzem fatores imunossupressores, como TGF- β e IL-10, que agem em diversas células do sistema imune. A imunossupressão progressiva é frequentemente observada em tumores em estágio avançado, podendo ser parcialmente mediada por células como neutrófilos, macrófagos e linfócitos T regulatórios (SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014).

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

Macrófagos Associados ao Tumor

Tradicionalmente, as células do sistema imune são consideradas protetoras do organismo, eliminando tanto infecções microbianas quanto células cancerígenas potenciais. Porém, no contexto da progressão tumoral, estas células podem ter suas funções modificadas, sendo “alternativamente ativadas”, de modo a agir contra o organismo, em prol do tumor (SIONOV; FRIDLENDER; GRANOT, 2014).

A observação de que macrófagos podem fazer parte da constituição de tumores não é recente. No final dos anos 70 já havia relatos na literatura de que estas células, denominadas TAM (do inglês *tumor-associated macrophages*), poderiam contribuir para o crescimento de tumores (ALLAVENA et al., 2008).

De forma similar ao que ocorre na heterogeneidade das populações de macrófagos em tecidos e órgãos desprovidos de neoplasias, os TAM também podem apresentar

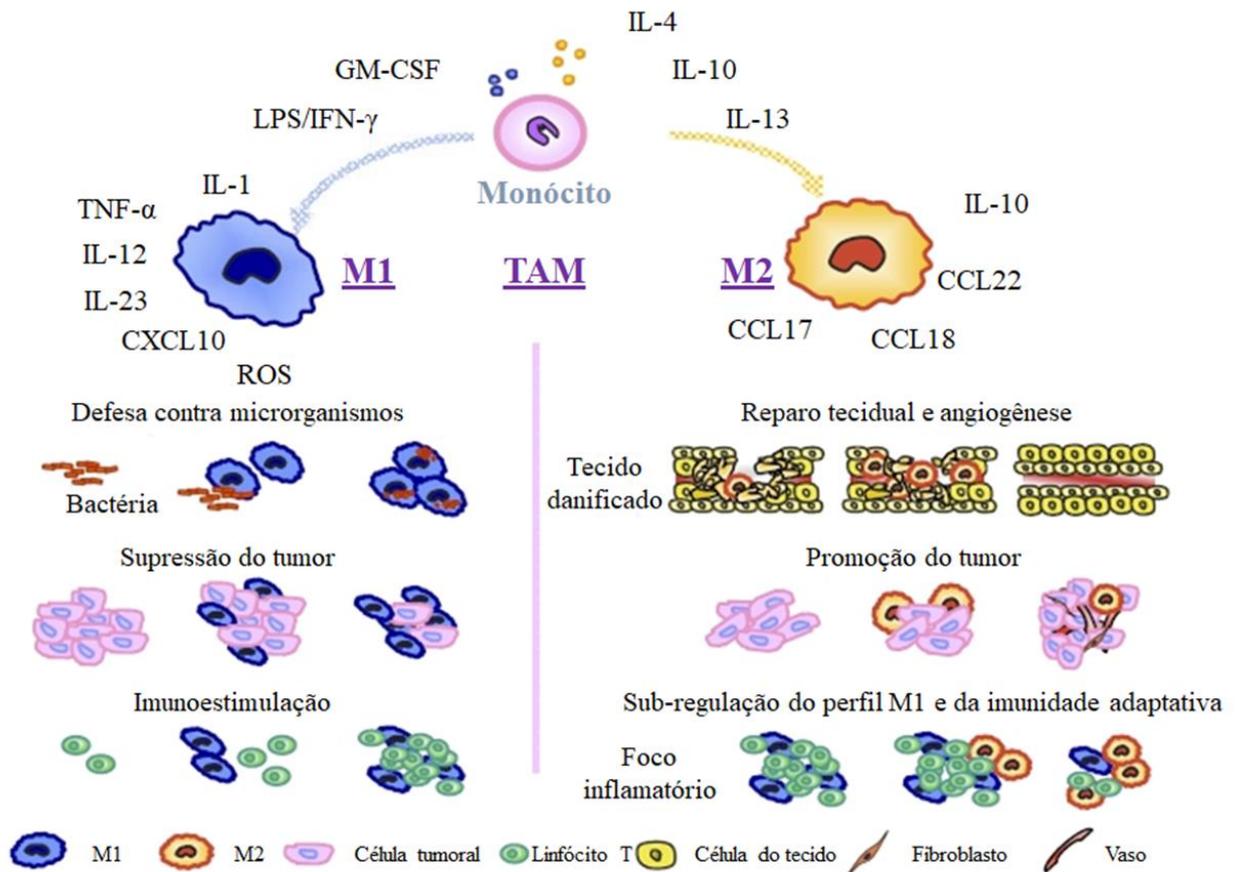
heterogeneidade fenotípicas e funcionais, dependendo do tipo de câncer, estágio e até mesmo localização no tumor (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013).

Durante as fases iniciais do câncer, os TAM geralmente apresentam funções imunoestimulatórias (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). Entretanto, em estágios mais tardios da progressão tumoral o microambiente tumoral se torna rico em fatores de crescimento e mediadores como IL-4, IL-10 e TGF- β , os quais medeiam uma transição na polarização dos macrófagos, que adquirem um fenótipo tipo M2 (MANTOVANI; SICA, 2010). Sendo assim, em tumores estabelecidos os TAM geralmente apresentam um fenótipo semelhante ao M2: são isentos de atividade citotóxica, produzem e secretam fatores de crescimento para o microambiente, além de apresentarem um perfil mais imunossupressor (Fig. 6) (SOLINAS, 2009; BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013; MANTOVANI, 2013; SICA et al., 2015).

No microambiente tumoral, os TAM podem regular a atividade do tecido neoplásico em diferentes aspectos. Estudos com células de câncer humano mostram, por exemplo, que a acumulação de TAM está associada à angiogênese e com a produção de fatores pró-angiogênicos como VEGF e PDGF (ALLAVENA et al., 2008). Além disso, estas células podem promover a invasão e formação de metástases tumorais através da secreção de moléculas como quimiocinas e metaloproteinases (SINGH et al., 2017).

Por sua vez, a depleção de TAM em conjunto com ferramentas anticâncer demonstrou efeito sinérgico na inibição da progressão tumoral, inibindo parâmetros como angiogênese e metástase (ZHANG G. et al., 2010). A inibição farmacológica de certas citocinas como MCP-1 também mostrou resultados semelhantes em um modelo de melanoma xenográfico (GAZZANIGA et al., 2007). Além disso, estudos pré-clínicos demonstraram eficácia na repolarização de TAM para um fenótipo M1, inibindo a progressão tumoral associada a uma redução de macrófagos no tecido tumoral em modelos de carcinoma de mama (COSCIA et al., 2010; ZHANG, X. et al., 2013).

Figura 6 – Polarização de monócitos em TAM



Legenda: Os TAM podem exercer tanto funções anti- quanto pró-tumorais na progressão e desenvolvimento do câncer, fenômeno denominado “polarização”. Quando polarizados para um fenótipo tipo M1 podem inibir o crescimento tumoral através da produção de ROS, por exemplo. Por outro lado, quando polarizados para um fenótipo tipo M2, podem contribuir à progressão tumoral ao induzirem angiogênese e inibição de uma resposta TH1.

Fonte: Adaptado de Solinas et al., 2009.

Estudos clínicos mostram que a presença de TAM em tumores pode estar associada a prognósticos ruins, como em pacientes com câncer de próstata (SHIMURA et al., 2000), linfoma de Hodgkin (STEIDL et al., 2010), carcinoma gástrico (ZHANG, Q.W. et al., 2012) ou câncer de mama (UENO et al., 2000). No entanto, estas observações não são ubíquas, uma vez que sua presença também foi associada a prognósticos favoráveis, como em um estudo envolvendo pacientes com linfoma folicular após tratamento com quimioterapia (TASKINEN et al., 2007) ou uma meta análise de estudos abrangendo pacientes com câncer colorretal (ZHANG, Q.W., 2012), por exemplo.

Diante destas evidências, os TAM presentes no microambiente tumoral são de extrema importância em diversas etapas da carcinogênese, tornando-se importantes alvos para a terapia

contra o câncer. Além disso, desvendar qual ou quais seriam os componentes do microambiente tumoral que poderiam estar atuando de modo a modificar o fenótipo dos TAM, polarizando-os para um fenótipo M2 se faz de extrema importância.

Vesículas Extracelulares

Há mais de meio século atrás, estudos preliminares analisando o efeito de diferentes velocidades de centrifugação do plasma sobre sua própria coagulação, mostraram aumento no seu tempo de coagulação quando submetido a forças de centrifugação maiores, tanto em voluntários sadios quanto em pacientes hemofílicos. Na época, foi atribuída como justificativa a esse fenômeno a explicação de que “o fator coagulante presente no plasma é retirado pelo processo de centrifugação a altas velocidades, estando presente no pellet cuja sedimentação é causada por esta operação” (CHARGAFF; WEST, 1946). Duas décadas depois, foi identificado no plasma humano um material particulado, medindo entre 20 nm e 50 nm, isolado a partir de inúmeras centrifugações diferenciais, recebendo o nome de poeira plaquetária ou “*platelet dust*”, por conter fosfolipídios e apresentar atividade coagulante semelhante à de plaquetas. Suspensões desse material restauravam o tempo de coagulação em plasmas desprovidos de “*platelet dust*”, complementando assim as observações de Chargaff e West (WOLF, 1967). Atualmente, tais estruturas recebem a denominação geral de vesículas extracelulares (VE).

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

As VE são importantes agentes de sinalização celular e transferência de moléculas biologicamente ativas (como receptores, ligantes ou subunidades enzimáticas) de uma célula para outra, podendo modular o metabolismo das células-alvo (COCUCCI; RACCHETTI; MELSOLESI, 2009). Este processo de comunicação celular é único, pois permite à célula de origem transferir diversas moléculas de uma só vez, como moléculas normalmente insolúveis

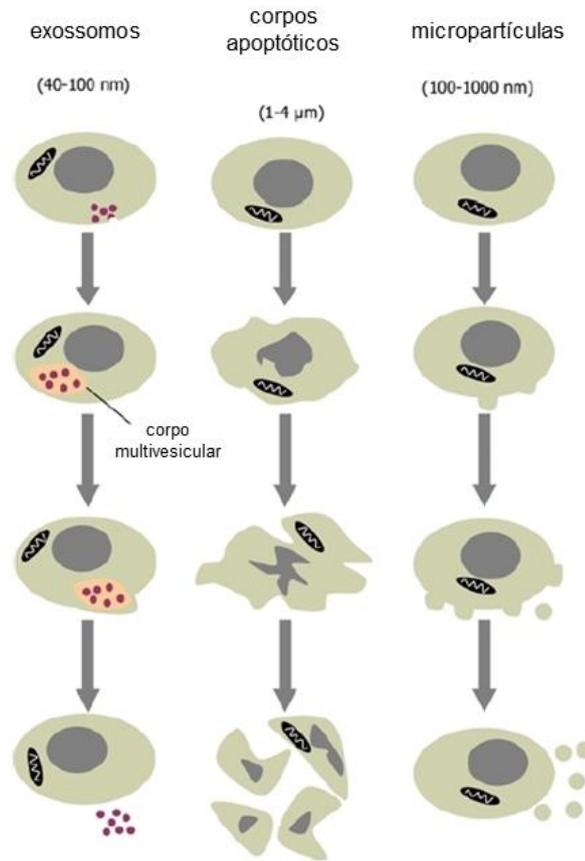
no meio extracelular ou no estado ativo (como receptores fosforilados) para outra célula, protegendo-as assim da degradação extracelular. O conteúdo das VE depende em grande parte do seu tipo celular de origem. Porém, o estado de ativação celular também tem influência sobre o conteúdo das VE liberadas, inclusive o seu destino. Além disso, a composição da VE pode variar como resultado de sua possível fusão com outra (RAK, 2010).

Ainda não há um consenso geral na literatura referente ao estabelecimento de uma nomenclatura oficial para os vários tipos de VE liberados pelas células, devido aos vários tipos celulares que podem liberá-las, diferentes procedimentos de purificação ou mecanismos diferentes de geração (SHIFRIN et al., 2013). No entanto, muitos autores consideram duas categorias principais, diferenciadas pela morfologia, tamanho, moléculas de superfície, conteúdo, e mecanismos pelos quais são geradas: as micropartículas (MP), cujas dimensões variam entre 0.1-1 μm ; e exossomos (Exo), que possuem dimensões menores, da ordem de 0.05-0.1 μm (BURGER et al., 2013; SHIFRIN et al., 2013). Corpos apoptóticos, formados exclusivamente durante os estágios finais da apoptose celular, também são considerados por alguns autores como um tipo de vesícula extracelular (BURGER et al., 2013) (Fig. 7).

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

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

Figura 7 – Origens das principais classes de vesículas extracelulares



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

Fonte: Adaptado de BURGER et al., 2013.

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

A produção de VE ocorre em diversos processos fisiológicos, como diferenciação ou ativação celular. Além disso, essa produção também pode ser deflagrada em condições patológicas, como trombose, infecções, desordens cardiovasculares, assim como o câncer, onde

a ativação de oncogenes mutantes, como K-ras, assim como a perda de função de genes supressores de tumor, como p53, pode estimular a liberação destas estruturas em grandes quantidades (RAK, 2010). A proporção de VE circulantes no sangue periférico também pode se elevar nestas condições (CASTELLANA; TOTI; FREYSSINET, 2010), podendo inclusive ser detectadas em outros fluidos biológicos como o líquido cérebro-espinhal e a urina (COCUCCI; RACCHETTI; MELSOLESI, 2009). Estudos correlacionam a presença de VE a vários aspectos da tumorigênese, como progressão tumoral, invasão, angiogênese e metástase (RAK, 2010).

Justificativa

É sabido que as células tumorais geram grande quantidade de VE e que os TAM no microambiente tumoral apresentam predominantemente um fenótipo pró-tumoral. Portanto, se torna interessante investigar a importância das VE de células tumorais na polarização de macrófagos. Durante a minha dissertação mostramos que as VE de melanoma MV3 são capazes de: 1) ativar neutrófilos, induzindo efeitos como proteção contra a apoptose espontânea, liberação de NETs (do inglês *neutrophil extracellular traps*) e produção de ROS; 2) polarizar neutrófilos, uma vez que estas células aumentam a expressão de marcadores moleculares pró-tumorais; e 3) mudar o perfil funcional destas células, uma vez que perdem sua citotoxicidade contra células de melanoma *in vitro* (GUIMARÃES-BASTOS et al., artigo em processo de resposta na *Journal of Leukocyte Biology*). Sendo assim, é de suma importância observar tais efeitos sobre um outro tipo de leucócito, os macrófagos. Além disso, a inibição do efeito das VE nestas células também poderia se tornar uma importante estratégia no tratamento do câncer.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho foi investigar a influência das vesículas extracelulares liberadas pelas células MV3, uma linhagem de melanoma humano altamente invasivo, na polarização de macrófagos humanos.

1.2 Objetivos Específicos

Este trabalho teve como seguintes objetivos específicos:

- a) caracterizar o conteúdo do meio condicionado de MV3 determinando a presença de VE neste meio;
- b) analisar os efeitos das VE sobre funções de monócitos ou macrófagos humanos, tais como quimiotaxia, avaliando também a sua capacidade alterar a expressão de mediadores pró- e antiinflamatórios nos macrófagos;
- c) caracterizar fenotipicamente os macrófagos tratados com VE, através da expressão diferencial de marcadores moleculares;
- d) avaliar o efeito do bloqueio das VE sobre a polarização de macrófagos;
- e) investigar o comportamento *in vivo* das VE sobre a polarização de macrófagos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagens celulares utilizadas

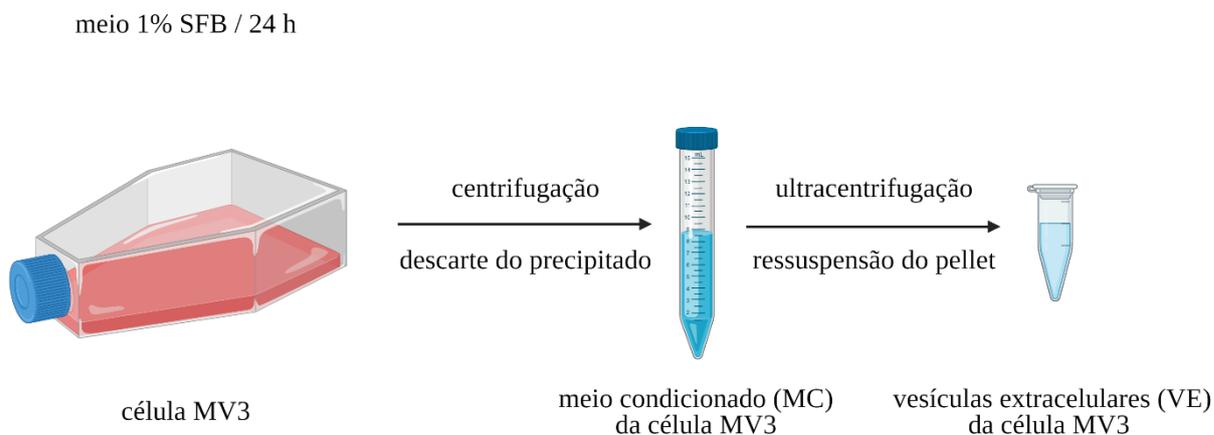
Em nossos ensaios, utilizamos a linhagem celular de melanoma humano com alto potencial metastático MV3, doada pelo Dr. Cezary Marcienkevickz da Temple University PA, EUA (VAN MUIJEN et al., 1991). Em alguns ensaios, também foi utilizada a linhagem celular de de melanócitos humano NGM, obtida do Banco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

2.2 Obtenção de meio condicionado (MC) e VE de melanoma MV3

As células MV3 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Gibco, Life Technologies, Calrsbad, California, EUA), suplementado com 23 mM de NaHCO₃ (Merck), 21,8 mM de HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 60 mg/L de penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100 mg/L de streptomina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 10% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil), em pH 7.2.

As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂, sendo e regularmente testadas para contaminação com micoplasma. Após as células atingirem confluência de aproximadamente 100% as mesmas foram lavadas e a suplementação do meio de cultura foi alterada para 1% de SFB. Após 24 horas, o meio condicionado liberado pelas células foi coletado. Para eliminação de possíveis debris celulares, o MC foi centrifugado a 250 x g por 10 minutos, a 37°C e o sobrenadante coletado, sendo submetido à ultracentrifugação a 100.000 x g por 4 horas, a 4°C. Posteriormente as VE foram ressuspensas em meio de cultura DMEM sem suplementação de SFB, em volume equivalente ao volume do MC (Fig. 8) e mantidas em freezer -70°C.

Figura 8 – Obtenção de MC e VE de células de melanoma MV3



Legenda: Obtenção de MC e VE a partir da cultura *in vitro* de células de melanoma MV3.

Fonte: O autor, 2021.

2.3 Quantificação de VE

Após a purificação das VE, as amostras foram quantificadas através de duas metodologias: **A)** Através da tecnologia Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), utilizando-se o equipamento de análise de partículas por real time, Zetaview[®] (RONDON et al., 2018), de acordo com as especificações do fabricante. As amostras de VE foram diluídas em 1 mL de PBS e injetadas na câmara de amostra em diluições adequadas (aproximadamente 100 amostras por campo) com uma seringa hipodérmica. Onze campos diferentes da câmara de amostra foram registrados em vídeo digital e analisados pelo *software* Particlemetrix[®], ajustado nos seguintes parâmetros de análise: sensibilidade de 85%, brilho mínimo de 25, diâmetro compreendendo entre 5 e 10000 nm; **B)** Por citometria de fluxo (C6 Accuri, Ann Arbor, Michigan, EUA), através da marcação positiva para anexina-V (Abcam, Cambridge, Inglaterra) (CAMUS et al., 2013). Para delimitação do tamanho das VE foram utilizadas *beads* de 1 µm, em leitura prévia. Paralelamente, foram adicionadas *beads* de 2 ou 10 µm em concentração determinada para se estimar a quantidade precisa de VE.

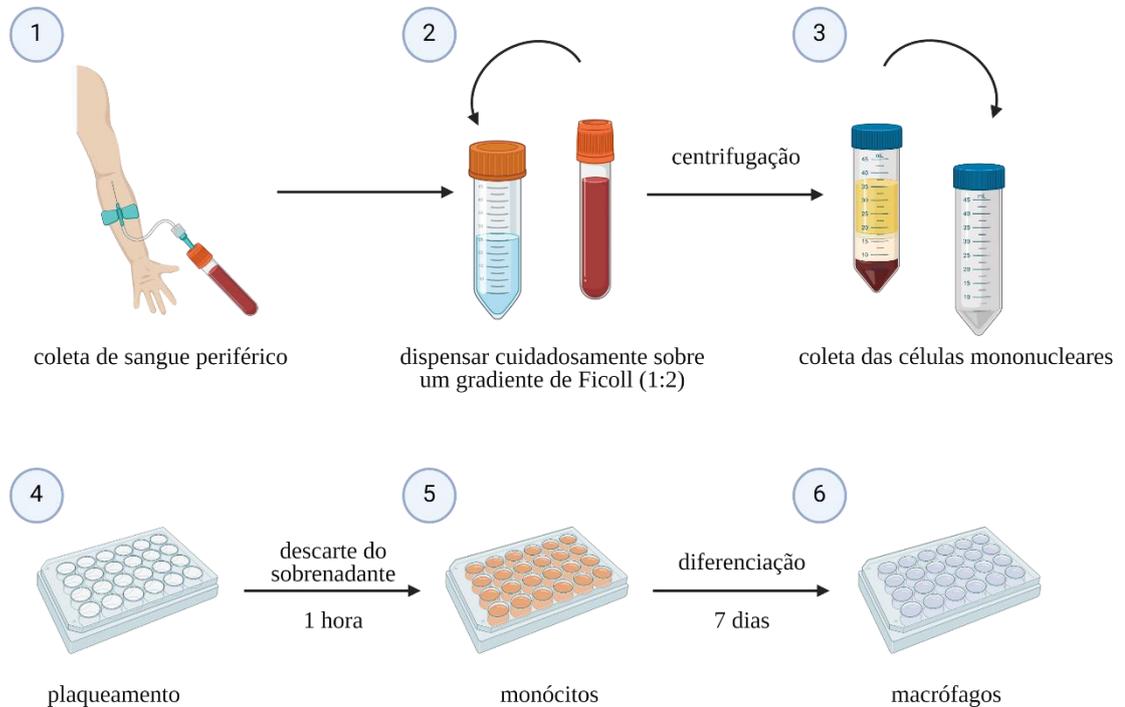
2.4 *Western blotting* de VE

VE foram lisadas em tampão RIPA contendo o inibidor coquetel de inibidores SigmaFAST Protease Inhibitor Cocktail Tablet EDTA Free (Sigma-Aldrich), DNase (2 mg/mL), PMSF (2 μ M) e ortovanadato (1 mM) no gelo, durante 20 minutos. Extratos foram fervidos a 100°C, durante 5 minutos. Amostras equivalentes de proteínas (20 μ g) foram carregadas em cada poço de géis SDS-PAGE 15% de acrilamida. Após a transferência das proteínas para membranas de PVDF, os *blots* foram incubados com o anticorpo anti-sintetina-1 (Abcam #19903). Bandas imunorreativas foram visualizadas utilizando-se a solução ECL Signal (GE Healthcare) e as imagens foram adquiridas no equipamento Imagequant LAS 500 (GE Healthcare).

2.5 Isolamento de monócitos e diferenciação em macrófagos

Monócitos foram isolados de sangue periférico de doadores saudáveis (aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do HUPE; CAAE:38257914.7.0000.5259), na presença de ácido etileno diamina tetra acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) 5% em PBS estéril, através de gradiente contínuo de Ficoll (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) na proporção de 1:2. O sangue foi dispensado cuidadosamente sobre o Ficoll e posteriormente submetido à centrifugação (700 x g, 30 minutos, aceleração 0/desaceleração 0, temperatura ambiente). Posteriormente, as camadas superiores contendo células mononucleares foram coletadas, ressuspensas em meio RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, Calrsbad, California, EUA), suplementado com 23 mM de NaHCO₃, 21,8 mM de Hepes, 60 mg/L de penicilina e 100 mg/L de streptomina, e plaqueadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após uma hora, o sobrenadante enriquecido em linfócitos foi descartado e os monócitos aderidos foram ressuspensos em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Este meio foi trocado aproximadamente a cada 2 dias. Ao final de 7 dias, os monócitos se encontravam completamente diferenciados em macrófagos (Fig. 9).

Figura 9 – Isolamento de monócitos através de gradiente contínuo de Ficoll



Legenda: Isolamento e cultura de monócitos obtidos do sangue periférico de doadores saudáveis e posterior diferenciação destas células em macrófagos *in vitro*.

Fonte: O autor, 2021.

2.6 Modelo experimental de tratamento *in vitro* de macrófagos

Todas as incubações foram realizadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 3 dias. Os grupos experimentais foram os seguintes: LPS + IFN- γ (LPS 1 μ g/mL + IFN- γ 100 ng/mL) para diferenciação em macrófagos M1; IL-4 (50 ng/mL) para diferenciação em macrófagos M2; MC de melanoma MV3 (50% v/v) e VE (50% v/v), em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Em alguns experimentos, a incubação com as VE aconteceu na presença da anexina bloqueadora (10 nM).

2.7 Ensaios de quimiotaxia em Câmara de Boyden

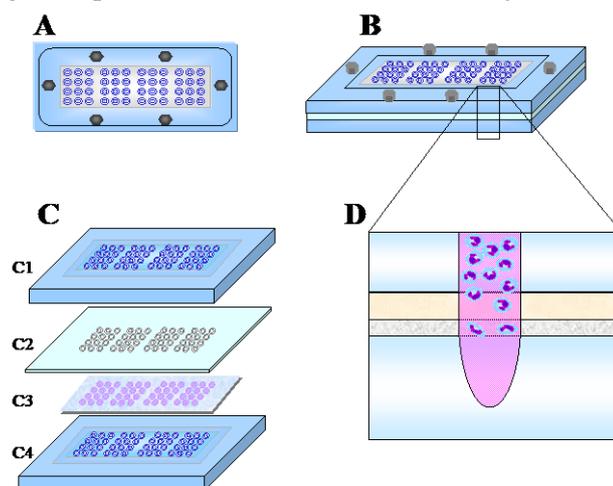
Os ensaios de quimiotaxia foram realizados na Câmara de Boyden modificada de 48 poços (Fig. 10) (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, Maryland, EUA).

Os monócitos (10^4 células em um volume de $50 \mu\text{L}$ por poço) foram incubados no compartimento superior da câmara a 37°C , em uma atmosfera com 5% de CO_2 , para migrar em direção aos estímulos, isolados por uma membrana de policarbonato (GE Healthcare) de $8 \mu\text{m}$ durante 90 minutos.

Os estímulos foram inseridos no compartimento inferior da câmara em um volume final de $28,5 \mu\text{L}$. As propriedades quimiotáticas das VE foram testadas em diferentes concentrações. O peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a uma concentração final de 100 nM foi utilizado como controle positivo de migração. A migração para o meio RPMI puro foi utilizada como controle negativo (migração randômica).

Para avaliar a migração, foi realizada a raspagem superior das membranas, para a retirada das células que não migraram, posteriormente as mesmas foram coradas com o kit Diff-Quik[®] (Dade Behring, Dudingen, Suíça), de acordo com as especificações do fabricante, para a visualização das células. As membranas foram lavadas para a retirada do excesso de corante, montadas em lâminas e as células contadas em microscopia óptica (aumento de 100x).

Figura 10 – Representação esquemática de uma câmara de Boyden modificada



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

Fonte: MORAES, 2003.

2.8 Investigação da expressão dos marcadores moleculares CD86 e CD206 por citometria de fluxo

Macrófagos (5×10^5 células/grupo) tratados conforme item 2.6 foram cuidadosamente soltos das placas de cultura com o auxílio de *cell scrapers*, ressuspensos em tampão de citometria (PBS contendo 2% de SFB, EDTA 5 mM) e incubados por 20 minutos com anticorpos anti-CD86 conjugado a APC (Biolegend #305412) e anti-CD206 conjugado a PE (Biolegend #321106), no gelo e na ausência de luz. Os isotipos controle utilizados foram IgG2 de rato conjugada a APC (Biolegend #400612) e IgG1 de camundongo conjugada a PE (Biolegend #400113). A expressão destes marcadores de superfície foi verificada por citometria de fluxo (C6 Accuri) nos canais FL4 e FL2, respectivamente. Foram capturados 20000 eventos/amostra.

2.9 ELISA

Após o tratamento de macrófagos (10^6 células/grupo) conforme item 2.6, as células foram lavadas e o meio de cultura foi trocado para um novo meio com suplementação de 1% de SFB. Ao final de três dias, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados para eliminação de possíveis debris celulares e armazenados a -20°C .

Para mensurar a secreção de citocinas presentes no sobrenadante, foram utilizados kits de ELISA da Peprotech. A determinação da concentração de TNF- α (catálogo: 900-M25), IL-1 β (catálogo: 900-K95), TGF- β (catálogo: BGK01137), IL-10 (catálogo: 900-K21) e IL-6 (catálogo: 900-K16) nas amostras foi realizada de acordo com as especificações do fabricante.

2.10 Microarranjo de DNA

Macrófagos (10^6 células/grupo) tratados conforme item 2.6 foram ressuspensos em tampão Trizol[®] (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O RNA total das amostras foi isolado utilizando-se o RNEasy Mini Kit[®] (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as

especificações do fabricante. A qualidade e quantidade de RNA foi analisada no fluorímetro Qubit 4[®] (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). Amostras apresentando razão A260/A280 entre 1.8 e 2.2 foram consideradas adequadas para qPCR.

O RNA foi retrotranscrito em cDNA utilizando-se o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher) de acordo com as especificações do fabricante.

Amostras equivalentes de cDNA foram amplificadas utilizando-se o Made-to-Order Low-Density Array System (Applied Biosystems, Thermo Fisher), de acordo com as especificações do fabricante. Os arrays foram realizados no equipamento QuantStudio[®] 12K Flex-Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher).

Placas TaqMan Low Density Array foram customizadas para investigar mudanças na expressão gênica de CCR2, CCR3, CCR5, CX3CR1, CCL3, IL-6, TNF- α , MIF, NRF2, OXSR1, HO-1, Ferritina, HIF-1 α , CD14, CD206 e NOS2, e actina e 18s rRNA como controles endógenos. A quantificação relativa de mRNA de cada gene em relação aos controles endógenos foi calculada através de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.11 Ensaio de atividade de luciferase

No segundo dia de tratamento conforme item 2.6, macrófagos (5×10^5 células/grupo) foram transfectados com lipofectamina contendo o plasmídeo que codifica a sequência para luciferase (Invitrogen, #13778-075) *overnight*, em meio sem vermelho de fenol. No dia seguinte, os meios condicionados dos macrófagos foram coletados, plaqueados em placas brancas de 96 poços e incubados com luciferina. O fator de transcrição NF- κ B se liga na região promotora da luciferase, comandando a sua expressão. Sendo assim, a mensuração da atividade desta enzima é uma maneira indireta de determinar a ativação de NF- κ B. A luminescência emitida pela atividade da luciferase foi mensurada pelo leitor de placas FlexStation 3 Multimode[®] (Molecular Devices, San José, CA, EUA).

2.12 Ensaio de produção de ROS e NO

Monócitos (10^5 células/poço) foram plaqueados em placas pretas de 96 poços. Sua diferenciação em macrófagos e tratamento ocorreram conforme descrito nos itens 2.5 e 2.6, respectivamente. No 10º dia, estas células foram carregadas com a sonda CM-H₂DCFDA (Invitrogen, #D23844 – 10 µM) ou DAF-FMDA (Invitrogen, #C6827 – 10 µM) por 1 hora. Após este período as células foram lavadas, ressuspensas em meio HBSS, e a oxidação das sondas foi observada pelo leitor de placas FlexStation 3 Multimode® nos comprimentos de excitação e emissão de 495 nm e 520 nm, respectivamente.

2.13 Ensaio de atividade de arginase

O ensaio de atividade de arginase realizado foi elaborado com base na adaptação do ensaio de Schimke (SCHIMKE, 1970), proposta por Corraliza e colaboradores (CORRALIZA et al., 1994), com algumas modificações.

Macrófagos (10^6 células/grupo) tratados conforme item 2.6 foram lisados em 100 µL de tampão de lise RIPA (Sigma, R0278), contendo 0.1% de Triton X-100, 10 µg de pepstatina e 10 µg de aprotinina e leupeptina; e essa mistura permaneceu em agitação por 30 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, foi adicionado em cada lisado 100 µL de Tris-HCl 50 mM + MnCl₂ 10 mM (pH = 7.6), durante 10 minutos, a 55°C. Esta etapa tem a finalidade de fornecer a enzima o seu co-fator manganês. Logo em seguida, a cada 100 µL desta mistura foi adicionado 100 µL de L-arginina 0.5 M (pH = 9.7), e a sua hidrólise foi realizada durante 60 minutos, a 37°C. De modo a parar a reação, foi adicionado em cada grupo 800 µL de uma mistura contendo H₂SO₄ + H₃PO₄ + H₂O (1:3:7, respectivamente).

Para medir a degradação de L-arginina em ureia, a cada grupo foi adicionado 50 µL de 9% de ISPF (Sigma, I3502), diluído em etanol 100% e o precipitado formado foi dissolvido pelo aquecimento das amostras durante 45 minutos a 100°C. Paralelamente, foi realizada uma curva padrão de ureia, partindo da concentração de 0.3 µg/µL (30 µg de ureia em 100 µL de solução), e a cada 100 µL de solução de ureia nas diferentes concentrações foram adicionados 400 µL da mistura ácida e 25 µL de ISPF.

Finalmente, após o período de aquecimento, as amostras permaneceram por 10 minutos protegidas da luz, plaqueadas e lidas a 540 nm pelo leitor de placas FlexStation 3 Multimode®.

2.14 Ensaio de viabilidade celular

Monócitos (10^6 células/grupo) foram cuidadosamente pipetados no interior de insertos de 0.4 μm de *transwell* (Costar, Washington, DC, EUA, catálogo 3413). Ao final de 7 dias, os monócitos se encontraram completamente diferenciados em macrófagos. Então, foram realizados os tratamentos durante três dias conforme item 2.6.

Paralelamente, no 10º dia, células MV3 (5×10^5 células/grupo) foram semeadas em placas 24 poços. Após aderirem ao fundo da placa, foram realizadas as trocas de meios e um dos poços foi tratado com ciclohexamida (5 μM), e os insertos contendo macrófagos foram cuidadosamente adicionados sobre os poços contendo células MV3, sendo mantidos por 3 dias adicionais.

Posteriormente, a viabilidade das células MV3 foi investigada através do ensaio de MTT. O meio das células foi trocado por PBS e 50 μg /poço de MTT foram adicionados.

Após 4 horas de incubação a 37°C, em uma atmosfera com 5% de CO₂ e na ausência de luz, a solução de MTT foi descartada e a cada poço foi adicionado 100 μL de isopropanol de forma a dissolver os cristais de formazan resultantes da metabolização do MTT. A placa foi incubada a 37°C, em uma atmosfera com 5% de CO₂ por 30 minutos adicionais, e ao final deste período as amostras foram lidas a 570 nm pelo leitor de placas FlexStation 3 Multimode®.

2.15 Biodistribuição de VE

Para os experimentos de biodistribuição de VE *in vivo*, 4 camundongos *nude* (aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da UFRJ; CEUA: 181/2017), com acesso a água e ração *ad libitum* foram utilizados após atingirem 8 semanas de idade.

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma mistura de 10% de quetamina e 2% de xilazina. Então, VE radiomarcadas com ^{99m}Tc (radioisótopo tecnécio-99m)

foram administradas por via retro-orbital nos animais (CERQUEIRA-COUTINHO et al., 2017).

Após duas horas da injeção, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e os órgãos de interesse (coração, cérebro, estômago, intestino, bexiga, rim, pulmão, baço, pâncreas e fígado), além do sangue, foram imediatamente retirados e pesados para a estimativa quantitativa de contagens gama, através da utilização de um contador gama (Perkin Elmer, Wizard 2470®). Os resultados foram expressos como porcentagem de dose injetada por órgão.

2.16 Polarização de macrófagos *in vivo*

Para os experimentos de investigação da polarização de macrófagos *in vivo*, seis camundongos *nude* (aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da UFRJ; CEUA: 181/2017), com acesso a água e ração *ad libitum* foram utilizados após atingirem 8 semanas de idade.

Os animais receberam injeção de 10⁶ células MV3 por via subcutânea no flanco direito, e após três semanas, três animais foram anestesiados via intramuscular com uma mistura de 10% de quetamina e 2% de xilazina e foram injetadas 200 µg de VE por via retro-orbital (CERQUEIRA-COUTINHO et al., 2017).

Após uma semana, dois animais foram a óbito e quatro (dois de cada grupo) animais foram sacrificados em câmara de CO₂, tendo os pulmões dissecados. Os pulmões foram digeridos com colagenase e submetidos a gradiente de Ficoll para obtenção de macrófagos (DEBRITO et al., 2019). A identificação de macrófagos e do seu perfil foi realizada através da utilização dos anticorpos F4/80 conjugado a APC (Biolegend #123116), CD206 conjugado a PE (Biolegend #141706) e CD301 conjugado a PE-Cy7 (Biolegend #145706). Os isotipos controle utilizados foram IgG2 de rato conjugada a APC (Biolegend #400612), IgG1 de camundongo conjugada a PE (Biolegend #400113) e IgG2 de rato conjugada a PE-Cy7 (Biolegend #400617). A expressão destes três marcadores foi verificada por citometria de fluxo (C6 Accuri) nos canais FL4, FL2 e FL3, respectivamente.

2.17 Análises estatísticas

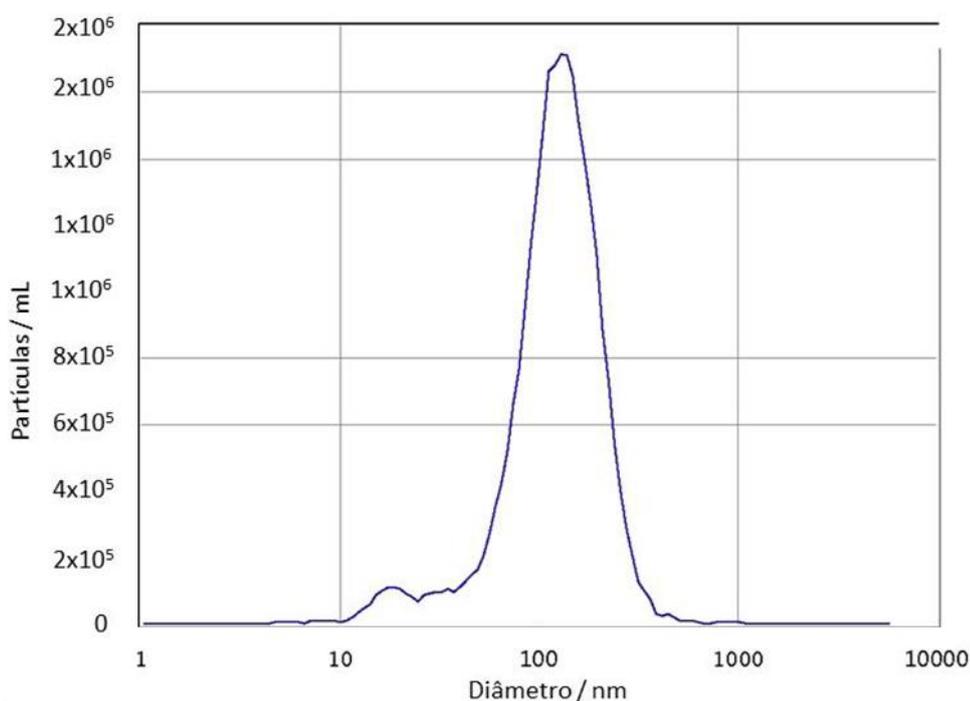
A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software Prism (GraphPad Software Inc., CA, USA). Os dados foram expressos como média + erro padrão. A significância estatística foi avaliada através do teste one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Alguns ensaios foram analisados diretamente através do teste t de Student. Foi determinada como significância estatística um valor de $p \leq 0.05$.

3 RESULTADOS

3.1 Análise das dimensões das vesículas extracelulares liberadas por células de melanoma humano MV3

De modo a avaliar o perfil das VE liberadas pelas células de melanoma MV3, o tamanho das diferentes populações de VE presentes no meio condicionado de MV3 após 24 horas de cultura foi avaliado através de real time Zetaview[®] (Fig. 11). Desta forma, foi observada uma heterogeneidade no tamanho das VE, com a presença de Exo (10 – 100 nm) e MP (100 nm – 1 μ m) neste meio.

Figura 11 – Dimensões das VE presentes no MC de células de melanoma MV3

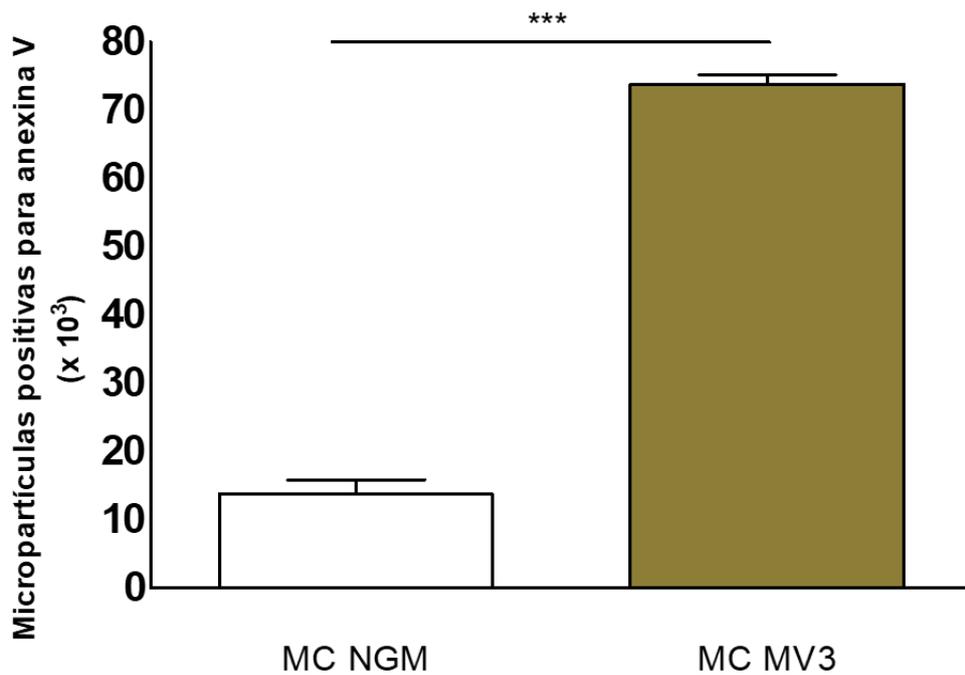


Legenda: Amostras de VE obtidas conforme descrito no item 2.2 da seção Material e Métodos foram ressuspensas em PBS, e através de microscopia real time Zetaview[®] foi investigada a distribuição de diferentes dimensões das vesículas presentes em meio.

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

Uma vez que foram detectadas no meio condicionado das células MV3 vesículas com tamanho compatível ao de MP, investigamos nesse meio a presença de MP e comparamos com a produção de MP por melanócitos humanos NGM. Foi observado através da marcação com anexina V, por citometria de fluxo, que após 24 horas em cultura nas mesmas condições, as células de melanoma MV3 liberaram altas quantidades de MP, quando comparadas às células de melanócito NGM. Esse aumento foi superior a 5x (Fig. 12).

Figura 12 – Quantificação de MP liberadas por células de melanócito NGM e de melanoma MV3

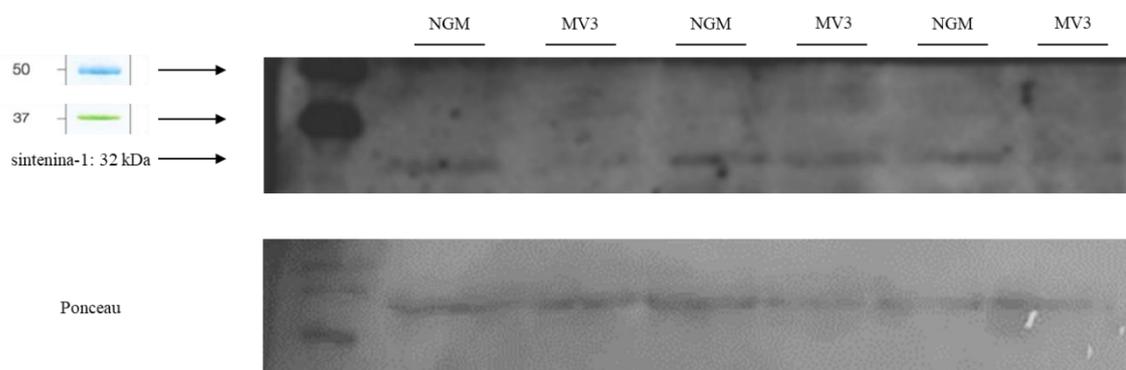


Legenda: Amostras de MC obtidas conforme descrito no item 2.2 da seção Material e Métodos foram marcadas com anexina V conjugada a FITC. Através do uso de beads de 2 ou 10 μm de diâmetro, foram realizadas as quantificações de MP nos MC de células de melanócito NGM e de melanoma MV3 por citometria de fluxo. *** $p < 0.001$.

3.3 Detecção do marcador exossomal sintenina-1 nas VE

Outra forma comum de identificação de VE ocorre através da detecção de marcadores exossomais, como sintenina-1 (BAIETTI et al, 2012; IMJETI et al, 2017). Foi observada, através de *western blotting*, a presença desta proteína de 32 kDa em amostras de VE tanto de células de melanócito NGM quanto de melanoma MV3 (Fig. 13).

Figura 13 – Western blotting das VE



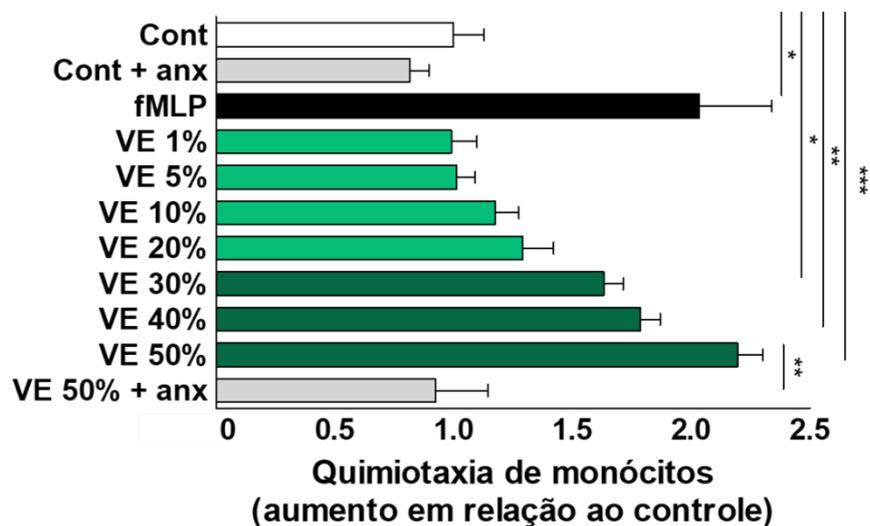
Legenda: VE obtidas conforme descrito no item 2.2 da seção Material e Métodos foram lisadas e submetidas a eletroforese por SDS-PAGE conforme descrito no item 2.4. A imagem é representativa da revelação para sintenina-1, marcador exossomal, em três amostras de VE de células de melanócito NGM e três amostras de VE de células de melanoma MV3.

3.4 Efeito das VE sobre a quimiotaxia de monócitos

Pensando na possibilidade das VE serem secretadas pela célula tumoral durante a fase de estabelecimento do tumor, nos perguntamos se estas VE poderiam recrutar monócitos para o microambiente tumoral. Assim, observamos um efeito concentração-dependente das VE, que, a partir da proporção de 30% v/v, começaram a demonstrar efeitos quimiotáticos sobre os monócitos.

Observamos uma média de 24 monócitos migratórios por poço no grupo controle (migração randômica). Esta taxa aumentou para 48 células devido ao estímulo quimiotático do fMLP e, ao partir da proporção de 30% v/v, essa média foi significativamente maior, atingindo efeito semelhante ao controle positivo fMLP na proporção de 50% v/v (média de 52 monócitos por poço). Além disso, através do bloqueio da fosfatidilserina presente na membrana das VE com o uso de anexina V bloqueadora, mostramos que este efeito também é fosfatidilserina-dependente.

Figura 14 – Efeito das VE sobre a quimiotaxia de monócitos



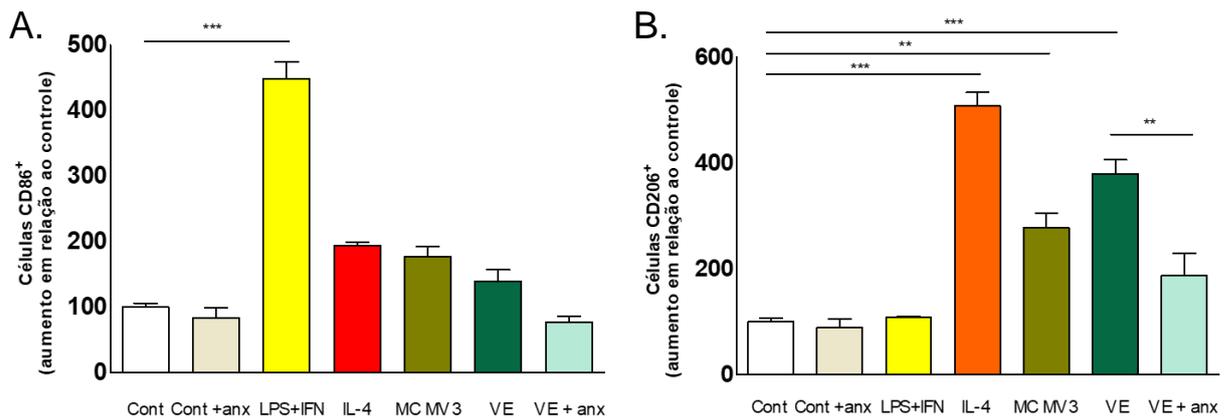
Legenda: Monócitos (10^4 células/poço) foram incubados no compartimento superior da Câmara de Boyden para migrar em direção aos estímulos inseridos no compartimento inferior, isolados por uma membrana de policarbonato ($8\ \mu\text{m}$), durante 90 minutos. O peptídeo fMLP (100 nM) foi usado como controle positivo. Anexina-V (10 nM) foi utilizada para bloquear a fosfatidilserina presente na membrana das VE. Os dados representam media + erro padrão de cinco experimentos independentes. * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$.

3.5 Efeito das VE sobre a expressão de CD206 em macrófagos

Quando polarizados para um fenótipo M2, macrófagos apresentam aumento da expressão de marcadores como CD206 (ROSZER, 2015). Portanto, nos perguntamos se a incubação com VE induziriam aumento da sua expressão.

Observamos através de citometria de fluxo que o estímulo com LPS/IFN- γ aumentou a expressão de CD86, marcador M1, nos macrófagos (Fig. 15A). Por outro lado, à semelhança do estímulo do controle positivo IL-4, macrófagos tratados com VE apresentaram aumento da expressão de CD206 em suas células e que, uma vez bloqueada a fosfatidilserina pelo uso da anexina V bloqueadora, este efeito foi inibido (Fig. 15B).

Figura 15 – Efeito das VE sobre a expressão de CD206 em macrófagos



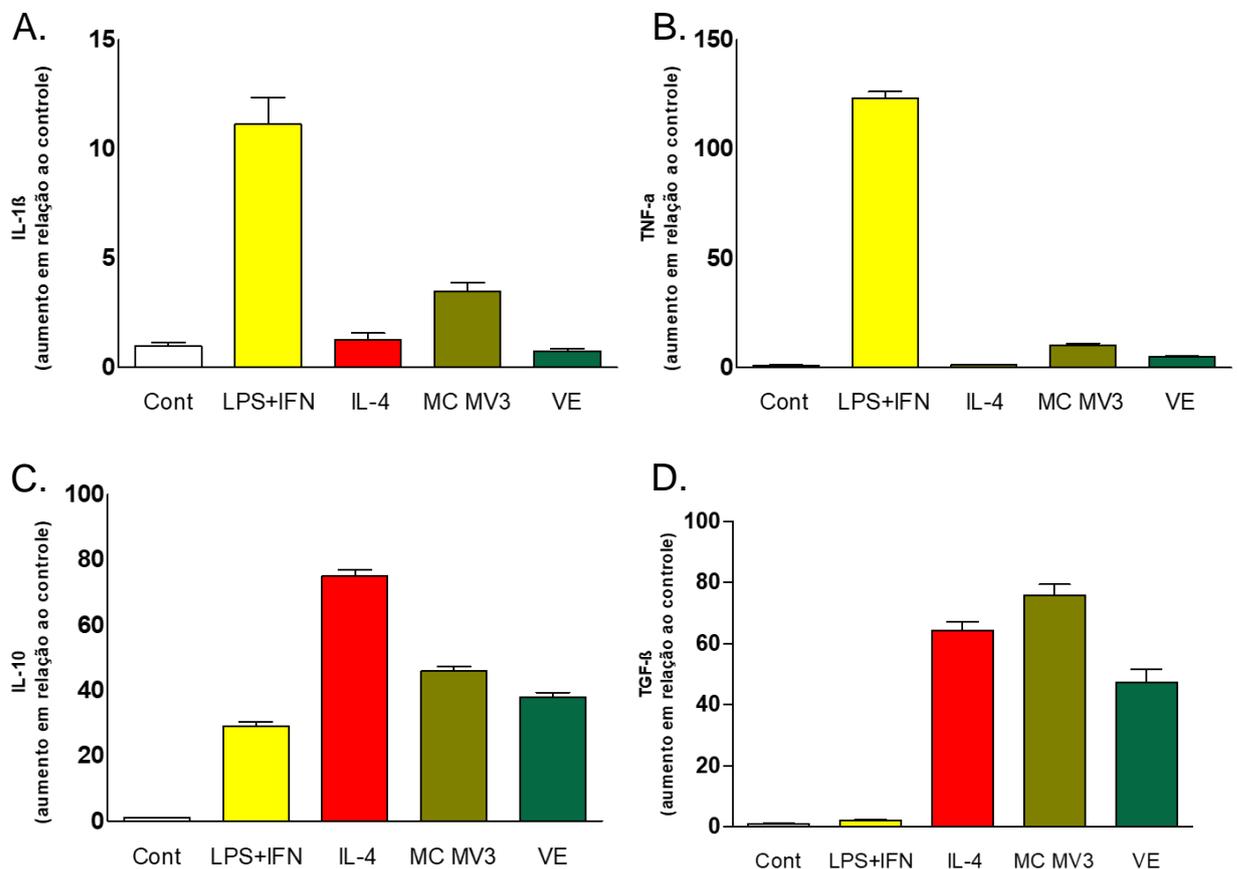
Legenda: Antes do ensaio, macrófagos (5×10^5 cels/poço) foram cuidadosamente soltos das placas de cultura e incubados durante 20 minutos com anticorpos anti-CD86 conjugado a APC (A) e anti-CD206 conjugado a PE (B). A expressão destes marcadores de superfície foi verificada por citometria de fluxo nos canais FL4 e FL2, respectivamente. Os dados representam media + erro padrão de quatro experimentos independentes. ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$.

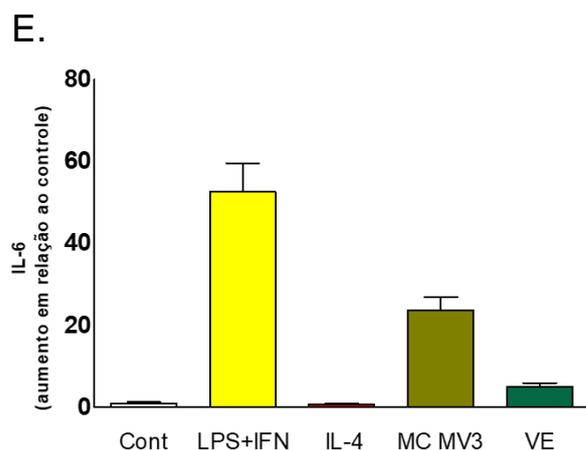
3.6 Efeito das VE sobre a secreção de marcadores M2 por macrófagos

Macrófagos polarizados para o tipo M2 apresentam níveis aumentados de certos marcadores moleculares como TGF- β e IL-10 (SICA et al., 2015). De forma a continuar explorando o efeito das VE sobre a polarização destas células, investigamos a liberação de marcadores moleculares característicos de M1 e M2 pelos macrófagos ao final dos estímulos.

Nossos resultados demonstraram que o estímulo pró-inflamatório induziu aumento na média de IL-1 β (Fig. 16A) e TNF- α (Fig. 16B), marcadores M1, em comparação ao grupo controle. Por outro lado, à semelhança do controle positivo IL-4, macrófagos tratados com o MC ou VE apresentaram aumento na média de IL-10 (Fig. 16C) e TGF- β (Fig. 16D), em comparação ao grupo não tratado. Observamos também aumentos nos níveis de IL-10 por ação do estímulo M1 em macrófagos (Fig. 16C). Finalmente, observamos aumento nos níveis de IL-6 nos macrófagos estimulados tanto com LPS/IFN- γ , quanto MC ou VE, em proporções menores (Fig. 16E).

Figura 16 – Efeito das VE sobre a secreção de marcadores M2 por macrófagos





Legenda: Macrófagos foram tratados conforme item 2.6. Posteriormente, estas células foram lavadas e seus sobrenadantes contendo citocinas foram coletados após 72 horas e armazenados a -20°C até a realização dos experimentos. Para a dosagem da concentração de citocinas, as amostras foram submetidas a ensaios de ELISA indireto (Peprotech). Os dados representam média + erro padrão de dois experimentos independentes.

3.7 Efeito das VE sobre a expressão gênica de marcadores moleculares envolvidos em respostas quimiotáticas, inflamatórias e antioxidantes em macrófagos

Continuando com a caracterização dos macrófagos, investigamos o perfil gênico de marcadores moleculares envolvidos em diversas funções de monócitos e macrófagos, como quimiotaxia, inflamação e resposta antioxidante.

Em relação a genes relacionados à quimiotaxia, observamos diminuição na expressão dos receptores CCR2, CCR3 e CX3CR1, e aumento na expressão de CCR5 nos macrófagos estimulados pelas VE, quando comparados ao macrófagos não estimulados com VE. O efeito das VE sobre a expressão de CCR5 pelos macrófagos foi inibido pela incubação simultânea com anexina V bloqueadora.

Quanto a genes relacionados à inflamação, observamos também aumento da expressão de CCL3 e IL-6 em ambos os grupos, porém em diferentes magnitudes. Além disso, os níveis de MIF (do inglês *macrophage inhibitory factor*), aumentaram em ambos os casos. O uso concomitante de anexina V bloqueadora inibiu o efeito das VE sobre a expressão tanto de CCL3, quanto de IL-6 (porém o efeito de inibição desta foi maior, quase 100x menos) pelos macrófagos.

O fator de transcrição NRF2 (do inglês *nuclear factor erythroid-derived 2)like-2* atua como um sensor redox no organismo, cuja ativação comanda a expressão de diversas moléculas antioxidantes, como a HO-1 (heme oxigenase 1), que podem inativar espécies reativas (CHEN; ZHANG; CAI, 2014). Além disso, a ativação de NRF2 em macrófagos foi associada à sua

polarização M2 em um modelo *in vitro* (FENG et al., 2018). Por esta razão, investigamos o perfil molecular de moléculas relacionadas à resposta antioxidante em nosso modelo.

Observamos nos macrófagos estimulados com VE aumento nos níveis de NRF2, OXSR1 (do inglês *oxidative stress responsive kinase 1*), HO-1 e ferritina, em relação ao grupo controle. Nos macrófagos estimulados com LPS/IFN- γ , observamos efeitos semelhantes ao das VE de indução da expressão de OXSR1, ao passo que o aumento nos níveis de NRF2 foi mais evidente e observou-se diminuição nos níveis de HO-1, quando comparados ao grupo controle. Observou-se também que a anexina V bloqueadora reduziu o efeito das VE sobre a expressão de NRF2, e suprimiu completamente o seu efeito sobre a expressão de HO-1.

Além disso, observamos aumento nos níveis de HIF-1 α em macrófagos estimulados pelas VE (cujas indução foi reduzida em mais de 10x pelo uso simultâneo da anexina V bloqueadora), enquanto que esse aumento foi menor em macrófagos M1, quando comparados ao grupo controle. Como era de se esperar, os níveis de CD14 diminuíram pela ação das VE, e os de CD206 aumentaram, enquanto que nos macrófagos que receberam o estímulo pró-inflamatório essa relação foi inversa. Para a nossa surpresa, os níveis de NOS2 aumentaram modestamente nos macrófagos estimulados pelas VE, porém esse aumento foi muito maior nos macrófagos estimulados com LPS/IFN- γ .

Figura 17 – Efeito das VE sobre a expressão gênica de marcadores moleculares envolvidos em respostas quimiotáticas, inflamatórias e antioxidantes em macrófagos



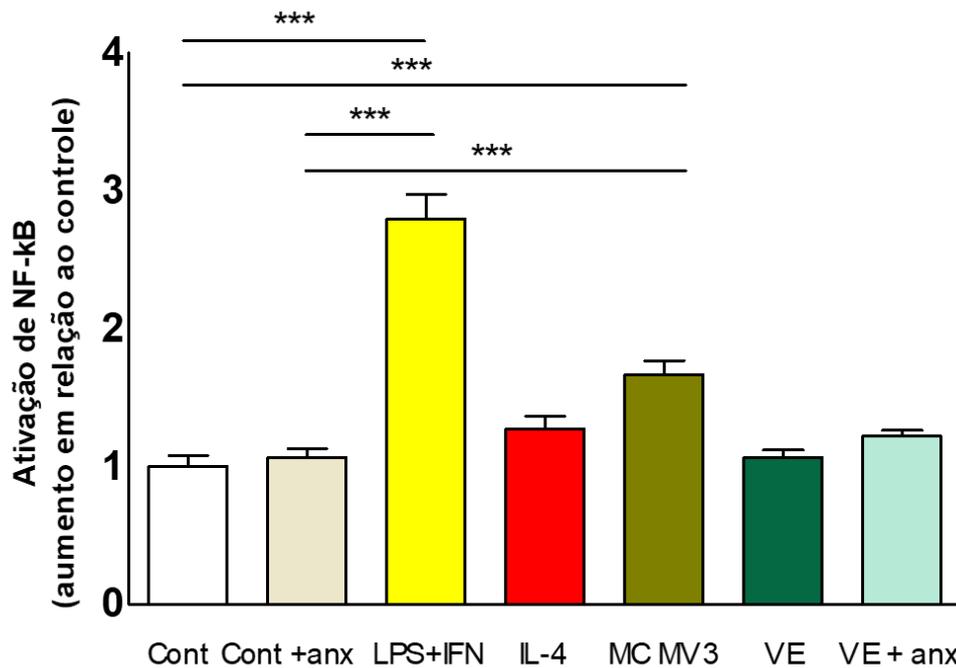
Legenda: *Heatmap* de 16 genes envolvidos em respostas quimiotáticas, inflamatórias e antioxidantes em macrófagos (10^6 células/gupo) tratados conforme descrito no item 4.6 da seção Material e Métodos. Seguiu-se o isolamento de RNA e microarranjo de DNA conforme descrito no item 4.10.

3.8 Efeito das VE sobre a ativação da via NF- κ B em macrófagos

A ativação de NF- κ B é importante para a transcrição de uma série de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (LIU et al., 2017), e constitui-se como uma via primordial para que ocorra a polarização M1 de macrófagos (SICA; MANTOVANI, 2012; LIU et al., 2017). De forma a complementar os dados anteriores, investigamos a ativação desta via nos macrófagos do nosso modelo.

Através da mensuração da atividade de luciferase nos sobrenadantes de macrófagos, observamos que o estímulo pró-inflamatório M1 induziu a ativação de NF- κ B nestas células. Observamos efeito semelhante, porém em menor intensidade, pela ação do MC. O estímulo dos macrófagos com VE não induziu a ativação desta via.

Figura 18 – Efeito das VE sobre a ativação da via NF- κ B em macrófagos



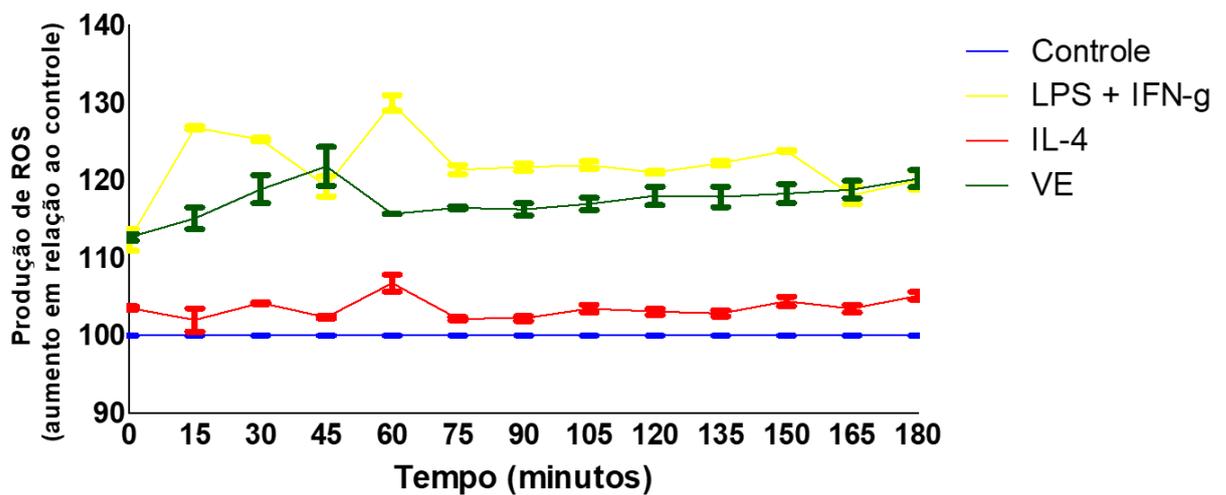
Legenda: Macrófagos (5×10^5 células/grupo) foram tratados conforme descrito no item 4.6 da seção Material e Métodos. No 9º dia foi realizada a transfecção dos macrófagos, e após 24 horas, o meio condicionado destas células foi coletado. Estes meios foram incubados com luciferina, e a atividade de NF- κ B foi investigada indiretamente pela luminescência emitida pela ação da luciferase em um leitor de placas. Os dados representam media + erro padrão de quatro experimentos independentes. * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$.

3.9 Efeito das VE sobre a produção de ROS por macrófagos

O aumento da produção de ROS é uma característica de macrófagos classicamente ativados, enquanto que na ativação alternativa esses níveis são menores (SOLINAS et al., 2009). Assim, investigamos o efeito das VE sobre a produção destas espécies reativas por macrófagos.

De forma interessante, observamos que, ao contrário do estímulo por IL-4, macrófagos estimulados por VE apresentaram aumento dos níveis de ROS de forma similar ao grupo tratado com LPS/IFN- γ (Fig. 19).

Figura 19 – Efeito das VE sobre a produção de ROS por macrófagos

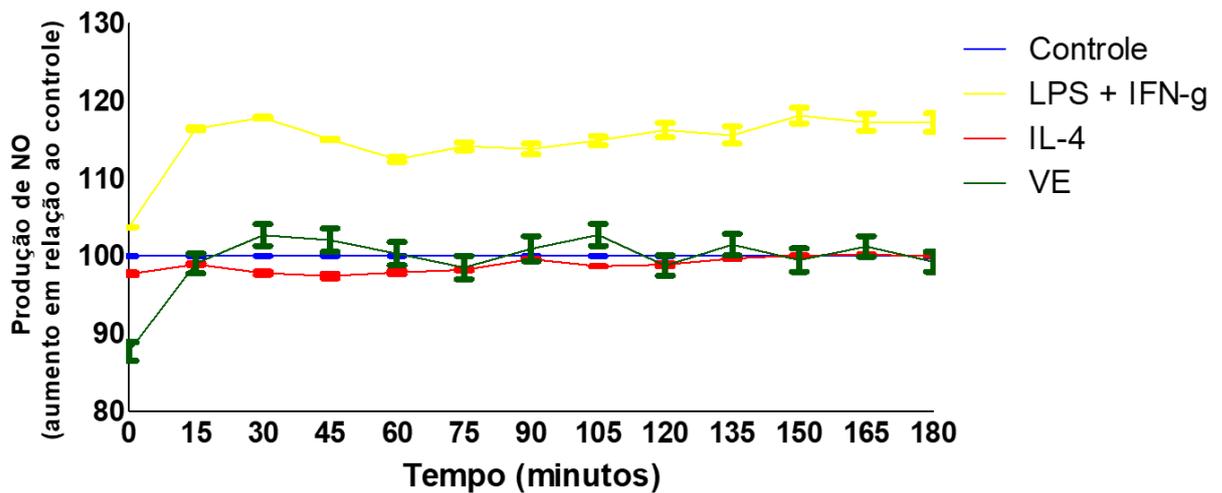


Legenda: Macrófagos (10^5 células/poço), no 10º dia foram incubados com a sonda DCF-DA ($10 \mu\text{M}$) por 1 hora. As células foram lavadas para a retirada da sonda não internalizada e ressuspensas em HBSS, seguida da leitura em leitor de placas nos comprimentos de excitação e emissão de 495 e 520 nm, respectivamente. O gráfico é representativo de quatro experimentos independentes.

3.10 Efeito das VE sobre a produção de NO por macrófagos

Macrófagos classicamente ativados possuem uma maior ativação da iNOS, e consequentemente elevada produção de NO, o que contribui com o seu potencial citotóxico. Por outro lado, macrófagos alternativamente ativados apresentam expressão reduzida desta molécula (SICA et al., 2015). Desta forma, investigamos o efeito das VE sobre a produção de NO por macrófagos, e observamos que, de forma semelhante ao estímulo com IL-4, os níveis de NO dos macrófagos permaneceram basais, diferentemente dos macrófagos tratados com LPS/IFN- γ (Fig. 20).

Figura 20 – Efeito das VE sobre a produção de NO por macrófagos



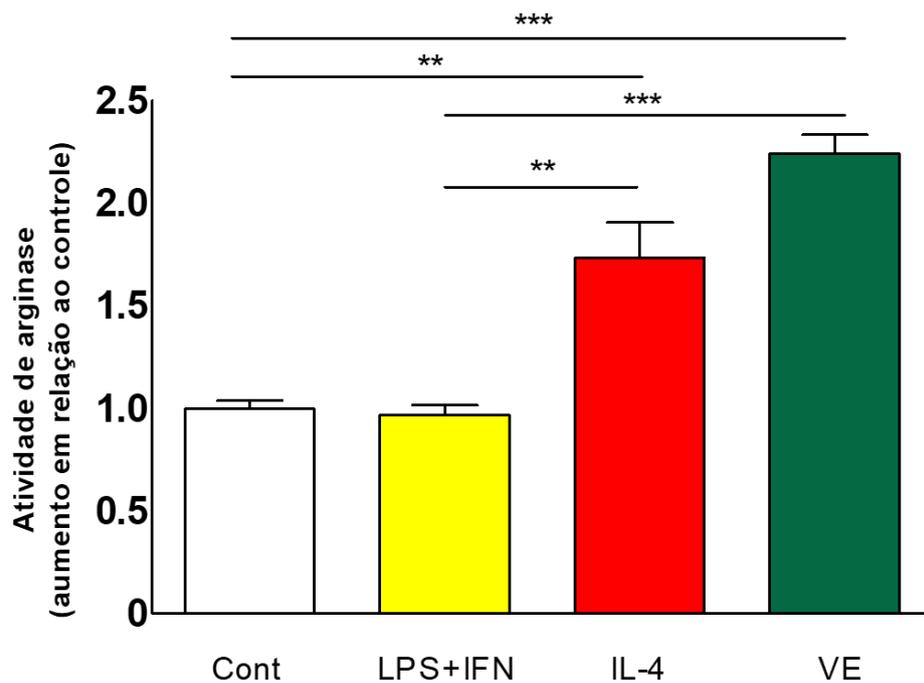
Legenda: Macrófagos (10^5 células/poço), no 10º dia foram incubados com a sonda DAF-DA ($10 \mu\text{M}$) por 1 hora. As células foram lavadas para a retirada da sonda não internalizada e ressuspensas em HBSS, seguida da leitura em leitor de placas nos comprimentos de excitação e emissão de 495 e 520 nm, respectivamente. O gráfico é representativo de quatro experimentos independentes.

3.11 Efeito das VE sobre a atividade de arginase em macrófagos

Macrófagos polarizados para o tipo M2 apresentam menor atividade citotóxica. Uma das possíveis explicações é a maior expressão e atividade de arginase, enzima que compete com a iNOS pelo mesmo substrato, reduzindo assim a biodisponibilidade de NO. Sabendo que macrófagos M2 podem apresentar maior atividade desta enzima (WEISSER et al., 2014), e de forma a corroborar o dado anterior, nos perguntamos se as VE induziriam o mesmo efeito.

Observamos através de ensaios enzimáticos que, à semelhança do estímulo do controle positivo IL-4, macrófagos estimulados com VE apresentaram aumento da atividade de arginase (Fig. 21).

Figura 21 – Efeito das VE sobre a atividade de arginase em macrófagos



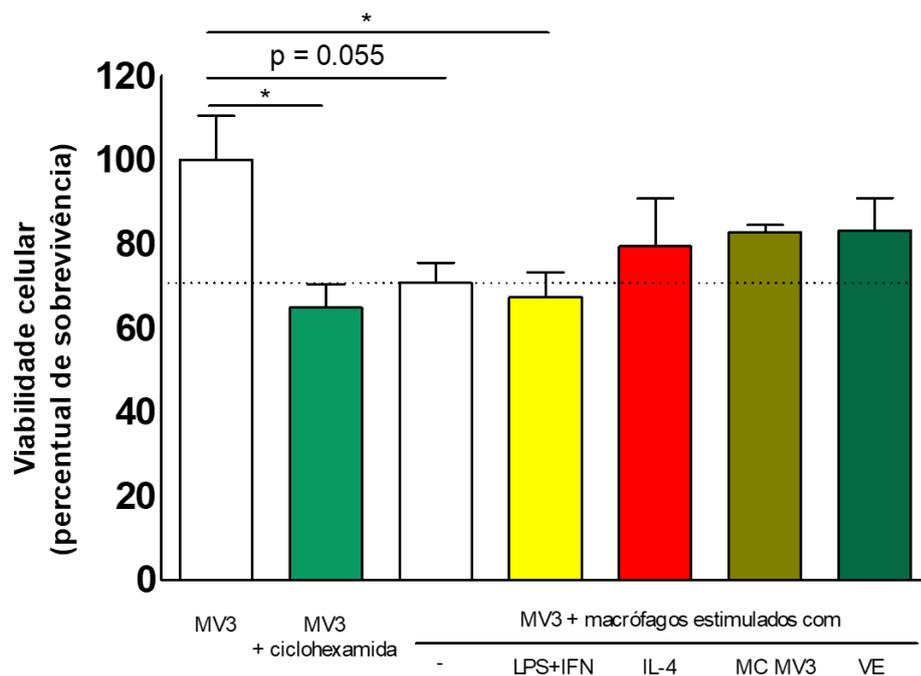
Legenda: Macrófagos (10^6 células/grupo) no 10º dia foram lisados e a mensuração da atividade de arginase foi realizada conforme descrito no item 2.10 da seção Material e Métodos. Os dados representam média + erro padrão de quatro experimentos independentes. ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$.

3.12 Efeito das VE sobre a capacidade citotóxica de macrófagos

Sabendo que macrófagos, na ausência de um estímulo M2, apresentam capacidade de combater células tumorais *in vitro* (SIMÕES et al., 2017), nos perguntamos como este efeito se apresentaria após o estímulo com a VE.

Após 72 horas de cocultura observamos que macrófagos na ausência de um estímulo apresentaram forte tendência em diminuir a viabilidade das células tumorais MV3 ($p = 0.055$) e que quando polarizados na presença do estímulo pró-inflamatório do LPS/IFN- γ , essa viabilidade foi reduzida ($p < 0.05$). Por outro lado, de forma semelhante ao estímulo com IL-4, macrófagos estimulados com VE não demonstraram citotoxicidade contra as células MV3.

Figura 22 – Efeito das VE sobre a capacidade citotóxica de macrófagos

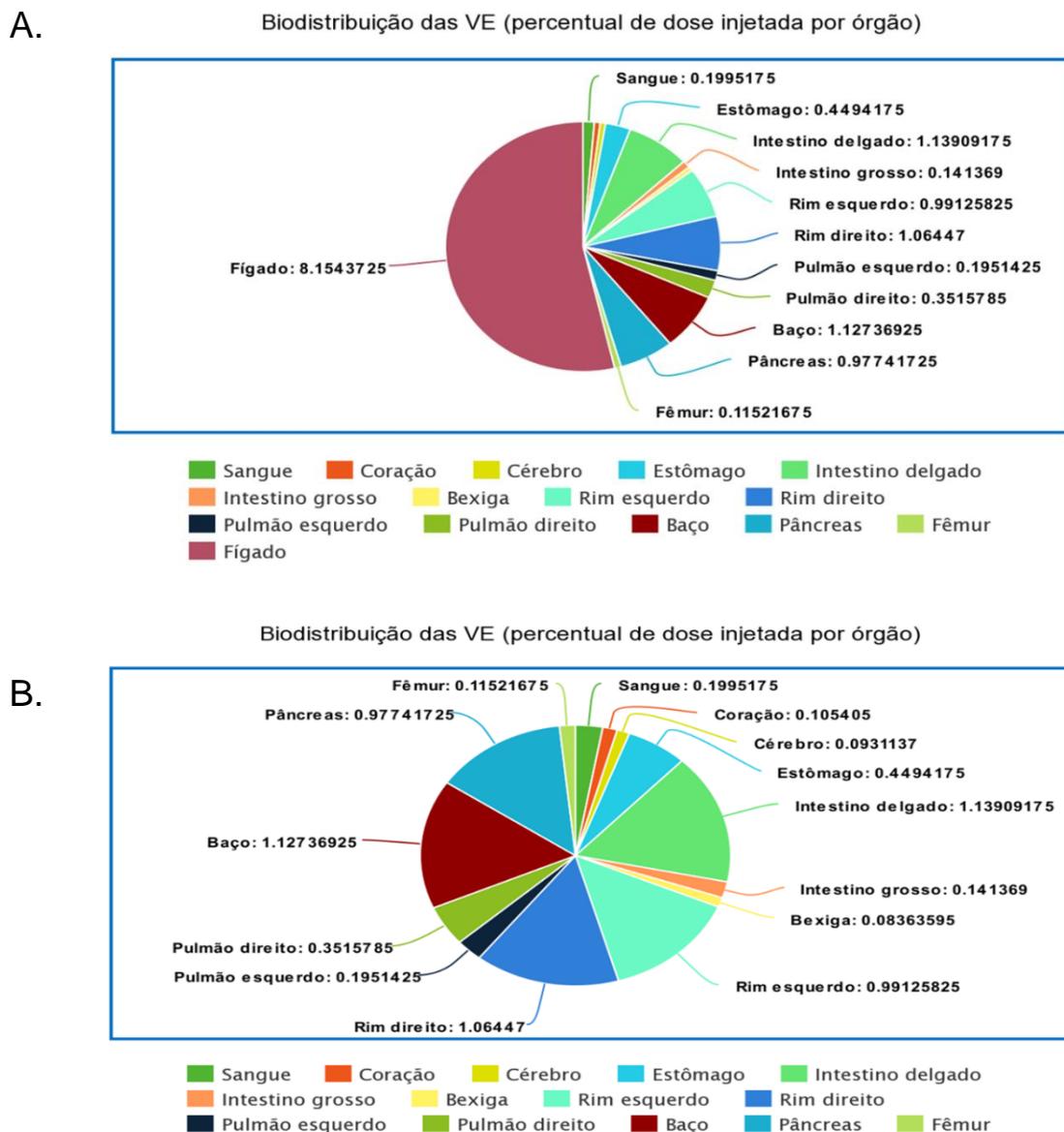


Legenda: Monócitos (10^6 células/grupo) foram cuidadosamente pipetados no interior de insertos de transwell de $0.4 \mu\text{m}$. Após a diferenciação de monócitos e polarização de macrófagos, os insertos foram cuidadosamente adicionados sobre poços contendo células MV3 (5×10^5 células/grupo) previamente plaqueadas. Em dois grupos foram realizadas apenas a cultura de células MV3 (grupo controle e grupo tratado com $5 \mu\text{M}$ de ciclohexamida) e nos outros cinco grupos foram realizadas coculturas de MV3 com macrófagos que receberam diferentes estímulos. Os resultados representam média + erro padrão de três experimentos independentes. $*p \leq 0.05$.

3.13 Biodistribuição das VE liberadas na circulação de camundongos nude

De forma a investigar o sítio preferencial de alojamento das VE, realizamos experimentos *in vivo* envolvendo camundongos *nude*. Após a análise de diversos órgãos de animais injetados com VE radiomarcadas, observamos o seu acúmulo em órgãos como estômago, intestino delgado, rins, baço e pâncreas. Vimos que o maior acúmulo ocorreu no fígado (Fig. 23A), sendo maior que todos os outros órgãos. Como este sítio já era um local esperado, resolvemos excluí-lo da comparação (Fig. 23B).

Figura 23 – Biodistribuição das VE liberadas na circulação de camundongos *nude*



Legenda: Amostras de VE radiomarcadas com tecnécio foram injetadas via retro-orbital em camundongos *nude* com 8 semanas de idade, conforme descrito no item 2.15 da seção Material e Métodos. Após duas

horas, os animais foram sacrificados, os órgãos de interesse foram retirados e a estimativa de migração das VE foi realizada através do uso de um contador de raios gama. O gráfico representa o percentual médio de VE em cada órgão dos quatro animais utilizados.

3.14 Efeito das VE sobre a metástase do tumor primário e a polarização de macrófagos *in vivo*

De forma a investigar a contribuição das VE para a aceleração da metástase e polarização de macrófagos *in vivo*, investigamos o seu efeito em animais com tumores previamente estabelecidos (21 dias). Sabendo que o pulmão é um foco secundário comum de metástase de melanomas em pacientes (DAMSKY; ROSENBAUM; BOSENBERG, 2011) e que é comum a presença de macrófagos neste tecido, investigamos o perfil de polarização destas células após 28 dias, em animais que receberam ou não VE no 21º dia.

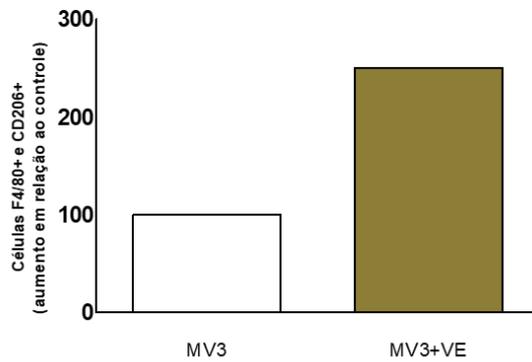
Observamos focos de metástase nos pulmões somente nos camundongos que receberam as VE após o estabelecimento dos tumores primários (Fig. 24A). Considerado que os tumores podem modular o fenótipo dos macrófagos, investigamos a expressão de marcadores M2 em macrófagos pulmonares. Nossos resultados demonstraram uma maior marcação positiva tanto para CD206 (Fig. 24B) quanto CD301 (Fig. 24C), nos macrófagos pulmonares de animais que receberam as VE no 21º dia, sugerindo que as VE contribuíram tanto para a metástase quanto para a maior polarização M2 dos macrófagos.

Figura 24 – Efeito das VE sobre a metástase do tumor primário e a polarização de macrófagos *in vivo*

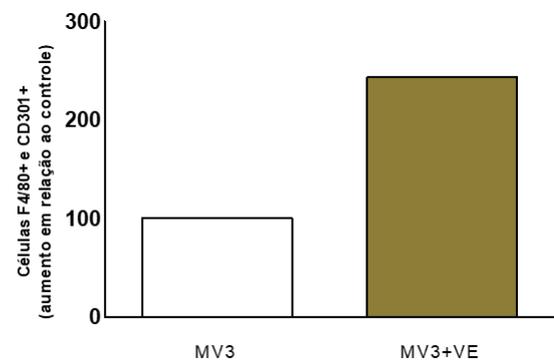
A.



B.



C.



Legenda: Macrófagos isolados do pulmão de camundongos *nude* foram lavados e incubados durante 20 minutos com anticorpos anti-F4/80 conjugado a APC, anti-CD206 conjugado a PE e anti-CD301 conjugado a PE-Cy7. A expressão destes três marcadores foi verificada por citometria de fluxo nos canais FL4, FL2 e FL3, respectivamente. Os eventos foram selecionados para F4/80 (determinação de macrófagos) e os eventos concomitantes para CD206 (B) e CD301 (C) foram quantificados. Os resultados representam a média de três animais.

DISCUSSÃO

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

Evidências mostram que o microambiente tumoral contém VE, secretadas abundantemente pelas células tumorais, podendo modular a fisiologia das células-alvo (RAK, 2010). Além disso, o número de publicações na última década focando no contexto tumoral cresceu exponencialmente, indicando um novo campo importante de pesquisa (TATISCHEFF, 2015). Vale ressaltar que este microambiente é dinâmico, e da mesma forma que VE liberadas por células tumorais podem agir autocrina ou paracrinamente em outros tipos celulares (além de caírem na circulação), VE de outras origens também podem atuar de forma semelhante.

Até o momento, alguns estudos investigaram os efeitos da interação entre VE de células tumorais com certos componentes do sistema imune, como a capacidade de indução de apoptose em linfócitos T CD8⁺ por VE liberadas por uma linhagem de câncer de próstata humano (ABUSAMRA et al., 2005), VE liberadas por linhagens de câncer colorretal humano (HUBER et al., 2005) e VE presentes no soro de pacientes com câncer bucal (KIM et al., 2005). Outros estudos mostraram a capacidade de VE de linhagens tumorais tanto de origem murina (câncer de mama) quanto humana (melanoma e câncer de mama) na inibição da proliferação de células NK (LIU et al., 2006). Também foi observada a indução da expansão e diferenciação de linfócitos T helper em linfócitos T regulatórios por VE isoladas de pacientes com câncer de ovário (SZAJNIK et al., 2010).

No entanto, existem poucos estudos elucidando em detalhes tal interação sobre a polarização componentes do sistema imune inato, como neutrófilos e macrófagos. Dados prévios de nosso grupo relacionaram os efeitos das vesículas de melanoma MV3 sobre neutrófilos humanos (dados não publicados). Observamos efeitos como quimiotaxia, produção de ROS, aumento da expressão gênica e proteica de marcadores moleculares pró-tumorais N2, bem como redução da citotoxicidade nestas células. Vale ressaltar que tais achados substanciaram nossa busca pela elucidação dos efeitos de tais VE sobre macrófagos humanos.

Já foi estabelecida, por exemplo, a capacidade de VE liberadas por células de melanoma na indução da produção de TGF- β por macrófagos em um modelo murino, mas apenas este

parâmetro de polarização foi explorado neste estudo (LIMA et al., 2009). Outro estudo explorou o perfil secretório de citocinas de macrófagos desafiados com VE liberadas por células de câncer colorretal, porém além de não se observar um padrão nesta modulação (foram utilizadas duas linhagens de câncer colorretal – SW480, que não induziu mudanças no perfil de citocinas M1 e M2 de macrófagos M0; e SW620, que teve efeito apenas sobre a secreção de IL-10), este estudo utilizou células THP-1 para diferenciação em macrófagos (POPËNA et al., 2018), uma linhagem celular imortalizada, derivada de leucemia monocítica aguda (TSUCHIYA et al., 1980), enquanto que no presente estudo utilizamos cultura primária.

Para abordarmos essa questão, estabelecemos um modelo *in vitro* de purificação de VE, produzidas a partir de células de melanoma MV3, com o objetivo de estudar sua interação com macrófagos. Por ser um modelo *in vitro* e os macrófagos não serem expostos a outros componentes normalmente presentes no microambiente tumoral, investigamos se as VE *per se* seriam capazes de polarizar os macrófagos em direção a um fenótipo tipo M2.

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

O protocolo de isolamento de VE utilizado neste estudo adota uma velocidade (100.000 x g), capaz de sedimentar tanto populações de VE maiores, como MP (entre 0.1 e 1 µm), quanto populações de VE menores, como Exo (menores que 0.1 µm). Identificamos tanto vesículas correspondendo ao tamanho de Exo, quanto MP as quais não são visualizadas por citometria (< 0.3 µm), através da microscopia Zetaview®. Nossa leitura por citometria de fluxo, através da marcação para anexina V, foi capaz de quantificar apenas MP (> 0.3 µm), já que os Exo possuem dimensões inferiores ao limite do citômetro. Além disso, através de *western blotting*, detectamos a presença de sitenina-1, marcador altamente enriquecido em exossomos (BAYETTI et al., 2012; IMJETI et al., 2017). Portanto, esperamos que os efeitos observados

tenham sido em decorrência dessas duas populações atuando em conjunto, e por isso resolvemos adotar o termo VE em nosso estudo.

Sabendo que as VE liberadas a partir do tumor podem alcançar a circulação (CASTELLANA; TOTI; FREYSSINET, 2010), nos perguntamos se nossas VE possuiriam propriedades capazes de gerar um gradiente quimiotático para macrófagos. Nossos resultados demonstraram um efeito dose-dependente, no qual a partir da proporção de 30% v/v, uma quantidade significativamente maior de monócitos migrava mais em comparação ao grupo de migração randômica, e que esse efeito é fosfatidilserina-dependente, uma vez que quando a mesma foi bloqueada por anexina-V bloqueadora, mesmo na maior proporção utilizada (50% v/v, no qual a taxa de monócitos migratórios foi de 2.2 vezes a do controle), esse efeito foi abolido. A fosfatidilserina vem sendo reportada como importante molécula para o papel pró-tumoral de VE tumorais. Foi mostrado em um estudo envolvendo o uso de VE isoladas tanto de fluidos de cistos ovarianos, quanto de tumores sólidos de pacientes com câncer de ovário que essas VE têm a capacidade de inibir a ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (vista pela translocação nuclear de NF- κ B) *in vitro*; e que a incubação prévia das VE com um anticorpo anti-fosfatidilserina reverteu esse efeito (KELLEHER et al., 2015). Em um modelo *in vitro* de melanoma murino o bloqueio da fosfatidilserina das VE através do uso de anexina V bloqueadora também mostrou reversão do efeito de indução da produção de TGF- β por macrófagos (LIMA et al., 2009).

Em estudos prévios de nosso grupo, desenvolvemos um modelo que nos permitiu observar que as VE na proporção de 10% v/v foram capazes de induzir diferenças nas respostas e perfis moleculares de neutrófilos (dados não publicados). Tendo em vista que um trabalho prévio de nosso grupo demonstrou que macrófagos são modulados pelo tratamento com 50% v/v de meio condicionado da célula tumoral (SIMÕES et al., 2017), adaptamos nossos ensaios a este modelo. A partir de então, observamos mudança no perfil molecular dos macrófagos, que aumentaram em mais de 200% a expressão de CD206, marcador molecular típico para fenotipar macrófagos M2, em sua membrana.

Além disso, observamos que as VE induziram uma secreção mista de marcadores M1 e M2 pelos macrófagos, embora tenhamos observado aumentos da ordem de 40 e 50 vezes para IL-10 e TGF- β , respectivamente, enquanto que para marcadores M1 estes números tenham sido bem menores, na faixa de aproximadamente 5 vezes para TNF- α . Relatos na literatura mostraram que VE de melanoma em modelos murinos induziram uma população mista de macrófagos (BARDI; SMITH; HOOD, 2018). Estudos com células de origem humana mostraram o papel dúbio que o TNF- α pode desempenhar na tumorigênese. Katerinaki e

colaboradores mostraram que o TNF- α pode estimular a invasão e migração de células de melanoma de forma concentração-dependente (KATERINAKI et al., 2003), enquanto que Gray-Schopfer e colaboradores mostraram que na presença de mutações no gene BRAF, o TNF- α pode conferir resistência à apoptose em células de melanoma em outro estudo *in vitro* (GRAY-SCHOPFER et al., 2007). Além disso, um estudo pré-clínico já associou a presença de maiores níveis desta citocina no plasma de pacientes com leucemia linfocítica crônica à piores prognósticos e taxas reduzidas de sobrevida (FERRAJOLI et al., 2002). Observamos efeitos semelhantes e em maior intensidade induzidos pelo MC, possivelmente devido a concentração de inúmeras moléculas produzidas pela célula tumoral. Portanto, ainda que esta citocina seja primariamente tratada como um marcador de macrófagos antitumorais M1, macrófagos modulados pelas VE liberadas por células de melanoma poderiam usá-la como ferramenta de suporte ao desenvolvimento tumoral.

Resultados de nosso microarranjo de DNA, demonstraram nos macrófagos o aumento tanto dos níveis de CCL3 (também chamada MIP-1 α), quanto de um de seus receptores, o CCR5 (MENTEN et al., 2002), pelo estímulo com VE. O eixo CCL3-CCR5 vem sido demonstrado como fator contribuinte à progressão tumoral em diversos tipos de câncer, como indução de osteoclastos por células de mieloma múltiplo (ABE et al., 2002), aumento da migração de células de condrossarcoma (HSU et al., 2013) ou promoção da angiogênese em células de osteosarcoma (LIAO et al., 2016). Além disso, a presença destes marcadores foi correlacionada a prognósticos desfavoráveis em pacientes com câncer de esôfago (KODAMA et al., 2020) e melanoma (LIU, J et al., 2019). Sabendo que as células tumorais podem liberar CCL3, esta poderia agir sobre macrófagos, atraindo-os para o foco tumoral através da ativação de CCR5. Uma vez no foco tumoral, os macrófagos poderiam estimular paracrinamente as células tumorais através da mesma via. Além disso, foi demonstrada a capacidade do organismo de liberar VE positivas para CCR5 em outras doenças inflamatórias como diabetes e que aumentos nesses níveis estavam correlacionados à severidade da doença (TOKARZ et al., 2019). Diante destas evidências, VE liberadas pelas células tumorais poderiam também estimular o aumento de CCR5 nos macrófagos mediante carreamento deste receptor. No entanto, maiores investigações precisariam ser realizadas para corroborar ou refutar esta hipótese.

Observamos também o efeito das VE sobre o aumento nos níveis de NRF2 em macrófagos. Estudos vem correlacionando a ativação de NRF2 à aquisição de características antiinflamatórias em macrófagos. No estudo de Kobayashi e colaboradores (2018) a indução da expressão gênica e proteica de IL-1 β , marcador próinflamatório M1, pelo tratamento com LPS/IFN- γ , foi inibida pelo uso concomitante de um ativador da via do NRF2 (dietilmaleato),

tanto em macrófagos murinos quanto humanos (células THP-1) (KOBAYASHI et al., 2016). No estudo de Liu J e colaboradores (2020), a utilização de compostos indutores de aterosclerose (chamados de bifênilos policlorados) induziu o aumento da expressão de CD163 e CD206 em macrófagos murinos, concomitantemente à ativação de NRF2 e aumento da expressão de HO-1 (um dos produtos *downstream* à ativação de NRF2) e esses efeitos foram anulados pelo nocaute de NRF2 (LIU, J et al., 2020). Além disso, Feng e colaboradores (2018) mostraram não apenas associação entre translocação nuclear de NRF2 à maiores níveis de HO-1 em macrófagos (derivados de THP-1) com características moleculares de fenótipo M2 (aumento da expressão de arginase, CD163 e VEGF), mas também a capacidade destes macrófagos em induzir a transição epitélio-mesênquima em um modelo *in vitro* de câncer hepático (FENG et al., 2018). A presença de NRF2 também vem sido correlacionada à progressão e à quimio- e rádio-resistência em diversos modelos de câncer humano ou murino, como pâncreas (CHIO et al., 2016) pulmão (JEONG et al., 2017) e hepático (ZAVATTARI et al., 2015). Por conta do aumento de NRF2 nas células tumorais e de seus efeitos deletérios, outra possibilidade seria o aumento desta molécula nos macrófagos via transferência por VE liberadas pelas células tumorais.

Outro dado interessante foi o aumento da expressão do fator de transcrição regulado por hipóxia, HIF-1 α , em macrófagos estimulados com as VE. A hipóxia tumoral é uma característica comumente associada a prognósticos ruins. No estudo de Zhang, Wei-Jie e colaboradores (2017), pacientes com tumores gástricos mais agressivos apresentaram alta expressão de HIF-1 α em análises histológicas e isso foi correlacionado à maior prevalência de macrófagos com características pró-tumorais (marcação positiva para CD163) nesses tecidos, e à menor taxa de sobrevivência desses pacientes (ZHANG, Wei-Jie et al., 2017). Guo e colaboradores (2016) também mostraram uma correlação positiva entre a presença de HIF-1 α e de TAM CD206⁺ em análises histológicas de pacientes com gliomas, e a presença desses marcadores tornava-se mais robusta com a progressão do tumor (GUO et al., 2016). Observações semelhantes também foram feitas em biópsias de melanoma metastático humanas, nas quais observou-se maior marcação de IL-10 e CD164, marcadores moleculares de macrófagos M2, em regiões de hipóxia nas quais havia alta expressão de HIF-1 α (Huber, R. et al., 2016).

Macrófagos com o perfil de ativação M1 produzem maiores níveis de ROS de forma a combater infecções ou mesmo tumores (SOLINAS et al., 2009). De forma interessante, observamos que os macrófagos estimulados com VE produziram, de forma semelhante ao estímulo M1, maiores níveis de ROS, porém não apresentaram citotoxicidade contra células

tumorais em cocultura. Kraaij e colaboradores (2010) demonstraram *in vitro* que macrófagos estimulados com M-CSF apresentaram a capacidade de inibir a ativação de linfócitos T, bem como a indução de linfócitos T regulatórios via produção de ROS, e que esse feito foi revertido pelo uso de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase (KRAAIJ et al., 2010), sugerindo que as ROS provenientes de macrófagos, dependendo do microambiente em que se encontram, possam ter um papel imunossupressor. Lin, X. e colaboradores (2013), por sua vez, mostraram que melanomas B16F10 de características mais metastáticas apresentavam níveis de ROS superiores ao melanoma de características menos invasivas, B16F1, e que essa relação se mantinha nos TAM isolados destes tumores (LIN, X. et al., 2013). Estas observações não são exclusivas de sistemas murinos, uma vez que elevados níveis de ROS vêm sendo documentados como parte da etiologia do melanoma em humanos (FRUEHAUF; TRAPP, 2008; JOOSSE et al., 2010). Por outro lado, não observamos aumento dos níveis de NO nos macrófagos estimulados com VE, sugerindo a não formação de peroxinitrito, espécie reativa altamente tóxica ao tumor (RAHAT; HEMMERLEIN, 2013), o que poderia estar correlacionado à ausência de citotoxicidade desses macrófagos contra células MV3 em cocultura.

Estudos mostram que durante o estabelecimento do tumor, monócitos circulantes podem ser recrutados para o foco tumoral. Neste caso, em estágios mais iniciais os macrófagos recém diferenciados (além dos que já estavam residentes no tecido) muitas vezes possuem o perfil M1. No entanto, com a progressão do tumor, a ativação de células M2 torna-se superior, e os macrófagos perdem a sua atividade citotóxica como um todo (SICA; MANTOVANI, 2012). Nossos resultados de viabilidade celular mostraram que os macrófagos modulados pela VE não interferiram na viabilidade da célula tumoral. A modulação de macrófagos M2 no microambiente tumoral como ferramenta de combate ao câncer tem sido um importante objeto de estudo (WEJKSZA; SZERSZEN, 2018). Uma vez que as VE derivadas de MV3 são capazes de polarizar macrófagos em direção a um fenótipo M2, sugerimos que a modulação das VE poderia ser inserida com o mesmo propósito.

Em nossos experimentos *in vivo*, observamos que quando VE liberadas por células MV3 são inoculadas na circulação de camundongos *nude*, ocorre um tropismo para órgãos como fígado, intestino, rins, baço e pâncreas. Takahashi e colaboradores demonstraram, através de técnicas de imagem *in vivo*, que VE liberadas por células de melanoma murino B16 acumularam-se no fígado, pulmão, rins e baço após uma hora de sua injeção através da veia caudal (TAKAHASHI et al., 2013), corroborando nossos achados. Ainda na mesma linha, Wiklander e colaboradores observaram maior acúmulo de VE no fígado 24 horas após a inoculação (WIKLANDER et al., 2014). Ao se utilizar outras vias de administração

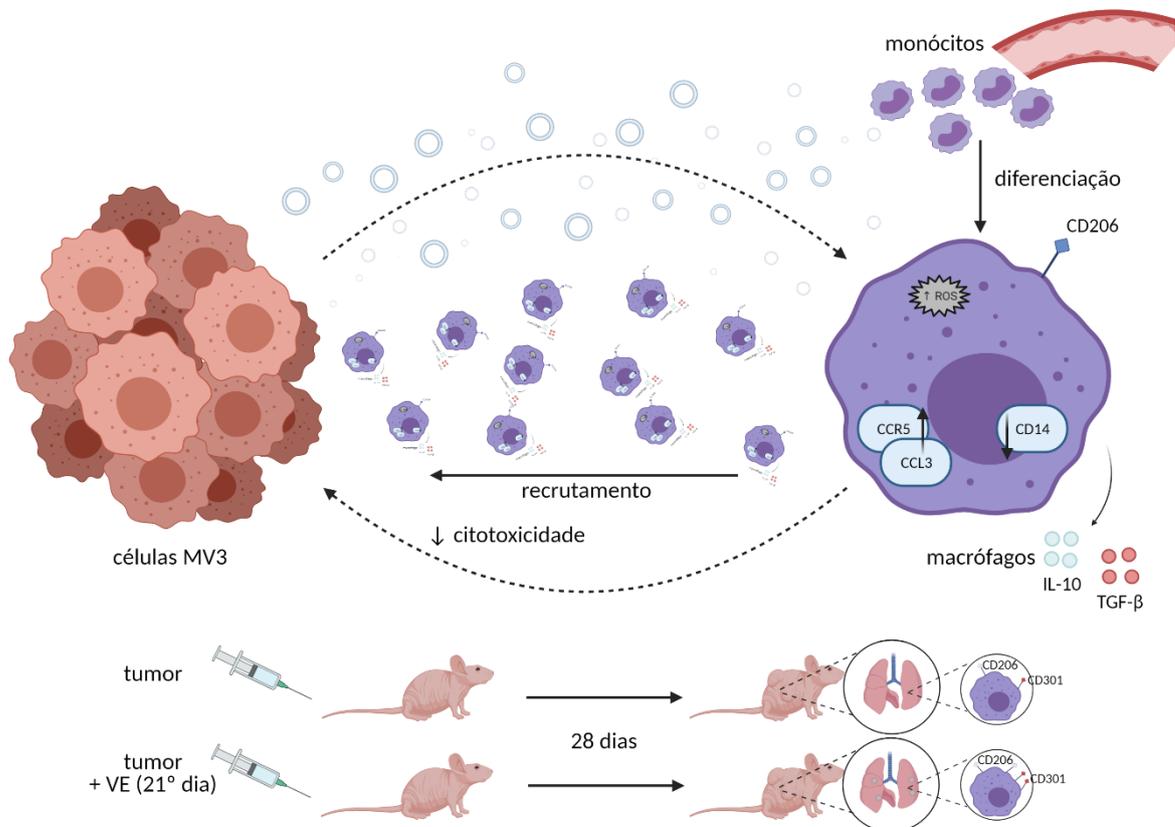
(intraperitoneal e subcutânea), além de VE provenientes de outros tipos celulares, o tropismo preferencial para o fígado se manteve, padrão preservado 48 horas após a inoculação (WIKLANDER et al., 2014). Em nosso modelo observamos este mesmo aspecto, ainda que o tempo de observação tenha sido menor.

A linhagem celular MV3 é originária de um paciente com melanoma primário nodular da região mentoniana que entrou em óbito 15 semanas após a excisão do tumor primário devido a metástases pulmonares (VAN MUIJEN et al., 1991). A inoculação prévia de células MV3 em camundongos *nude* levou ao aparecimento de metástases pulmonares após 8 semanas (VAN MUIJEN et al., 1991; SCHADENDORF et al., 1996). Vale ressaltar que em nosso modelo observamos metástase pulmonar, ao final de 28 dias, nos animais inoculados com VE no 21º dia, o que sugere o efeito potencializador das VE no estabelecimento e propagação tumoral. Além disso, poderia se sugerir que o aumento do fenótipo M2 observado nos macrófagos pulmonares após a inoculação das VE poderia potencializar o estabelecimento de metástases tumorais no órgão.

CONCLUSÃO

Os resultados presentes neste estudo mostraram que as VE liberadas por células de melanoma humano da linhagem MV3 são capazes de recrutar monócitos, além de alterar a biologia dos macrófagos. Os macrófagos passam a apresentar um perfil molecular diferenciado, expressando maiores quantidades de marcadores pró-tumorais M2 como CD206, IL-10 e TGF- β a nível proteico e outros como CCR5 e CCL3 a nível gênico. Os níveis de ROS dos macrófagos aumentam, porém sua produção de NO permanece em quantidades basais. Além disso, há uma maior atividade da arginase, além da diminuição do seu efeito citotóxico contra células MV3 em cocultura. Sugerimos também que as VE se dirigem para diversos órgãos e parecem contribuir ao estabelecimento de um sítio metastático pulmonar, além de acelerar a polarização pró-tumoral M2 de macrófagos neste tecido (Fig. 25).

Figura 25 – Esquema representativo de conclusão do estudo



Legenda: Esquema representativo de conclusão do estudo.

Fonte: O autor, 2021.

REFERÊNCIAS

- ABE, M. et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. **Blood**, v. 100, n. 6, p. 2195-2202, Sep 2002.
- ABUSAMRA, A.J. et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8⁺ T-cell apoptosis. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 35, n.2, p. 169-73, Sep-Oct 2005.
- ALLAVENA, P. et al. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. **Immunological Reviews**, v. 222, p. 155-61, Apr 2008.
- AUFFRAY, C., SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 669–692, 2009.
- AUFFRAY, C. et al. CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, p. 595–606, Mar 2009.
- BANDARCHI, B. et al. From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. **Dermatology Research and Practice**, v. 2010, Article ID 583748, 8 pages, Aug 2010.
- BARDI, G.T.; SMITH, M.A.; HOOD, J.L. Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization. **Cytokine**, v. 105, p. 63-72, May 2018.
- BAIETTI, M.F. et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 7, p. 677-685, Mar 2012.
- BERCKMANS, R.J. et al. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. **Blood**, v. 117, n. 11, p. 3172-3180, Mar 2011.
- BISWAS, S.K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 5, p. 585-600, Sep 2013.
- BURGER, D. et al. Microparticles: biomarkers and beyond. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 124, n. 7, p. 423-441, Apr 2013.
- CAMUS, S.M. et al. Erythrocyte microparticles can induce kidney vaso-occlusions in a murine model of sickle cell disease. **Blood**, v. 120, n.25, p. 5050-5058, Dec 2012.
- CASTELLANA, D.; TOTI, F.; FREYSSINET, J.M. Membrane microvesicles: Macromessengers in cancer disease and progression. **Trombosis Research**, v. 125, p. 84-88, Apr 2010.

- CERQUEIRA-COUTINHO et al. Comparison of biodistribution profile of monoclonal antibodies nanoparticles and aptamers in rats with breast cancer. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 598-601, May 2017.
- CHANDRASOMA, P.; TAYLOR, C.R. **Concise Pathology**, 3rd Edition, Appleton & Lange, 1998.
- CHARGAFF, E.; WEST, R. The Biological Significance of the Thromboplastic Protein of Blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 166, n.1, p. 189-197, Nov 1946.
- CHEN, G.Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews – Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826-837, Dec 2010.
- CHEN, J; ZHANG, Z; CAI, L. Diabetic Cardiomyopathy and Its Prevention by Nrf2: Current Status. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 38, n. 5, p. 337-45, Oct 2014.
- CHIO et al. NRF2 Promotes Tumor Maintenance by Modulating mRNA Translation in Pancreatic Cancer. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 963-976, Aug 2016.
- CIVETTA, M.T.M.; CIVETTA, J.D. Carcinogénesis, **Salud Publica de Mexico**, v. 53, n. 5, p. 405-414, Sep-Oct 2011.
- COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELSOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 43-51, Feb 2009.
- CORRALIZA, I.M et al. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **Journal of Immunological Methods**, v. 174, p.231-235, Sep 1994.
- COSCIA, M. et al. Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 12, p. 2803-2815, Dec 2010.
- COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, Dec 2002.
- CROS, J. et al. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. **Immunity**, v. 33, p. 375–386, Sep 2010.
- DAMSKY, W.E.; ROSENBAUM, L.E.; BOSENBERG, M. Decoding Melanoma Metastasis. **Cancers (Basel)**, v. 3, n. 1, p. 126–163, Mar 2011.
- DE-BRITO et al. Lipoxin-Induced Phenotypic Changes in CD115⁺ LY6C^{hi} Monocytes TAM Precursors Inhibits Tumor Development. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 540, Jun 2019.
- FENG, R. et al. Nrf2 activation drive macrophages polarization and cancer cell epithelial-mesenchymal transition during interaction. **Cell Communication and Signaling**, v. 16, n. 1, p. 54, Sep 2018.

FERRAJOLI, A. et al. The clinical significance of tumor necrosis factor- plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 100, n. 4, p. 1215-1219, Aug 2002.

FRUEHAUF, J.P.; TRAPP, V. Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma? **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 8, n. 11, p. 1751-1757, Nov 2008.

GAZZANIGA, S. et al. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 8, p. 2031-2041, Aug 2007.

GEISSMANN, F.; JUNG, S; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, p. 71–82, Jul 2003.

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

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews – Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, Jan 2003.

GRAY-SCHOPFER, V.C. et al. Tumor necrosis factor-alpha blocks apoptosis in melanoma cells when BRAF signaling is inhibited. **Cancer Research**, v. 67, n. 1, p. 122-129, Jan 2007.

GUO et al. Hypoxia promotes glioma-associated macrophage infiltration via periostin and subsequent M2 polarization by upregulating TGF-beta and M-CSFR. **Oncotarget**, v. 7, n. 49, p. 80521-80542, Dec 2016.

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

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

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

HUBER, R. et al. Tumour hypoxia promotes melanoma growth and metastasis via High Mobility Group Box-1 and M2-like macrophages. **Scientific Reports**, v. 18, n. 6, p. 29914, Jul 2016.

HUBER, V. et al. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. **Gastroenterology**, v. 128, p. 1796–804, Jun 2005.

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

HSU, Chin-Jung et al. AMP-activated protein kinase activation mediates CCL3-induced cell migration and matrix metalloproteinase-2 expression in human chondrosarcoma. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, n. 68, Sep 2013.

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

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

IMJETI, N.S. et al. Syntenin mediates SRC function in exosomal cell-to-cell communication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 47, p. 12495-12500, Nov 2017.

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

JEONG, Y. et al. Role of KEAP1/NRF2 and TP53 Mutations in Lung Squamous Cell Carcinoma Development and Radiation Resistance. **Cancer Discovery**, v. 7, n. 1, p. 86-101, Jan 2017.

JIA, T. et al. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.:1950)**, v. 180, p. 6846–6853, May 2008.

JOOSSE, A. Reactive oxygen species and melanoma: an explanation for gender differences in survival? **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 23, n. 3, p. 352-364, Jun 2010.

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

KATERINAKI, E. et al. TNF-alpha increases human melanoma cell invasion and migration in vitro: the role of proteolytic enzymes. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 6, p. 1123-1129, Sep 2003.

KELLEHER, R.J. Jr. et al. Extracellular Vesicles Present in Human Ovarian Tumor Microenvironments Induce a Phosphatidylserine-Dependent Arrest in the T-cell Signaling Cascade. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 11, p. 1269-78, Nov 2015.

KIM, J.W. et al. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 3, p.1010-20, Feb 2005.

KOBAYASHI, E.H. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. **Nature Communications**, v. 7, p. 11624, May 2016.

- KODAMA, T. et al. CCL3-CCR5 axis contributes to progression of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and invasion via Akt and ERK pathways. **Laboratory investigation, a journal of technical methods and pathology**, v. 100, n. 9, p. 1140-1157, Sep 2020.
- KOWAL, J.; Tkach, M.; Théry, C. Biogenesis and secretion of exosomes. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 29, p. 116-125, Aug 2014.
- KRAAIJ, M.D. et al. Induction of regulatory T cells by macrophages is dependent on production of reactive oxygen species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 10, n. 41, p. 17686-17691, Oct 2010.
- KUBICA, A.W.; BREWER, J.D. Melanoma in Immunosuppressed Patients. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 87, n. 10, p. 991-1003, Oct 2012.
- KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A. **Robbins and Cotran – Pathologic Basis of Disease**, 8th Edition. Saunders Company, 2010.
- LIAO, Yuan-Ya et al. CCL3 promotes angiogenesis by dysregulation of miR-374b/ VEGF-A axis in human osteosarcoma cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 4, p. 4310-4325, Jan 2016.
- LEON, B.; ARDAVIN, C. Monocyte migration to inflamed skin and lymph nodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. **Blood**, v. 111, p. 3126–3130, Mar 2008.
- LIMA, L.G. et al. Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. **Cancer Letters**, v. 283, n. 2, p. 168-75, Oct 2009.
- LIN, J.Y.; FISHER, D.E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843-850, Feb 2007.
- LIN, X. et al. Oxidative stress in malignant melanoma enhances tumor necrosis factor- α secretion of tumor-associated macrophages that promote cancer cell invasion. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 12, p. 1337-1355, Oct 2013.
- LIU, C. et al. Murine Mammary Carcinoma Exosomes Promote Tumor Growth by Suppression of NK Cell Function. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.:1950)**, v. 176, n. 3, p. 1375-85, Feb 2006.
- LIU, J et al. High expression of CCR5 in melanoma enhances epithelial-mesenchymal transition and metastasis via TGF β 1. **The Journal of Pathology**, v. 247, n. 4, p. 481-493, Jan 2019.
- LIU, J. et al. Polychlorinated biphenyl quinone promotes macrophage polarization to CD163⁺ cells through Nrf2 signaling pathway. **Environmental Pollution**, v. 257, p. 113587, Feb 2020.
- MAHABELESHWAR, G.H.; BYZOVA, T.V. Angiogenesis in melanoma. **Seminars in Oncology**, v. 34, n. 6, p. 555-565, Dec 2007.

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

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 2, p. 231–237, Apr 2010.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **The Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 176–185, Jan 2013.

MENTEN, P. et al. Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 6, p. 455-481, Dec 2002.

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

MURRAY, P.J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, Jul 2014.

NOVAK, M.L.; KOH, T.J. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 5, p. 1352–1363, Nov 2013.

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

POPENA, I. et al. Effect of colorectal cancer-derived extracellular vesicles on the immunophenotype and cytokine secretion profile of monocytes and macrophages. **Cell Communication and Signaling**, v. 16, n. 1, p. 17, Apr 2018.

RAHAT, M.A.; HEMMERLEIN, B. Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. **Frontiers in Physiology**, v. 4, n. 144, Jun 2013.

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

RONDON, A.M.R. et al. Tissue factor mediates microvesicles shedding from MDA-MB-231 breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 502, n. 1, p. 137-144, Jul 2018.

RÓSZER, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators of Inflammation**, p. 816460, May 2015.

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

SAWA-WEJKSZA, K.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M. Tumor-Associated Macrophages as Target for Antitumor Therapy. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 66, n. 2, p. 97-111, Apr 2018.

- SCHADENDORF, D. et al. Metastatic potential of human melanoma cells in nude mice characterisation of phenotype, cytokine secretion and tumour-associated antigens. **British Journal of Cancer**, v.74, n. 2, p. 194-199, Jul 1996.
- SCHIMKE, R.T. **Methods in Enzymology**, v. 17, p. 313, 1970.
- SCHREIBER, R.D.; OLD, L.J.; SMYTH, M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, Mar 2011.
- SHI, C.; PAMER, E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature Reviews – Immunology**, v. 11, n. 11, p. 762-74, Oct 2010.
- SHIFRIN, D.A. et al. Extracellular vesicles: communication, coercion and conditioning. **Molecular biology of the cell**, v. 24, n. 9, p. 1253-1259, May 2013.
- SHIMURA, S. et al. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. **Cancer Research**, v. 60, n. 20, p. 5857-5861, Oct 2000.
- SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 787–795, Mar 2012.
- SICA, A. et al. Macrophage polarization in pathology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 21, p. 4111-4126, Jul 2015.
- SIMÕES, R.L. et al. Lipoxin A4 selectively programs the profile of M2 tumor-associated macrophages which favour control of tumor progression. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 2, p. 346-357, Jan 2017.
- SINGH, S. et al. Initiative action of tumor-associated macrophage during tumor metastasis. **Biochimie Open.**, v. 4, p. 8-18, Jun 2017.
- SIONOV, R.V.; FRIDLENDER, Z.G.; GRANOT, Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. **Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society**, v. 8, n. 3, p. 125-158, Jun 2014.
- SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 5, p. 1065-1073, Nov 2009.
- STEIDL, C. et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 10, p. 875-885, Mar 2010.
- SWANN, J.B.; SMYTH, M.J. Immune surveillance of tumors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1137-1146, May 2007.
- SZAJNIK, M. et al. Tumor-Derived Microvesicles Induce, Expand and Up-Regulate Biological Activities of Human Regulatory T Cells (Treg). **PLoS One**, v. 22, n. (7), p. e11469, Jul 2010.

TAKAHASHI Y. et al. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. **Journal of Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 77-84, May 2013.

TASKINEN, M. et al. A high tumor associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 19, p. 5784-9, Oct 2007.

TATISCHEFF, I. Cell-derived Extracellular Vesicles Open New Perspectives for Cancer Research. **Cancer Research Frontiers**, v. 1, n.2, p. 208-224, Apr 2015.

TEDDER, T.F.; STEEBER, D.A.; PIZCUETA, P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181, p. 2259–2264, Jun 1995.

TOKARZ, A. et al. Retinopathy severity correlates with RANTES concentrations and CCR 5-positive microvesicles in diabetes. **Folia Medica Cracoviensia**, v. 59, n. 3, p. :95-112, 2019.

TSOU, C. L. et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 902–909, Apr 2007.

TSUCHIYA, S. et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **International Journal of Cancer**, v. 26, n. 2, p. 171-176, Aug 1980.

UENO, T. et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 6, n. 8, p. 3282-9, Aug 2000.

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

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

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

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

WIKLANDER, O.P. et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined

by cell source, route of administration and targeting. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, p. 26316, Apr 2015.

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

ZAVATTARI, P. et al. Nrf2, but not β -catenin, mutation represents an early event in rat hepatocarcinogenesis. **Hepatology**, v. 62, n. 3, p. 851-862, Sep 2015.

ZHANG, G. et al. Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 16, n. 13, p. 3420-3430, Jul 2010.

ZHANG, Q.W. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e50946, Dec 2012.

ZHANG, Wei-Jie et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha Correlates with Tumor-Associated Macrophages Infiltration, Influences Survival of Gastric Cancer Patients. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 10, p. 1818-1825, Jul 2017.

ZHANG, X. et al. Hydrazinocurcumin Encapsuled nanoparticles "re-educate" tumor-associated macrophages and exhibit anti-tumor effects on breast cancer following STAT3 suppression. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65896, Jun 2013.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood** v. 116, p. e74–e80, Oct 2010.