

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA  
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**INFLUÊNCIA DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES  
LIBERADAS POR CÉLULAS DE MELANOMA NA  
CAPACIDADE FUNCIONAL E NO METABOLISMO DA  
GLICOSE DE MACRÓFAGOS MURINOS – ESTUDO *IN  
VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

**THIAGO ALBUQUERQUE VIRAÇÃO**

**SÃO PAULO**

**2022**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA  
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**INFLUÊNCIA DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES  
LIBERADAS POR CÉLULAS DE MELANOMA NA  
CAPACIDADE FUNCIONAL E NO METABOLISMO DA  
GLICOSE DE MACRÓFAGOS MURINOS – ESTUDO *IN  
VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: profa. Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado.

**THIAGO ALBUQUERQUE VIRAÇÃO**

**SÃO PAULO**

**2022**

Viração, Thiago Albuquerque.

Influência das vesículas extracelulares liberadas por células de melanoma na capacidade funcional e no metabolismo da glicose de macrófagos murinos - estudo *in vitro* / Thiago Albuquerque Viração. – 2022.

65 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Biologia da Diferenciação e Transformação Celular: Modulação por Fatores Endógenos e Exógenos

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

**THIAGO ALBUQUERQUE VIRAÇÃO**

**INFLUÊNCIA DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES  
LIBERADAS POR CÉLULAS DE MELANOMA NA  
CAPACIDADE FUNCIONAL E NO METABOLISMO DA  
GLICOSE DE MACRÓFAGOS MURINOS – ESTUDO *IN*  
*VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: profa. Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Anuska Marcelino Alvares Saraiva  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Anete Lallo  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Patrícia Xander Batista  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Juan Sebastián Henao Agudelo  
Unidad Central del Valle del Cauca

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista pela oportunidade da realização do doutorado e à todo o corpo docente por todo o conhecimento proporcionado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP) pela bolsa de estudos.

À Profa. Dra. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado por toda sua dedicação na orientação e desenvolvimento deste trabalho, da idealização à sua concretização e por todo o aprendizado a cada dia.

À Profa. Dra. Anuska Marcelino Alvares Saraiva, pela colaboração na parte teórica e experimental para o desenvolvimento do trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia Xander pela colaboração necessária para o desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Sandra Kalil Perdomo pelo auxílio nas etapas experimentais desenvolvidas ao longo da pesquisa

Aos funcionários do laboratório Suzana Maria Bezerra, Cleide Marques da Silva Santana, pelo auxílio recebido ao longo da pós-graduação.

## RESUMO

Diversos estudos exploram o papel de vesículas extracelulares (EVs) em tumores devido ao seu conteúdo, que reflete a natureza de suas células produtoras, e por sua importância na comunicação intercelular. Entretanto, os efeitos de EVs na capacidade funcional das células do sistema imune não estão completamente elucidadas. Assim, o intuito do presente trabalho foi avaliar a influência de EVs liberadas por células de melanoma murino no metabolismo e capacidade funcional de macrófagos indiferenciados. Para isto, EVs liberadas por células de melanoma murino B16F10 (EVs-mel) foram caracterizadas e utilizadas em ensaios *in vitro* com macrófagos primários obtidos após diferenciação de precursores medulares de camundongos C57BL/6. Resultados obtidos no presente estudo e apresentados em formato de artigo que será submetido ao periódico *Frontiers in Cell and Developmental Biology* mostraram que macrófagos cultivados com diferentes concentrações de EVs-mel tiveram maior captação de glicose, aumento de expressão de iNOS, maior produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, porém sem diferenças significativas na sua capacidade fagocítica. Dados preliminares também sugerem aumento da produção de ROS em macrófagos tratados com 7,5  $\mu$ g/mL de EVs. Em conjunto, dados aqui apresentados mostram que macrófagos primários cultivados com EVs-mel apresentam perfil de ativação mais compatível com macrófagos M1 ou de perfil inflamatório. Estes achados são relevantes e fornecem novas informações sobre o efeito de EVs derivadas de células tumorais e seu possível papel modulador para explorar o desenvolvimento de terapias anticâncer.

**Palavras-chave:** Câncer de pele, células B16F10, exossomos, glicose, perfil inflamatório.

## ABSTRACT

Many studies seek to explore the role extracellular vesicles (EVs) play in tumors due to the nature of their producing cells, as well as the importance they have in intercellular communication. However, the effects EVs exercise on the functional capability of the immune system's cells are not completely elucidated. Therefore, this study aims at evaluating the influence EVs from murine melanoma cells have on the metabolism and functional capacity of undifferentiated macrophages. To do so, EVs released by B16F10 melanoma murine cells (EVs-mel) were characterized and in vitro assays were performed with primary macrophages obtained from C57BL/6 mice medullary precursors after differentiation. Results obtained in this study demonstrate that macrophages cultivated with different concentrations of EVs-mel had greater glucose uptake, increased expression of iNOS and IL10, significant increase in the production of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10, however no significant differences of its phagocytic capability were obtained. These results are being presented in paper format and are being submitted to the journal *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Preliminary data also suggests an increase of the ROS production in macrophages that were treated with 7,5  $\mu\text{g/mL}$  of EVs. Data presented in this study shows that primary macrophages treated with EVs-mel tend to present an activation profile more compatible with M1 macrophages, or of inflammatory profile. Thus, these findings are relevant and offer new information on the effect of EVs derived from tumor cells and their likely modulator role in the development of anticancer therapies.

**Key words:** Skin Cancer, B16F10 cells, exosomes, glucose, inflammatory profile.

## SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA .....	8
1.1 Melanoma .....	8
1.2 Microambiente e progressão tumoral .....	9
1.3 Vesículas extracelulares e melanoma.....	10
1.4 Macrófagos .....	12
1.5 Metabolismo de macrófagos .....	15
REFERÊNCIAS .....	17
2. Artigo - Periódico para submissão: <i>Frontiers in Cell and Developmental Biology</i> .	25
INTRODUÇÃO .....	26
MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
Cultura de células B16F10.....	27
Obtenção e caracterização das vesículas extracelulares .....	27
Avaliação da viabilidade pelo método de exclusão por <i>Trypan Blue</i> .....	28
Análises de células viáveis e não viáveis pela expressão de 7AAD/Anexina .....	28
Cultura de células L929 .....	28
Obtenção de células de medula óssea e diferenciação em macrófagos .....	28
Análise do percentual de diferenciação .....	29
Tratamento de BMDM com EVs .....	29
Ensaio de fagocitose.....	30
Coloração de Giemsa .....	30
Determinação do perfil de ativação de BMDM após tratamento com EVs.....	30
<i>Glucose Uptake</i> .....	31
Análise de citocinas por CBA ( <i>Cytometric Bead Array</i> ).....	31
Quantificação dos níveis de NO e ROS intracelular.....	31
Análise Estatística.....	31
RESULTADOS .....	32
Padronização dos tempos de cultura para coleta de vesículas extracelulares liberadas por células B16F10.....	32
Sobrenadantes de células B16F10 coletados após 48 horas de cultura apresentaram maiores concentrações de partículas e proteica .....	32
Caracterização fenotípica de macrófagos após tratamento com EVs de células B16F10 coletadas após 48 horas em cultura.....	35



EVs derivadas de células B16F10 após 48 horas em cultura não influenciam na fagocitose de BMDMs .....	39
EVs derivadas de células B16F10 coletadas após 48 horas de cultura aumentam produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em BMDMs .....	41
Tratamento com concentrações maiores de EVs tendem a aumentar a produção de ROS intracelular e óxido nítrico em BMDMs.....	44
BMDMs tratados com EVs liberadas por células B16F10 tiveram maior captação de glicose.....	47
DISCUSSÃO .....	49
CONCLUSÕES .....	53
REFERÊNCIAS.....	54
FIGURAS SUPLEMENTARES.....	62
ANEXOS .....	65

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Melanoma

O melanoma é uma neoplasia que se origina da transformação maligna de melanócitos, células produtoras de melanina, responsáveis pela pigmentação e proteção da pele contra danos causados pela radiação ultravioleta (UV) (BIAN et al., 2021; TURNER; WARE; BOSENBERG, 2018). Embora a pele seja o local de maior ocorrência da doença (melanoma cutâneo), pode também ocorrer em outros locais onde os melanócitos estão presentes como: olhos, mucosa gastrointestinal, genitais, sistema urinário e meninges (ACIKALIN et al., 2020; HEISTEIN; ACHARYA, 2021; KAHL et al., 2021; SAYAN et al., 2020; WOHLMUTH et al., 2020).

O desenvolvimento da doença é multifatorial, decorrente da interação entre exposição ambiental e fatores genéticos, sendo o principal fator de risco para seu desenvolvimento, a exposição excessiva desprotegida à radiação ultravioleta (UV) proveniente do sol, capaz de levar a alterações no DNA que podem gerar desregulação no ciclo celular ocasionando a perda no controle de proliferação (LASKAR et al., 2020; DZWIERZYNSKI, 2021).

A doença se manifesta pelo surgimento de lesões pigmentadas ou pela alteração no tamanho, forma e cor de nevos pré-existentes (HEISTEIN; ACHARYA, 2021). Estas lesões apresentam características classificadas de acordo com o padrão "ABCDE": A: Assimetria; B: Bordas irregulares; C: Cor de diferentes tonalidades; D: Diâmetro maior que 6 mm; e E: Evolução no tamanho, forma e cor (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020). Lesões na cabeça, pescoço e extremidades geralmente são associadas à exposição crônica e lesões tronculares por sua vez, associam-se a exposição intermitente e intensa, sendo esta associada ao maior risco, acompanhada de história de queimadura solar na infância (RASTRELLI et al., 2014).

Em números gerais, o melanoma representa 5% dos diagnósticos de câncer em homens e 4% em mulheres, ocupando respectivamente, a quinta e sétima neoplasia maligna mais diagnosticada (HEISTEIN; ACHARYA, 2021). O Brasil, país de grandes dimensões, com clima tropical e de território localizado principalmente em baixas latitudes com alta incidência de radiação UV, apresenta dados expressivos da

doença, onde de acordo com últimos dados de estimativas elaborados pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer), no ano de 2020 foram estimados 4200 homens e 4250 mulheres sendo diagnosticados com a doença (INCA, 2020).

Quando diagnosticado no estágio inicial apresenta prognóstico favorável, com taxa de sobrevida relativa em cinco anos de 97% (HEISTEIN; ACHARYA, 2021). No entanto apresenta uma taxa de sobrevida de 10% quando diagnosticado no estágio mais avançado, principalmente devido a sua elevada capacidade metastática e resistência à maioria das terapias convencionais (HEISTEIN; ACHARYA, 2021; TURNER; WARE; BOSENBERG, 2018).

## **1.2 Microambiente e progressão tumoral**

A metástase é determinante para a evolução do câncer e é a principal causa de morte relacionada ao melanoma (RAMBOW; MARINE; GODING, 2019). É decorrente de um processo complexo e multifatorial que envolve a invasão da matriz extracelular e estroma, rompendo a membrana basal adjacente ao tumor, invasão da circulação sanguínea e linfática que permitem que estas células tumorais alcancem órgãos distantes, fuga de mecanismos de defesa do sistema imunológico permitindo a sua sobrevivência em novos ambientes e proliferação celular tumoral distantes do local de origem (SENGA; GROSE, 2021). Para que estes eventos ocorram, células tumorais sofrem diversas alterações, como a perda de adesão ao tumor primário, alterações no citoesqueleto e modificações metabólicas que permitam sua sobrevivência na circulação e sua instalação em um novo ambiente (ZEESHAN; MUTAHIR, 2017). Este processo resulta na maior dificuldade no controle e cura da doença, principalmente quando o diagnóstico ocorre tardiamente, uma vez que leva à sua disseminação (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016).

A intensa comunicação entre matriz extracelular onde o tumor se desenvolve, células tumorais, e células residentes e infiltrantes no tumor regulam as suas características, influenciando na proliferação, diferenciação e progressão do melanoma (PASSARELLI et al., 2017; TUCCI et al., 2019). Dentre as células não tumorais que compõem o microambiente estão células constituintes do tecido, células endoteliais e diversas células que integram o sistema imunológico, como macrófagos,

neutrófilos, linfócitos T e B, células *natural killers*, células dendríticas, entre outras (SIMICZYJEW et al., 2020). Algumas células imunológicas presentes neste microambiente apresentam funções dicotômicas, oferecendo respostas antitumorais eficientes, podendo também atuar na progressão tumoral, como por exemplo ocorre com macrófagos e neutrófilos (LIM; XU; LAN, 2019; OHMS; MÖLLER; LASKAY, 2020). Neste contexto, a inflamação crônica gerada pelo acúmulo de células inflamatórias no microambiente tumoral atua de forma a contribuir com a proliferação e sobrevivência de células malignas, angiogênese, metástase, fuga de mecanismos da resposta imune e redução da resposta à terapias (MANTOVANI; GARLANDA; ALAVENA, 2020).

Este *crosstalk* pode ocorrer tanto pelo contato direto entre as células, quanto pela produção de fatores solúveis que atuam na sinalização e comunicação intercelular (AHMED; HAASS, 2018; BRANDNER; HAASS, 2013). Entre os elementos secretados destacam-se as citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, metaloproteinases de matriz e vesículas extracelulares (MORO; MAUCH; ZIGRINO, 2014; TURNER; WARE; BOSENBERG, 2018b).

### **1.3 Vesículas extracelulares e melanoma**

Nos últimos anos diversos estudos têm explorado o papel das vesículas extracelulares (EVs) como mediadores importantes na comunicação intercelular no microambiente tumoral (HOU; CHEN, 2021). As EVs são partículas produzidas naturalmente por quase todas as células, vivas ou em processo de morte, liberadas para o meio extracelular em diversos processos fisiológicos e patológicos (GIACOBINO et al., 2021). Apresentam formato esférico e são delimitadas por bicamada lipídica, sem presença de núcleo funcional (THÉRY et al., 2018). Em geral as EVs são classificadas de acordo com sua formação, tamanho e função, principalmente em exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (CHEN; LARREGINA; MORELLI, 2019; ZABOROWSKI et al., 2015; ZHOU et al., 2021).

Os exossomos são descritos na literatura como vesículas menores, com tamanho entre 30 e 100 nm, originados na rede endossômica e liberados para o meio extracelular após fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática.

(YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). As microvesículas são maiores que os exossomos, com tamanhos até 1000 nm, originadas pelo brotamento da membrana plasmática (RAPOSO; STORVOGEL, 2013). Já os corpos apoptóticos são liberados após fragmentação celular durante a apoptose, geralmente apresentando tamanhos maiores que 1000 nm (BARROS et al., 2018).

As EVs contêm moléculas bioativas como DNA, RNA, proteínas e lipídios, derivados da sua célula originária que, quando liberadas para o meio extracelular, podem transferir seu conteúdo para outras células, podendo alterar seu fenótipo e função (DOYLE; WANG, 2019; KALRA; DRUMMEN; MATHIVANAN, 2016). Além disso, EVs estão presentes em diversos fluidos biológicos, tais como sangue, saliva, urina, líquido amniótico, leite materno, líquido cefalorraquidiano e líquido sinovial, o que contribui para sua importância biológica no transporte de moléculas (GIACOBINO et al., 2021).

Uma vez que as EVs refletem o conteúdo de suas células produtoras, proteínas tumorais, genes e miRNAs podem ser identificados nas EVs obtidas de amostras de sangue de pacientes com melanoma, permitindo analisar o conteúdo molecular do tumor de forma menos invasiva (BOLLARD et al., 2020; CLARK et al., 2020; SHI et al., 2020). Por essa razão, a maioria dos estudos sobre EVs produzidas por células de melanoma avaliam seu potencial como biomarcadores prognósticos e preditivos, correlacionando o conteúdo das EVs com resultados clínicos (XIONG et al., 2020; CLARK et al., 2020; BIAHIONI et al., 2021; LUAN et al., 2021; PIETROWSKA et al., 2021; PORCELLI et al., 2021).

Devido a sua capacidade no transporte de moléculas, estudos têm investigado o potencial das EVs na terapia direcionada, explorando o seu potencial imunogênico na imunoterapia, para o desenvolvimento de vacinas contra o tumor (HORREVORTS et al., 2019; JELLA et al., 2020; LABANI-MOTLAGH et al., 2021; LARA et al., 2020). Em contraste ao anterior, diversos autores têm demonstrado que exossomos liberados por células tumorais, podem favorecer o desenvolvimento de metástases por criar as condições favoráveis para desenvolvimento em locais distantes do tumor primário (DASSLER-PLENKER; KÜTTNER; EGEBLAD, 2020). Assim, EVs podem mediar a reprogramação de células progenitoras da medula óssea para fenótipo pró-vascular e indução de genes pró-angiogênicos e inflamatórios e, a expressão de

metaloproteinases de matriz (MMPs) que favorecem a formação do nicho adequado para o desenvolvimento de tumores secundários principalmente em linfonodos, encéfalo e pulmão (DASSLER-PLENKER; KÜTTNER; EGEBLAD, 2020; LAHAV et al., 2019; HOOD, 2019; HOOD; SAN ROMAN; WICKLINE, 2011; MANNAVOLA et al., 2020; WHITEHEAD et al., 2015). Esta influência em diversos microambientes é sustentada pelo perfil proteômico, expressão gênica e presença de diversos miRNAs, capazes de modular sinalização intracelular e fenótipo de vários tipos celulares que são frequentemente associados a progressão tumoral (PIETROWSKA et al., 2021).

Nesse contexto, estudos mostram que EVs liberadas por células de melanoma podem influenciar no fenótipo de diversas células efetoras do sistema imunológico, contribuindo para a evasão imune (CHEN et al., 2018; FLEMING et al., 2019; GUIMARÃES-BASTOS et al., 2021; SHARMA et al., 2020; SHU et al., 2020; VIGNARD et al., 2020). Células T CD8 podem ser suprimidas pela ação de EVs contendo PD-L1 em sua superfície (CHEN et al., 2019). EVs de melanoma podem expandir populações de células supressoras como células T regulatórias (Treg) e mieloides e promover apoptose de células T CD4 (TUCCI et al., 2018; ZHOU et al., 2018). Células *natural killer* podem ter suas funções efetoras suprimidas e neutrófilos podem ser direcionados para um fenótipo pró-tumoral (TUCCI et al., 2018; GUIMARÃES-BASTOS et al., 2021). De uma maneira geral, células do sistema imunológico regulam fortemente o comportamento do tumor, tendo grande destaque o papel dos macrófagos. Já foi demonstrado que EVs produzidas por células de melanoma são capazes de influenciar na polarização de macrófagos RAW 264.7 (BARDI et al., 2018).

#### **1.4 Macrófagos**

A principal característica do macrófago relatada por Metchnikoff em sua descoberta foi a fagocitose, englobando agentes patogênicos e inicialmente foi descrito como um componente importante da imunidade inata (LOCATI et al., 2020). Diversas funções foram atribuídas aos macrófagos nas últimas décadas, mostrando que estas células possuem funções muito mais complexas. O macrófago possui grande importância na imunidade inata, uma vez que apresenta em sua membrana

celular, citoplasma e compartimento endossomal diversos receptores da imunidade inata, tais como diversos receptores do tipo Toll (do inglês: *Toll like Receptors*), inflamassomas e receptores do tipo lecitina (MOLGORA et al., 2018). Também possui grande interação com outros componentes celulares da imunidade inata como neutrófilos e células NK (MOLGORA et al., 2018). Desta forma atua combatendo microrganismos patogênicos ou células tumorais, e participam da regulação homeostática, uma vez que podem eliminar células apoptóticas e atuar na remodelação tecidual (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). Também auxiliam a imunidade adaptativa, visto que atuam na apresentação de antígenos aos linfócitos e produzem citocinas que podem influenciar em suas respostas (COVARRUBIAS et al., 2013).

Uma das principais características dos macrófagos é sua alta plasticidade, com seu fenótipo influenciado pelo microambiente e pelos estímulos pelos quais a célula é ativada (VAN OVERMEIRE et al., 2014; WILLIAMS; YEH; SOLOFF, 2016). A sua plasticidade é importante no controle da homeostase, uma vez que pode mudar seu perfil de resposta de acordo com a sua necessidade (LIU et al., 2015). Tradicionalmente os macrófagos são classificados de forma didática em dois fenótipos principais – M1 e M2 - que se comportam de maneiras opostas (LOCATI et al., 2020).

Quando estimulados por ligantes de *Toll Like Receptors* como os lipopolissacarídeos ou citocinas de Th1 como IFN- $\gamma$ , chamada via clássica de ativação, o macrófago produz diversas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, CXCL9 e CXCL10, sendo chamado de macrófago M1 (MUÑOZ, 2020). Macrófagos M1 apresentam marcadores específicos em sua superfície como TLR-2, TLR-4, CD86, iNOS, CD80e MHC-II e de uma maneira geral, apresentam um perfil inflamatório, com grande capacidade microbicida e de apresentação de antígenos e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, o que, no contexto do câncer, produz respostas antitumorais (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

Frente ao estímulo das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-13, chamada de via alternativa de ativação, o macrófago é chamado de M2, produzindo quimiocinas e citocinas reguladoras como IL-10, TGF- $\beta$ , CCL1, CCL17, CCL18, CCL22 e CCL24 e de uma maneira geral apresenta perfil anti-inflamatório, produzindo citocinas

reguladoras da inflamação, com capacidade de promover a angiogênese, fatores que no contexto do câncer estão associados à progressão tumoral (DI BENEDETTO et al., 2019; GORDON; MARTINEZ, 2010). Sua superfície é caracterizada pelos marcadores receptor de manitol, CD206, CD163 e CD209 (YAO et al., 2019).

Diversos estudos identificaram ainda diferenças nos fenótipos de macrófagos M2, levando a sua classificação em novos perfis, podendo ser subdivididos em: M2a, M2b, M2c e M2d (YAO et al., 2019). Macrófagos M2a estão associados com o aumento a atividade endocítica, crescimento celular e reparo tecidual, são ativados por IL-4 e IL-13 e possuem com expressão aumentada de IL-10, TGF- $\beta$ , CCL17, CCL18 e CCL22 (YAO et al., 2019); Macrófagos M2b regulam a função imune, são ativadas por ligantes de TLR e IL-1 $\beta$ , produzindo citocinas que tanto promovem, quanto inibem a inflamação, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 (WANG et al., 2019). Macrófagos M2c desempenham papel importante na fagocitose de células apoptóticas, são ativados por glicocorticóides e citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  e secretam IL-10, TGF- $\beta$ , CCL16 e CCL18 (ZIZZO et al., 2012); Macrófagos M2d estão associados à progressão tumoral e angiogênese, são ativados por antagonistas de *Toll Like Receptors* e produzem IL-10 e fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), promovendo angiogênese e progressão tumoral (FERRANTE et al., 2013).

O macrófago é uma das principais células imunológicas infiltrantes no microambiente tumoral, onde é conhecido como *TAM - tumor associated macrophages* (RIHAWI et al., 2021). Os TAMs exercem grande influência na tumorigênese, metástase e resposta antitumoral (VAN OVERMEIRE et al., 2014; WILLIAMS; YEH; SOLOFF, 2016). São frequentemente também associados ao perfil M2, uma vez que podem estimular a angiogênese e suprimir respostas antitumorais, podendo também criar ambiente favorável às metástases em tecidos distantes do local de origem do tumor (BISWAS et al, 2010).

Alterações fenotípicas em macrófagos são sustentadas pelo metabolismo celular adequado, de modo que a célula sofre alterações em seu metabolismo o ajustando de acordo com a necessidade energética da célula. O microambiente tumoral por sua vez, por meio de diversos mecanismos de sinalização produzidos por seus componentes, pode influenciar no metabolismo de macrófagos MEHLA et al., 2019).



## 1.5 Metabolismo de macrófagos

O metabolismo consiste em uma série de reações que ocorrem no citosol e mitocôndria com o objetivo de fornecer energia e macromoléculas (JUDGE; DODD, 2020). É organizada por vias metabólicas que realizam a síntese de moléculas como proteínas, lipídios ou polissacarídeos a partir de moléculas precursoras como aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e degradação de moléculas complexas como carboidratos, proteínas e lipídeos, fornecendo energia química principalmente em forma de ATP (trifosfato de adenosina), processos conhecidos respectivamente por anabolismo e catabolismo (JUDGE; DODD, 2020).

Considerando os macrófagos, alterações metabólicas são importantes para atender suas necessidades energéticas quando estes passam de um estado de repouso para um estado de ativação, como por exemplo, quando entram em contato com patógenos (O'NEILL; PEARCE, 2016; VIOLA et al., 2019). Dependendo do seu perfil de ativação, diferentes vias metabólicas são requeridas ou inibidas e, portanto, macrófagos M1 e M2 apresentam diferentes necessidades metabólicas (VAN DEN BOSSCHE; O'NEILL; MENON, 2017).

A glicose é a principal fonte de energia para as células e seu catabolismo envolve a glicólise, ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido carboxílico) e fosforilação oxidativa, que ocorrem, respectivamente, no citoplasma, na matriz mitocondrial e nas cristas mitocondriais, cujo processo também é conhecido como respiração celular (O'NEILL; PEARCE, 2016). Diversas vias metabólicas apresentam expressão diferencial entre os fenótipos de macrófagos, sendo as principais diferenças decorrentes as vias do metabolismo da glicose, onde macrófagos de perfil inflamatório apresentam maior consumo de glicose, com aumento de transportadores de glicose GLUT1, apresentando metabolismo voltado para a glicólise anaeróbica e inibição das vias metabólicas mitocondriais do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, mesmo em condições normais de oxigenação (TANNAHILL et al., 2013; FREEMERMAN et al., 2014; ARTYOMOV et al., 2016; O'NEIL et al., 2016; VIOLA et al., 2019). Esta característica foi primeiramente observada por Otto Warburg durante estudos com células tumorais, recebendo o nome de Efeito Warburg, também presente em células altamente proliferativas e leucócitos ativados (TANNAHILL et al., 2013; KELLY et al.,

2015). Macrófagos de perfil anti-inflamatório por sua vez apresentam menor consumo de glicose com menor ativação da glicólise, com ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa intactas e maior consumo de oxigênio (RABOLD et al., 2017).

O aumento do consumo de glicose também facilita o aumento da atividade da via das pentoses fosfato, uma vez que a enzima hexoquinase converte glicose em glicose-6-fosfato, metabolito comum entre glicólise e a via das pentoses, sendo dividida em: fase não oxidativa, sintetizando ribose-5-fosfato, importante para síntese de nucleotídeos e aminoácidos; e fase oxidativa, produzindo NADPH, importante para produção de espécies reativas de oxigênio via enzima NADPH oxidase presente em fagócitos como neutrófilos e macrófagos (SINGEL et al., 2016). Em macrófagos M2, além de não ser alimentada pela alta captação de glicose, a via das pentoses parece ser inibida pela proteína quinase CARKL (HASCHEMI et al., 2013). Diferenças importantes entre os fenótipos ocorrem também no metabolismo de aminoácidos, onde em macrófagos M1 há aumento da produção de óxido nítrico pela ação da enzima iNOS a partir da arginina, que em macrófagos M2 é metabolizada completamente pela ação da enzima Arginase-1 (VAN DEN BOSSCHE et al., 2013).

Diversas enzimas da via glicolítica já demonstraram apoiar perfil inflamatório em macrófagos, promovendo e aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, fatores de transcrição associadas a resposta pró-inflamatória e promovendo a ativação do inflamassoma, dentre as quais estão as enzimas Piruvato Quinase M2 (PKM2), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Enolase, Hexoquinase 1 (Hk1) (PALSSON-MCDERMOTT et al., 2015; VAN DEN BOSSCHE et al., 2017; MILLET et al., 2016; BAE et al., 2012; O'NEILL et al., 2016). Uma vez que em macrófagos de perfil inflamatório há a inibição das vias mitocondriais de ciclo de Krebs e Fosforilação oxidativa, há um acúmulo de seus metabólitos succinato e citrato que podem, respectivamente, levar ao acúmulo de citocinas pró-inflamatórias e alimentar vias de geração de óxido nítrico e prostaglandinas, importantes na manutenção da inflamação (O'NEILL et al., 2016; HARBER et al., 2020).

Alterações no metabolismo têm sido exploradas como futuras estratégias terapêuticas, como foi demonstrado na inibição da enzima PKM2 (isoforma da piruvato quinase) na sepse e na doença arterial coronariana (XIE et al., 2016; SHIRAI et al., 2016). No contexto do câncer, alterações metabólicas e fenotípicas associadas à

quimioterapia direcionaram menor carga tumoral e melhor sobrevida de pacientes (MEHLA et al., 2019).

Sabe-se que EVs liberadas por células de melanoma são capazes de influenciar a função efetora e o fenótipo de células imunológicas. Entretanto são raros os estudos que avaliam se há ou não influência no metabolismo celular e como o mesmo pode afetar o padrão de resposta dessas células. Por isto, estudos que avaliem o papel das EVs liberadas por células tumorais no metabolismo de células do sistema imune fornecerão informações relevantes para a descoberta de novos alvos terapêuticos para controle ou prevenção de tumores altamente agressivos como o melanoma.

## REFERÊNCIAS

ACIKALIN, A. *et al.* Primary melanoma of the urinary tract; Clinicopathologic and molecular review of a case series. **Pathology, research and practice**, v. 216, n. 9, p. 153095, set. 2020.

AHMED, F.; HAASS, N.K. Microenvironment-Driven Dynamic Heterogeneity and Phenotypic Plasticity as a Mechanism of Melanoma Therapy Resistance. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 173, maio 2018.

BARROS, F.M. *et al.* Exosomes and immune response in cancer: Friends or foes?. **Frontiers in Immunology**, v.9, n.730 11 abr. 2018.

BIAN, C. *et al.* Phylogenetic Analysis of Core Melanin Synthesis Genes Provides Novel Insights Into the Molecular Basis of Albinism in Fish. **Frontiers in genetics**, v. 12, p. 707228, 4 ago. 2021.

BISWAS, S.K., MANTOVANI, A.. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, Set. 2010.

BOLLARD, S.M. *et al.* Circulating Melanoma-Derived Extracellular Vesicles: Impact on Melanoma Diagnosis, Progression Monitoring, and Treatment Response. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 12, dez. 2020.

BRANDNER, J.M., HAASS, N.I. K. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. **Pathology**, v. 45, n. 5, p. 443–452, ago. 2013.

CAMPOS, J.H. *et al.* Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases. **Journal of Immunology Research**, ago. 2015.

CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Surgical Clinics of North America**, v. 100, n. 1, p. 1–12, nov. 2020.

CHEN, G. *et al.* Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. **Nature**, v. 560, n. 7718, p. 382–386, 16 ago. 2018.

CHEN, Z.; LARREGINA, A.T.; MORELLI, A.E. Impact of extracellular vesicles on innate immunity. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 24, n. 6. p. 670-678, dez. 2019.

CLARK, M.E. *et al.* Detection of BRAF splicing variants in plasma-derived cell-free nucleic acids and extracellular vesicles of melanoma patients failing targeted therapy therapies. **Oncotarget**, v. 11, n. 44, p. 4016–4027, nov. 2020.

COVARRUBIAS, A.; BYLES, V.; HORNG, T. ROS sets the stage for macrophage differentiation. **Cell research**, v. 23, n. 8, p. 984–985, jul. 2013

DAS, A. *et al.* High-Resolution Mapping and Dynamics of the Transcriptome, Transcription Factors, and Transcription Co-Factor Networks in Classically and Alternatively Activated Macrophages **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 22, jan. 2018.

DASSLER-PLENKER, Jul.; KÜTTNER, Victoria; EGEBLAD, Mikala. Communication in tiny packages: Exosomes as means of tumor-stroma communication. **Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer**, v. 1873, n. 2, p. 188340, abr. 2020.

DI BENEDETTO, P. *et al.* Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 18, n. 10, p. 102369, ago. 2019.

DONLEY, G.M. *et al.* Reproductive factors, exogenous hormone use and incidence of melanoma among women in the United States. **British journal of cancer**, v. 120, n. 7, p. 754–760, abr. 2019.

DOYLE, L.M.; WANG, M.Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 727, 15 jul. 2019.

DUQUE, A.G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 491, 7 out. 2014.

DZWIERZYNSKI, W.W. Melanoma Risk Factors and Prevention. **Clinics in plastic surgery**, v. 48 n. 4, p. 543–550, jul. 2021

FERRANTE, C.J. *et al.* The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R $\alpha$ ) signaling. **Inflammation**, v. 36 n. 4, p. 921–931, ago. 2013.

FLEMING, V. *et al.* Melanoma extracellular vesicles generate immunosuppressive myeloid cells by upregulating PD-L1 via TLR4 signaling. **Cancer Research**, v. 79, n. 18, p. 4715–4728, set. 2019.

GIACOBINO, C. *et al.* Extracellular Vesicles and Their Current Role in Cancer Immunotherapy. **Cancers**, v. 13, n. 9, maio 2021.

GORDON, S.; MARTINEZ, O.F. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593–604, maio 2010.

GUIMARÃES-BASTOS, Daniel *et al.* Melanoma-derived extracellular vesicles skew neutrophils into a pro-tumor phenotype. **Journal of leukocyte biology**, maio 2021.

HASCHEMI A. *et al.* The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. **Cell Metab.**, v.15, n. 6, p. 813-826, jun. 2012

HEISTEIN, J.B.; ACHARYA, U. Malignant Melanoma. In: Treasure Island (FL). **StatPearls Publishing**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470409/>. Acesso em: 21 nov 2021

HOOD, J. L. Natural melanoma-derived extracellular vesicles. **Seminars in Cancer Biology**, v. 59, p. 251–265, ago. 2019.

HOOD, J.L.; SAN, R.S; WICKLINE, S.A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. **Cancer Research**, v. 71, n. 11, p. 3792–3801, jun. 2011.

HORREVORTS, S.K. *et al.* Glycan-Modified Apoptotic Melanoma-Derived Extracellular Vesicles as Antigen Source for Anti-Tumor Vaccination. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1266, 28 ago. 2019.

HOU, P.; CHEN, H. Extracellular vesicles in the tumor immune microenvironment. **Cancer letters**, v. 516, p. 48–56, maio 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA . Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. 2020 Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em 23 de janeiro de 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER WORKING GROUP ON ARTIFICIAL ULTRAVIOLET (UV) LIGHT AND SKIN CANCER. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. **International journal of cancer**, v. 120, n. 5, p. 1116–1122, maio 2007.

JELLA, K.K. *et al.* Exosome-Containing Preparations From Postirradiated Mouse Melanoma Cells Delay Melanoma Growth In Vivo by a Natural Killer Cell-Dependent Mechanism. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 108, n. 1, p. 104–114, set. 2020.

JUDGE, A.; DODD, M.S. Metabolism. **Essays in biochemistry**, v. 64, n. 4, p. 607–647, out. 2020.

KAHL, A.R. *et al.* Presentation, Management, and Prognosis of Primary Gastrointestinal Melanoma: A Population-Based Study. **The Journal of surgical research**, v. 260, p. 46–55, abr. 2021.

KALRA, H.; DRUMMEN, G.P.C.; MATHIVANAN, S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 2, p. 170, fev. 2016.

KELLY, B; O'NEILL, L. J. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. **Cell research**, v. 25, n. 7, p. 771–784, jul. 2015.

LABANI-MOTLAGH, A. *et al.* Systemic immunity upon local oncolytic virotherapy armed with immunostimulatory genes may be supported by tumor-derived exosomes. **Molecular therapy oncolytics**, v. 20, p. 508–518, fev. 2021.

LAHAV, T.G. *et al.* Melanoma-derived extracellular vesicles instigate proinflammatory signaling in the metastatic microenvironment. **International Journal of Cancer**, v. 145, n. 9, p. 2521–2534, nov. 2019.

LARA, P. *et al.* Gold nanoparticle based double-labeling of melanoma extracellular vesicles to determine the specificity of uptake by cells and preferential accumulation in small metastatic lung tumors. **Journal of nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 20, jan. 2020.

LASKAR, R. *et al.* Risk factors for melanoma by anatomical site: an evaluation of aetiological heterogeneity. **The British journal of dermatology**, v. 184 p. 1085–1093, jun. 2021

LIU, H. *et al.* Macrophage functional phenotype can be consecutively and reversibly shifted to adapt to microenvironmental changes. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8. n. 2, p. 3044–3053, fev 2015.

LOCATI, M.; CURTALE, G.; MANTOVANI, A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. **Annu Rev Pathol**, v. 15, p. 123-147. 2020.

LUAN, W. *et al.* Exosomal miR-106b-5p derived from melanoma cell promotes primary melanocytes epithelial-mesenchymal transition through targeting EphA4. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 40, n. 1, p. 107, mar. 2021.

MANNAVOLA, F. *et al.* Extracellular vesicles and epigenetic modifications are hallmarks of melanoma progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. jan. 2020.

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

MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A.C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298–306, jan. 2016.

MEHLA, K.; SINGH P.K. Metabolic Regulation of Macrophage Polarization in Cancer. **Trends Cancer**, v. 5, n. 12, p. 822-834, dez. 2019.

MOLGORA, M. *et al.* The yin-yang of the interaction between myelomonocytic cells and NK cells. **Scandinavian journal of immunology**, v. 88, n. 3, ago. 2018.

MORO, N.; MAUCH, C.; ZIGRINO, P. Metalloproteinases in melanoma. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 1–2, p. 23–29, jan. 2014.

MUÑOZ, J. *et al.* Macrophage Polarization and Osteoporosis: A Review. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 2999, set. 2020.

NAGY, C.; HASCHEMI, A. Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: The process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 164, abr. 2015.

NOE, J.T.; MITCHELL, R.A. Tricarboxylic acid cycle metabolites in the control of macrophage activation and effector phenotypes. **Journal of leukocyte biology**, v. 106, n. 2, p. 359–367, ago. 2019.

O'NEILL, L.A.J.; PEARCE, E.J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. **The Journal of experimental medicine**, v. 213, n. 1, p. 15–23, jan. 2016.

PASSARELLI, A. *et al.* Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. **Oncotarget**, v. 8, n. 62, p. 106132–106142, 31 out. 2017.

PIETROWSKA, M. *et al.* Proteomic profile of melanoma cell-derived small extracellular vesicles in patients' plasma: a potential correlate of melanoma progression. **Journal of extracellular vesicles**, v. 10, n. 4, p. e12063, fev. 2021.

PORCELLI, L. *et al.* uPAR(+) extracellular vesicles: a robust biomarker of resistance to checkpoint inhibitor immunotherapy in metastatic melanoma patients. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 9, n. 5, maio 2021.

RAMBOW, F.; MARINE, J.; GODING, C.R. Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. **Genes & development**, v. 33, n. 19–20, p. 1295–1318, 1 out. 2019.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 273-283, fev. 2013.

RASTRELLI, M. *et al.* Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In Vivo**, v. 28, n. 6, p. 1005-1011, dez. 2014.

RIHAWI, K. *et al.* Tumor-Associated Macrophages and Inflammatory Microenvironment in Gastric Cancer: Novel Translational Implications. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 8, abr. 2021.

SAYAN, M. *et al.* Clinical management of uveal melanoma: a comprehensive review with a treatment algorithm. **Radiation oncology journal**, v. 38, n. 3, p. 162–169, set. 2020.

SENGA, S.S.; GROSE, R.P. Hallmarks of cancer-the new testament. **Open biology**, v. 11, n. 1, p. 200358, jan. 2021.

SHARMA, P. *et al.* Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 92, 9 jan. 2020.

SHI, A. *et al.* Plasma-derived extracellular vesicle analysis and deconvolution enable prediction and tracking of melanoma checkpoint blockade outcome. **Science advances**, v. 6, n. 46, p. eabb3461, 13 nov. 2020.

SHIRAI T. *et al.* The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease. **J Exp Med**, v. 2013, n. 3, p. 337-354, fev. 2016.

SHU, S. *et al.* An Immunosuppressive Effect of Melanoma-derived Exosomes on NY-ESO-1 Antigen-specific Human CD8(+) T Cells is Dependent on IL-10 and Independent of BRAF(V600E) Mutation in Melanoma Cell Lines. **Immunological investigations**, v. 49, n. 7, p. 744–757, out. 2020.

SIMICZYJEW, A. *et al.* The Influence of Tumor Microenvironment on Immune Escape of Melanoma. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 21, p. 8359, 7 nov. 2020.

SUSA, F. *et al.* Engineered Extracellular Vesicles as a Reliable Tool in Cancer Nanomedicine. **Cancers**, v. 11, n. 12, dez. 2019.

THÉRY, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.

TUCCI, M. *et al.* Immune System Evasion as Hallmark of Melanoma Progression: The Role of Dendritic Cells. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 1148, 5 nov. 2019.



TURNER, N.; WARE, O.; BOSENBERG, M. Genetics of metastasis: melanoma and other cancers. **Clinical & experimental metastasis**, v. 35, n. 5–6, p. 379–391, ago. 2018a.

Van den Bossche, J. *et al.* Pivotal Advance: Arginase-1-independent polyamine production stimulates the expression of IL-4-induced alternatively activated macrophage markers while inhibiting LPS-induced expression of inflammatory genes. **Journal of leukocyte biology**, v. 91n. 5, p. 685–699, maio 2012.

VAN DEN BOSSCHE, J.; O'NEILL, L.A.; MENON, D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? **Trends in immunology**, v. 38, n. 6, p. 395–406, jun. 2017.

VAN OVERMEIRE, E. *et al.* Mechanisms driving macrophage diversity and specialization in distinct tumor microenvironments and parallels with other tissues. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 127, 2014.

VIGNARD, V. *et al.* MicroRNAs in Tumor Exosomes Drive Immune Escape in Melanoma. **Cancer immunology research**, v. 8, n. 2, p. 255–267, fev. 2020.

VIOLA, A. *et al.* The Metabolic Signature of Macrophage Responses. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1462, 3 jul. 2019.

Wang, L. *et al.* M2b macrophage polarization and its roles in diseases. **Journal of leukocyte biology**, v. 106, n. 2, p. 345–358, ago. 2019.

WHITEHEAD, B. *et al.* Tumour exosomes display differential mechanical and complement activation properties dependent on malignant state: implications in endothelial leakiness. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, p. 29685, dez. 2015.

WILLIAMS, C.B.; YEH, E.S.; SOLOFF, A.C. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. **npj Breast Cancer**, v. 2, n. 1, p. 15025, jan. 2016.

WOHLMUTH, C. *et al.* Malignant Melanoma of the Vulva and Vagina: A US Population-Based Study of 1863 Patients. **American journal of clinical dermatology**, v. 21, n. 2, p. 285–295, abr. 2020.

XIE, M. *et al.* PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. **Nat Commun**, v. 7, n. 13280, out. 2016.

YAO Y.; XU, X.; JIN L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. **Front Immunol**. v. 10, n. 792, abr. 2019.

YÁÑEZ-MÓ, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, p. 27066, 14 maio 2015.

ZABOROWSKI, M.P. *et al.* Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. **Bioscience**, v. 65, n. 8, p. 783–797, ago. 2015.

ZHOU, E. *et al.* Circulating extracellular vesicles are effective biomarkers for predicting response to cancer therapy. **EBioMedicine**, v. 67, p. 103365, maio 2021.

ZIZZO, G. *et al.* Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. **Journal of immunology**, v. 189, n.7, p. 3508–3520, out. 2012

2. Artigo - Periódico para submissão: *Frontiers in Cell and Developmental Biology*

## **Vesículas extracelulares liberadas por células B16F10 promovem polarização de macrófagos para perfil inflamatório**

**<sup>1</sup>Thiago Albuquerque Viração\*, <sup>1</sup>Anuska Marcelino Alvares Saraiva, <sup>2</sup>Patrícia Xander Batista, <sup>1</sup>Elizabeth Cristina Perez Hurtado**

<sup>1</sup>Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, Diadema, Brasil.

**\*Correspondência:**

Thiago Albuquerque Viração  
thiago.albqv@gmail.com

### **Resumo**

Vesículas extracelulares (EVs) são partículas formadas por bicamada lipídica liberadas pela maioria das células em processos fisiológicos e patológicos. EVs contém moléculas bioativas como DNA, RNA, proteínas e lipídios, derivadas de suas células produtoras que, ao serem liberadas para o meio extracelular, são levadas para outras células, podendo influenciar no seu fenótipo e função. Assim, estudos têm demonstrado que EVs liberadas por células tumorais podem influenciar no fenótipo de macrófagos, uma das principais células imunológicas presentes no microambiente tumoral. Entretanto, não há estudos sobre o papel de EVs liberadas por células tumorais no metabolismo dos macrófagos. Visto que o fenótipo do macrófago é fortemente influenciado pelo seu metabolismo celular, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de EVs no metabolismo e perfil de ativação de macrófagos murinos. Para isto, EVs liberadas por células de melanoma murino B16F10 mantidas em cultura por 48 horas na ausência de soro fetal bovino foram caracterizadas e utilizadas em ensaios *in vitro* com macrófagos primários obtidos por diferenciação de precursores medulares de camundongos C57BL/6. Resultados mostraram que macrófagos cultivados com EVs tiveram maior captação de glicose, aumento de expressão de iNOS e maior produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 e IL-10, sem induzir alterações significativas na sua capacidade fagocítica. Dados preliminares, também sugeriram aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Estes achados em conjunto mostram que macrófagos primários cultivados com EVs derivadas de células de melanoma cultivadas por 48 horas tendem a uma polarização para o perfil de ativação mais compatível com macrófagos M1. Estes achados são relevantes e fornecem novas informações sobre o efeito de EVs derivadas de células

de melanoma no perfil metabólico e funcional de macrófagos além de evidenciar possíveis abordagens para futuras terapias anticâncer

**Palavras-chave:** Câncer, células B16F10, exossomos, glicose, perfil inflamatório.

## INTRODUÇÃO

Entre os tumores que acometem a pele, o melanoma é considerado o mais agressivo dada a sua alta capacidade metastática e resistência à maioria das terapias convencionais, que conferem a sua elevada mortalidade (Massagué et al., 2016; Turner et al. 2018; Heistein et al., 2021; Senga et al. 2021). Diversos estudos afirmam que o comportamento do tumor é influenciado pela comunicação bidirecional entre as células tumorais e componentes do microambiente tumoral, tais como matriz extracelular, endotélio e outros componentes celulares, tendo destaque o papel de células do sistema imunológico (Passarelli et al., 2017; Tucci et al., 2019; Simiczjew et al., 2020). Esta comunicação pode ocorrer tanto pelo contato direto entre estes componentes, quanto pela produção de fatores solúveis, dentre os quais destaca-se o papel das vesículas extracelulares, que representam importante alvo de estudo na área oncológica (Turner et al., 2018; Hou et al., 2021).

Vesículas extracelulares (EVs) são partículas delimitadas por bicamada lipídica, produzidas naturalmente pela maioria das células e liberadas para o meio extracelular em diversos processos fisiológicos e patológicos, sendo classificadas de acordo com sua formação, tamanho e origem, principalmente em exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (Théry et al., 2018; Chen et al., 2019; Giacobino et al., 2021; Hou et al., 2021; Zhou et al., 2021). EVs contêm moléculas derivadas de suas células produtoras, como DNA, RNA mRNA, miRNA, proteínas e lipídeos e, uma vez liberadas para o meio extracelular, podem ser transportadas para outras células do microambiente, podendo alterar seu fenótipo (Kalra et al., 2016; Doyle et al., 2019; Giacobino et al., 2021).

Já foi demonstrado que EVs liberadas por células de melanoma são capazes de influenciar no fenótipo de diversas células do sistema imunológico, entre elas os macrófagos. (Bardi et al., 2018). O macrófago é uma das principais células do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral e uma das principais características destas células é sua alta plasticidade, com grande influência na tumorigênese, metástase ou resposta antitumoral (Van Overmiere et al., 2014; Williams et al., 2016; Rihawi et al., 2021). Tradicionalmente os macrófagos são classificados em dois fenótipos principais que se comportam de maneiras opostas no tumor: macrófagos M1 de perfil inflamatório e antitumoral; e macrófagos M2, de perfil anti-inflamatório, atuando na angiogênese e remodelação tecidual e, por conseguinte, na progressão tumoral (Duque et al., 2014, Gordon et al., 2010; Di Benedetto et al., 2019).

Alterações fenotípicas são sustentadas por mudanças no metabolismo celular de modo em que a célula ajuste seu metabolismo de acordo com a sua necessidade energética e funcional, uma vez que dependendo do seu perfil de ativação diferentes vias metabólicas são requeridas ou inibidas (O'Neil et al., 2016; Van den Bossche et al., 2017; Noe et al., 2019; Muñoz et al., 2020; Judge et al., 2020). Neste contexto, a glicose é a principal fonte de energia para as células, cujas vias metabólicas de catabolismo são glicólise, ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido carboxílico) e fosforilação oxidativa, processo também conhecido como respiração celular (Viola et al., 2019).

Estas vias apresentam expressão diferencial entre os fenótipos de macrófagos, exibindo uma maior glicólise em macrófagos inflamatórios, também ocorrendo inibição do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (Viola et al., 2019). Embora o metabolismo da glicose seja o de maior importância na diferenciação entre os perfis do macrófago, outras vias também são diferenciais entre os fenótipos, como a via das pentoses-fosfato (PPP), metabolismo de ácidos graxos e metabolismo de aminoácidos, formando macromoléculas necessárias para que a célula execute suas funções efetoras (Kelly et al., 2015; Nagy et al., 2015; O'Neil et al., 2016).

Sabe-se que EVs liberadas por células de melanoma são capazes de influenciar a função efetora e no fenótipo de células imunológicas. Entretanto são raros os estudos que avaliam a associação entre EVs e imunometabolismo em câncer. Por isto, o atual trabalho investiga o papel das EVs liberadas por células de melanoma no metabolismo e capacidade funcional de macrófagos murinos indiferenciados, com o intuito de fornecer informações relevantes para a descoberta de novos alvos terapêuticos para controle ou prevenção de tumores altamente agressivos como o melanoma.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Cultura de células B16F10**

Células B16F10 foram cultivadas em meio R10, composto por RPMI – 1640 (Gibco – Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco – Thermo Fischer Scientific) e 1% de antibiótico streptomomicina (Gibco – Thermo Fischer Scientific), em estufa a 37°C e com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O descolamento das células foi realizado por breve exposição à tripsina (Gibco – Thermo Fischer Scientific).

### **Obtenção e caracterização das vesículas extracelulares**

Células B16F10 foram plaqueadas na concentração de 2,5X10<sup>6</sup> em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> (Corning®, Massachusetts, USA) com meio R10 permanecendo *overnight* para adesão. No dia seguinte, células aderidas foram lavadas com tampão fosfato salina 1X (PBS 1X) estéril para remoção total de SBF e para adição de 10 mL de meio RPMI, sem SBF. Quatro horas após, o meio foi novamente removido para adição de 10 mL de meio RPMI novo, iniciando a contagem do tempo para a coleta de sobrenadantes (tempo 0).

Sobrenadantes de cultura foram coletados nos tempos de 2, 4, 6, 8, 20, 24 ou 48 horas e em seguida submetidos a diferentes etapas de centrifugação e ultracentrifugação, nas velocidades 500, 1500, 3800 e 10000 g a 4°C por 10 minutos para remoção dos debris celulares, e duas vezes a 100000 g por uma hora, para precipitação das vesículas. O *Pellet* contendo as vesículas extracelulares (EVs) foi ressuspendido em 300 µL de PBS 1X para posterior avaliação da concentração e distribuição do tamanho das EVs usando o equipamento *Nanosight* NS300 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). Para isto, 20 µL de amostra foram diluídos em PBS, realizando três capturas com um minuto de duração (20 frames por segundo) à temperatura de 20° C, utilizando o *software* NTA (*nanotracking particle analysis*, versão 3.4 Build 3.4.003). Já a quantificação de proteínas foi realizada utilizando o kit *Micro BCA Protein Assay kit* (Thermo Fisher), seguindo as informações do fabricante.

### **Avaliação da viabilidade pelo método de exclusão por *Trypan Blue***

Para contagem e determinação da viabilidade celular pelo método de exclusão por *Trypan Blue*, 10 µL de suspensão celular (obtida do sobrenadante e das células aderidas após descolamento) foram acrescentados a 10 µL do corante e após homogeneização, 10 µL desta suspensão foram colocados em câmara de Neubauer, para quantificação das células vivas (não coradas) e mortas (coradas). O valor médio da contagem tanto de células coradas e não coradas foi multiplicado por 2 (diluição do corante) e o valor obtido representou, respectivamente, o número e percentual de células mortas e vivas por mL de suspensão, em cada um dos sobrenadantes coletados nos respectivos tempos.

### **Análises de células viáveis e não viáveis pela expressão de 7AAD/Anexina**

Para avaliar viabilidade celular e descartar a presença de células apoptóticas no momento da coleta dos sobrenadantes, células aderidas e presentes no sobrenadante foram coletadas e submetidas à marcação da expressão dos marcadores 7AAD e Anexina, conforme instruções do kit *PE annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Para isto, após respectivos tempos de cultura, células aderentes e suspensas foram coletadas e centrifugadas a 1500 rpm por cinco minutos. O *pellet* foi ressuspendido em PBS 1X e alíquota contendo  $1 \times 10^5$  células foi transferida para microtubos onde foi realizada nova centrifugação. O *pellet* celular foi ressuspendido em 100 µL de tampão do kit, acrescidos de 1 µL de PE Annexin V (PE) e 1 µL de 7-Amino Actinomycin (7AAD). Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente e protegido da luz, foram adicionados 100 µL do tampão para aquisição imediata das amostras em *template* padronizado para citômetro de fluxo *Accuri™ C6* (BD Biosciences).

### **Cultura de células L929**

Células da linhagem L929 foram cultivadas para obtenção do fator de crescimento M-CSF (fator estimulante de colônias de macrófagos) para diferenciação dos macrófagos a partir de monócitos de medula óssea. Para isto, células foram cultivadas em meio R10 em garrafas pequenas (25 cm<sup>2</sup>, Corning®) e ao atingir 100% de confluência, foram repicadas para garrafas médias (75 cm<sup>2</sup> Corning®). Quando estas chegaram a 100% de confluência, foram repicadas para duas garrafas grandes (125cm<sup>2</sup>, Corning®), com 50 mL de meio. Ao alcançarem confluência de 100 % na garrafa grande, foram contados sete dias para realizar a primeira coleta do sobrenadante, seguida da adição de 50 mL de meio R10 novo para nova coleta após mais sete dias. Os sobrenadantes foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos, filtrados com seringa e filtro 0,22 µm e armazenados a -20°C até o momento de sua utilização.

### **Obtenção de células de medula óssea e diferenciação em macrófagos**

Camundongos machos C57BL/6 de 8 semanas foram adquiridos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e mantidos em condições SPF (*Specific Pathogen-free*), no Laboratório de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa da Universidade Paulista (UNIP), conforme recomendação do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2018.

Os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico pela injeção por via intraperitoneal (i.p.) de solução contendo quetamina (50 mg/mL), xilazina (20 mg/mL) e fentanil (0,05 mg/mL) para colheita da medula óssea dos fêmures e tíbias.

Após eutanásia, as patas dos animais foram retiradas para separação dos ossos, que após remoção da musculatura foram colocados em placa de petri com álcool 70% por 1 minuto e logo deixados em PBS até a coleta celular. Para a obtenção das células, as epífises dos ossos foram cortadas e a medula lavada pela infusão de 10 mL de PBS gelado com auxílio de seringa e agulha. Os agregados celulares foram rompidos por homogeneização cuidadosa para obtenção da suspensão celular a qual foi colocada em tubo *falcon* e centrifugada à 1000 RPM por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado com 1 mL de tampão hemolítico e incubado na temperatura ambiente por 2 minutos. Após incubação meio R10 foi acrescido para lavagem por centrifugação a 1000 RPM por 10 minutos. Após centrifugação, sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em meio MPh (RPMI, 10% SFB, 20% sobrenadante de L929, 2-mercaptoetanol 56,8  $\mu$ M, L-Glutamina 200 mM, Piruvato de Sódio 100 mM, HEPES 10 mM, Penicilina/Streptomicina 50 u/mL / 50  $\mu$ g/mL). Em seguida, as células foram contadas e plaqueadas em garrafas médias, na concentração de  $3 \times 10^6$  em 15 mL do mesmo meio. Todos os procedimentos realizados antes e após eutanásia dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA - UNIP), Protocolo N° 7898300819.

A diferenciação ocorreu ao longo de sete dias, com troca de meio no terceiro e quinto dia de cultura. Para troca do meio, sobrenadantes foram coletados e centrifugados à 1000 rpm por 10 minutos, adicionando meio MPh novo às garrafas. Após centrifugação, *pellet* foi ressuspensionado em MPh novo e colocado novamente na garrafa. Ao final da diferenciação, meio foi retirado e células foram coletadas pela adição de PBS gelado para raspagem delicada com auxílio do *cell scraper*. O percentual e viabilidade de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM – do inglês: *bone marrow-derived macrophages*) para posteriores experimentos foi avaliada por análises de citometria de fluxo.

### **Análise do percentual de diferenciação**

Após sete dias de diferenciação, células foram centrifugadas e o *pellet* ressuspensionado em PBS-BSA 1% para marcação com CD11b conjugado a FITC (Isotiocianato de fluoresceína) e F4/80 conjugado a PE (Phycoerythrin) para aquisição em citômetro Accuri™C6 (BD Biosciences) para verificar percentual de macrófagos diferenciados. Adicionalmente, uma alíquota de células foi submetida à marcação de 7AAD e Anexina, conforme descrito no item acima, para verificação da viabilidade celular.

### **Tratamento de BMDM com EVs**

Para avaliar o efeito das EVs isoladas das células B16F10 sob macrófagos indiferenciados, BMDMs foram cultivados em placas de 6 ou 24 poços com meio R10, por 24 horas para completa adesão. Após 24 horas, células foram tratadas com EVs nas concentrações de 2,5, 5 e 7,5  $\mu$ g/mL por 48 horas. Como controles foram utilizadas células cultivadas apenas com meio R10, controle negativo ou sem estímulo (controle negativo) e células tratadas com 100 ng/mL de LPS (Thermo Fischer) por 24 horas como controle positivo ou com estímulo (Das et al., 2018).

### **Ensaio de fagocitose**

Para ensaio de fagocitose,  $3 \times 10^5$  BMDMs foram cultivados em placas de 24 poços e tratados por 48 horas com EVs. Após este período, células aderidas foram lavadas com PBS e em seguida incubadas com meio completo contendo ou não leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* na proporção de 1:10, respectivamente (1 macrófago:10 leveduras). Para preparo das leveduras, quantidade equivalente a uma ponta de pipeta *pasteur* foi dissolvido em PBS e submetidas a três (3) esterilizações de trinta minutos a temperatura de 121°C e pressão 1 Kgf/cm<sup>2</sup>. Após autoclavadas, leveduras foram contadas utilizando câmara de Neubauer e quantidade necessária foi separada, lavada e ressuspensa em meio completo, com volume adequado para plaqueamento ( $30 \times 10^5$  leveduras em 500 µL/poço). Macrófagos contendo ou não leveduras foram incubados por 2 horas nas mesmas condições de cultura. Para o tempo de 2 horas, lamínulas contendo macrófagos foram lavadas e retiradas da placa para coloração pelo método de *Giemsa*. Para o tempo de 24 horas, células aderentes foram lavadas por 3 vezes com PBS e em seguida incubadas novamente com meio completo novo para coleta das lamínulas 24 horas após troca do meio. Lamínulas dos tempos 2 e 24 horas foram analisadas no microscópio óptico de luz Eclipse E200 (Nikon Inc. USA) 1000 x. A determinação do índice fagocítico (IF) foi calculado levando em consideração o número médio de leveduras fagocitadas x porcentagem de macrófagos que fagocitaram, determinado em 100 macrófagos por lâmina (Barbuddhe et al., 1998).

### **Coloração de Giemsa**

Para coloração por Giemsa, lamínulas coletadas nos tempos respectivos foram fixadas por dois minutos com metanol absoluto. Em seguida, foi acrescentado o corante Giemsa e mantido por três minutos também a temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada e secas ao ar, lamínulas foram montadas em lâminas contendo uma gota de *entellam*® (Merck, Darmstadt, Germany).

### **Determinação do perfil de ativação de BMDM após tratamento com EVs**

Células BMDMs foram plaqueadas em  $3 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços para avaliar perfil de ativação após tratamento com EVs por citometria de fluxo, utilizando marcação intracelular e de superfície. Para marcação intracelular, seis horas antes do fim do tratamento com EVs, células foram tratadas com 1 µL de Golgi plug (BD Biosciences, New Jersey, USA). Após 48 horas de tratamento as células tratadas e não tratadas com Golgi plug foram coletadas e incubadas com anti-CD16/CD32 para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após 20 min de incubação no gelo, células tratadas com Golgi plug foram incubadas para marcação de superfície com anti-CD11b conjugado a FITC (Isotiocianato de fluoresceína). Após incubação de 20 min no gelo e protegidas da luz, células foram submetidas a protocolo de permeabilização para marcação intracelular utilizando os anticorpos anti- IL-10 conjugado a Percp-Cy5.5 (peridinin-chlorophyll-protein Cy5), anti- iNOS conjugado a PE (Phycoerythrin) e anti-IL-12 conjugado a APC (Allophycocyanin). Após 20 min de incubação no gelo e protegidas da luz, células foram lavadas e ressuspensas em PBS 1X para aquisição em citômetro Accuri™C6 (BD Biosciences). Em paralelo, após incubação com anti-CD16/CD32, células não tratadas com Golgi plug foram marcadas com anti-CD206 Alexa Fluor, anti-F4/80 conjugado a PE, anti-CD86 e MHC conjugado



a conjugado a FITC, e anti-CD40 conjugado a PECy5. Após 20 min de incubação no gelo e protegidas da luz, células foram lavadas e ressuspensas em PBS 1X para aquisição em citômetro Accuri™C6. Análises dos dados foram realizadas no *software* BD FlowJo™, versão 10.8 (BD Biosciences).

### **Glucose Uptake**

Para ensaio de captação de glicose foram plaqueadas  $3 \times 10^5$  BMDMs em placas de 24 poços para tratamento ou não com EVs. O sobrenadante foi removido após 48 horas e, então, foi acrescentado meio RPMI contendo um análogo de glicose fluorescente, o 2-NBDG, na concentração de 100 µg/mL e incubado por 2 e 4 horas. Após incubação o sobrenadante removido e às células foram acrescentados de 200 µL de *Cell-based Assay Buffer*, contido no *Glucose Uptake Cell-based Assay kit* (Cayman, Michigan, USA). Para exclusão das células mortas, foi acrescentado iodeto de propídio em todas as amostras, na proporção de 1:1000. A avaliação foi realizada em citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences) e as análises realizadas usando o *software* FlowJo™, versão 10.8.

### **Análise de citocinas por CBA (Cytometric Bead Array)**

Os sobrenadantes das culturas tratadas ou não com EVs ou LPS foram coletados para a determinação de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-4, IL-17), utilizando o *kit* BD *Cytometric Bead Array (CBA)* (BD-Biosciences). Para isto, 20 µL de cada amostra (tanto da curva padrão, quanto dos sobrenadantes) foram incubados com 20 µL de uma mistura de *beads* de captura e anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo *phycoerythrin* (PE). As amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, no escuro e após lavagem, adquiridas no citômetro FACS Accuri™C6, conforme *template* disponibilizado (BD Bioscience). Total de 2100 eventos foram adquiridos e a análise dos dados foi realizada utilizando o *software* de análises para CBA (*FCAP Array software* – BD Biosciences).

### **Quantificação dos níveis de NO e ROS intracelular**

A produção de NO ou ROS intracelulares após cada condição foi avaliada utilizando respectivamente o reagente fluorescente 4-amino5-metilamino-2,7-difluorosceína diacetato (DAF2-DA) e a sonda 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFH-DA) que ao reagir com ROS, transforma-se em diclorofluoresceína (DCF), que é fluorescente. Para isto,  $3 \times 10^5$  BMDMs foram cultivados em placas de 24 poços e tratados por 48 horas com EVs. Após este período, células aderidas foram lavadas com PBS e em seguida incubadas com meio completo contendo ou não leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* na proporção de 1:10. Após duas horas, células foram coletadas ou lavadas e incubadas por mais 24 horas com meio novo. Após respectivos períodos, 2 e 24 horas células foram coletadas e incubadas com 5 µM de DAF2-DA ou com 10 µL da sonda DCFH-DA 0,1 mM por 30 min a 37°C no escuro. Células foram ressuspensas em 200 µL de PBS para aquisição no citômetro Accuri™C6 (BD). Análises foram realizadas usando o *software* FlowJo™, versão 10.8 (BD Bioscience).

### **Análise Estatística**

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk (SW) e Homogeneidade por teste de Levene para avaliar se os dados foram ou não

paramétricos. Foi utilizado teste *t student* para amostras independentes para comparações entre dois grupos e ANOVA de uma via para comparações entre três ou mais grupos, com pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Quando não houve normalidade dos dados, o conjunto de dados foi classificado como não paramétrico e analisados por teste U de Mann Whitney, alternativa não paramétrica para teste *t student*. Outliers foram avaliados por análises de gráficos box-plots e removidos quando necessário. Diferenças com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas. A análise estatística foi realizada pelo *software* Microsoft Excel®, suplemento *Real statistics* e a construção gráfica foi realizada pelo GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Prism for Windows, GraphPad software, San Diego, California USA).

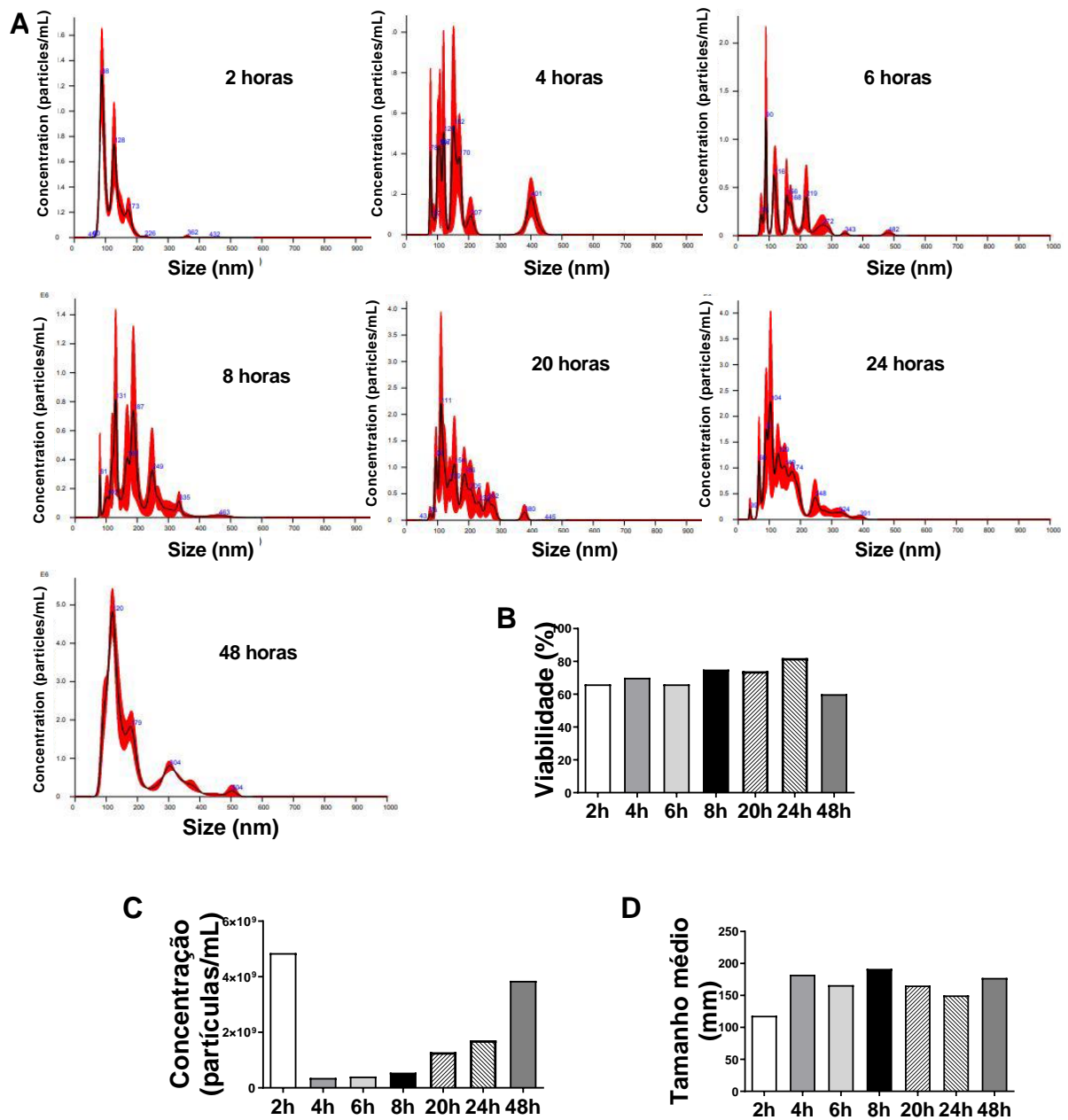
## RESULTADOS

### **Padronização dos tempos de cultura para coleta de vesículas extracelulares liberadas por células B16F10**

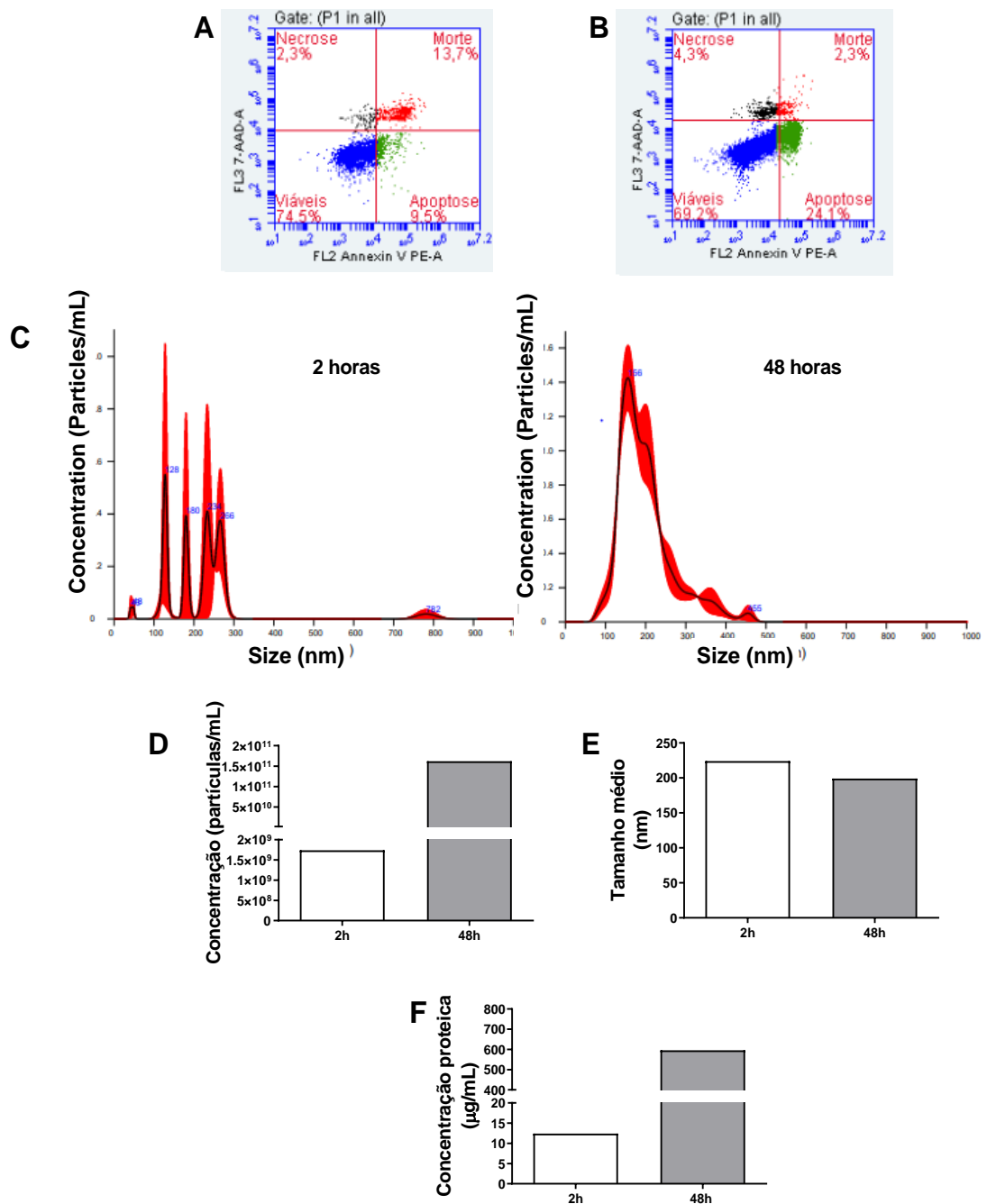
Foi realizada etapa de padronização do tempo ideal para coleta de sobrenadante com maior concentração EVs de tamanhos semelhantes aos exossomos. Para isto, foram coletados sobrenadantes em sete tempos diferentes: 2, 4, 6, 8, 20, 24 e 48 horas. Análises por *Nanosight* (**Figuras 1A,C**) mostraram as concentrações (partículas/mL) de  $4,85 \times 10^9$ ,  $3,56 \times 10^8$ ,  $4,08 \times 10^8$ ,  $5,47 \times 10^8$ ,  $1,28 \times 10^9$ ,  $1,71 \times 10^9$  e  $3,85 \times 10^9$  nos respectivos tempos, com tamanhos médios de 118,2, 182,4, 166,1, 191,6, 165,6, 150,2 e 177,4 nm, respectivamente (**Figura 1D**). O percentual de viabilidade em cada tempo foi verificado, sendo o mesmo maior ou igual a 60% (**Figura 1B**).

### **Sobrenadantes de células B16F10 coletados após 48 horas de cultura apresentaram maiores concentrações de partículas e proteica**

Os tempos que apresentaram maior concentração de EVs: 2 e 48 horas, foram pré-selecionados para uma segunda etapa de verificação, com o objetivo de confirmar os achados em relação à distribuição e concentração das EVs e checar a quantidade proteica em cada amostra. Dados obtidos no *Nanosight* após checagem da viabilidade celular (**Figura 2A,B**) mostraram concentrações de  $1,74 \times 10^9$  e  $1,62 \times 10^{11}$  partículas/mL, (**Figura 2D**), com tamanhos médios de 224,0 e 199,1 nm (**Figura 2E**), nos tempos respectivos. Já a quantificação proteica obtidas nestes tempos foram respectivamente 12,40 e 595  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 2F**). Uma vez que nesta segunda etapa de padronização o tempo de 48 horas apresentou maior concentração de partículas/mL e maior concentração proteica, este foi o tempo selecionado para obtenção das EVs utilizadas nos ensaios com macrófagos.



**Figura 1** | Tamanho e concentração de partículas liberadas por células B16F10 em diferentes tempos de cultura. Células B16F10 foram cultivadas na ausência de SFB e sobrenadantes coletados com 2, 4, 6, 8, 20, 24 e 48 horas e EVs foram obtidas após etapas de centrifugação e ultracentrifugação. Viabilidade celular analisada por *trypan blue*. Concentração e tamanho das EVs foram avaliados por *Nanosight* NS300 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). **(A)** Gráficos representativos da análise por *Nanosight* **(B)** Viabilidade **(C)** concentração (partículas/mL), **(D)** Tamanho médio (nm). Barras representam amostras em unicata.



**Figura 2** | Tamanho e concentração das EVs coletadas nos tempos de 2 e 48 horas. Células B16F10 foram cultivadas na ausência de SFB e sobrenadantes coletados com 2 e 48 horas e EVs foram obtidas após etapas de centrifugação e ultracentrifugação. Gráfico representativo da viabilidade avaliada pelo kit *PE annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), nos tempos de **(A)** 2 horas e **(B)** 48 horas. **(C)** Gráficos representativos da avaliação por *Nanosight NS300* (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). **(D)** Tamanho e **(E)** concentração das EVs **(F)** Quantificação proteica foi avaliada por kit *Micro BCA protein assay kit* (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States. Barras representam amostras em unicata.

### **Caracterização fenotípica de macrófagos após tratamento com EVs de células B16F10 coletadas após 48 horas em cultura**

Células totais de medula óssea foram coletadas após sete dias de diferenciação em cultura com meio contendo sobrenadante de células L929. Para ensaios posteriores a pureza e viabilidade das células após diferenciação foi avaliada sendo o percentual de diferenciação de 99%, com mais de 93% de viabilidade (**Figura Suplementar S1**).

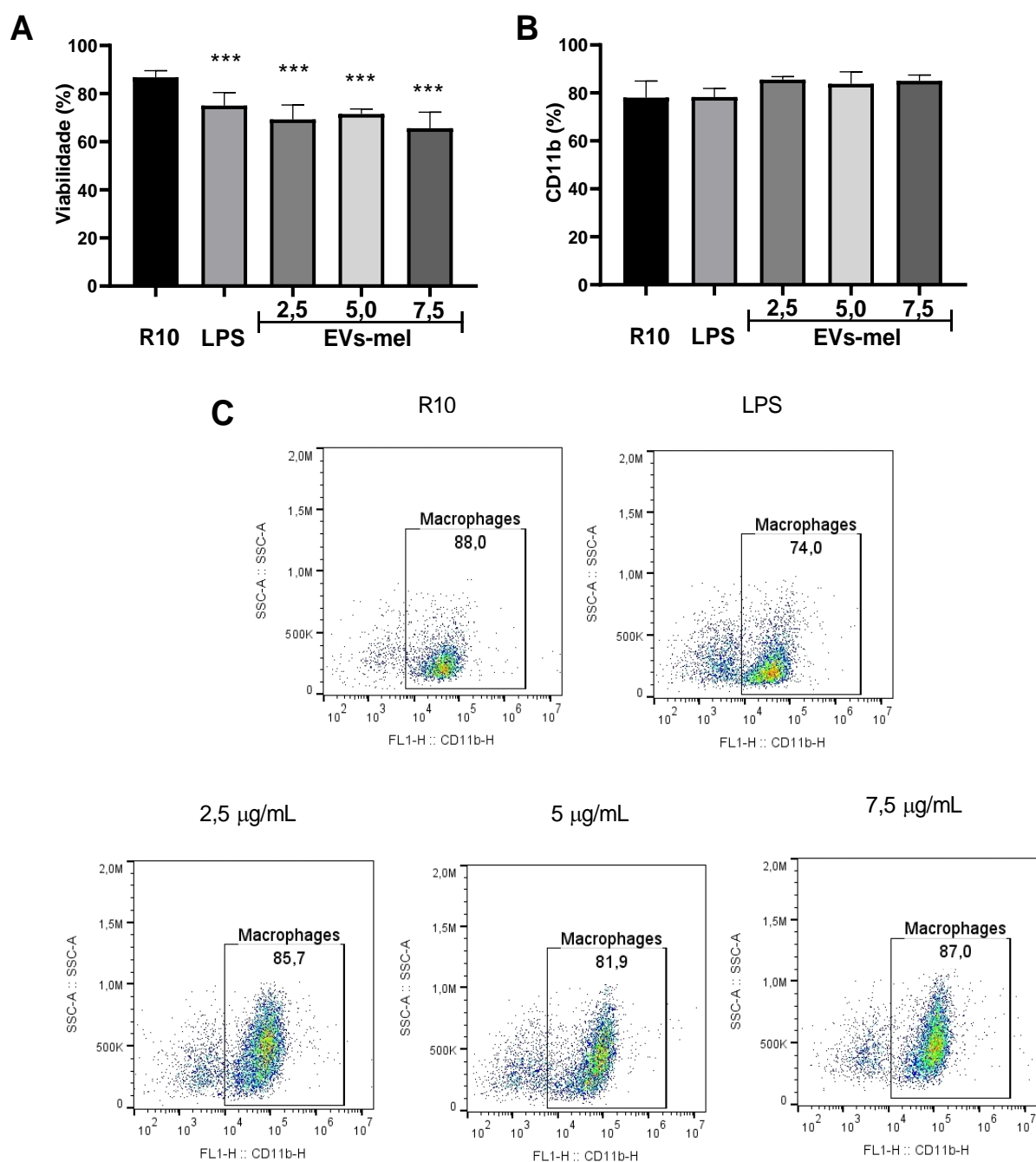
Para caracterização fenotípica dos BMDMs após tratamento com EVs liberadas por células de melanoma B16F10 após 48 horas de cultura (EVs-mel) foram utilizados marcadores associados aos perfis M1 (iNOS, CD40, CD86 e MHCII) e M2 (CD206 e IL-10). Análise da viabilidade mostrou que houve diferença significativa na viabilidade entre os grupos testados [ $F(4,34)=2,571$ ,  $p<0,001$ ]. Pós-teste de Tukey mostrou menor viabilidade nos grupos tratados com LPS e EVs-mel em todas as concentrações (2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{g/mL}$ ), em relação ao grupo não tratado (R10,  $p<0,001$ ) (**Figura 3A**). Análises da expressão de CD11b (**Figuras 3B,C**) mostrou que o percentual de BMDMs após 48 horas de cultura foi em média de 82%, não havendo diferença significativa entre os grupos analisados.

Para marcadores associados ao perfil M1 (**Figura 4**), teste ANOVA de uma via demonstrou que houve diferença significativa no percentual e MFI para iNOS [ $F(4,15)=10,24$   $p=0,0003$  e  $F(4,15)=17,84$ ,  $p<0,000001$ , respectivamente] e IL-12 [ $F(4,15)=4,94$   $p=0,009$  e  $F(4,15)=4,58$ ,  $p=0,01$ , respectivamente]. Não houve diferença significativa no percentual ou MFI para CD40 e CD86/MHCII ( $p>0,05$ )

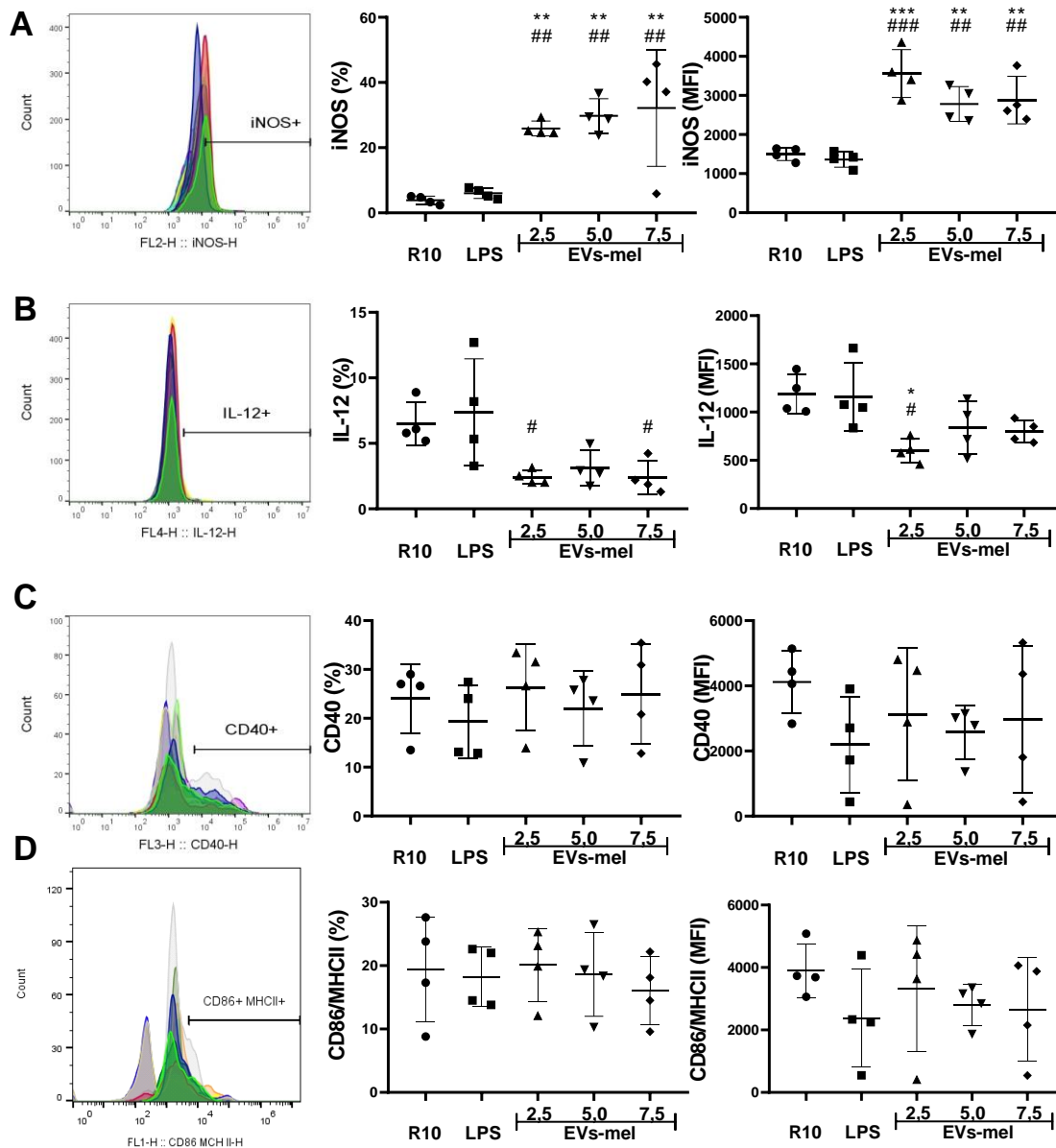
Pós-teste de Tukey evidenciou que houve maior percentual de expressão de iNOS nos grupos tratados com EVs-mel em todas as concentrações 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{g/mL}$  em relação ao grupo controle ( $p=0,01$ ,  $p=0,004$  e  $p=0,002$ , respectivamente). De forma semelhante, houve maior MFI nestes grupos ( $p<0,00001$ ,  $P=0,0034$  e  $p=0,001$ , respectivamente). Este aumento também foi observado em relação ao LPS tanto no percentual de células ( $p=0,03$ ,  $p=0,009$ ,  $p=0,004$ ) como no MFI ( $p<0,00001$ ,  $p=0,003$  e  $p=0,001$ , respectivamente).

Em relação ao IL-12, o pós-teste de Tukey mostrou menores percentuais de células IL-12+ nos grupos tratados com 2,5 e 7,5  $\mu\text{g/mL}$  de EVs-mel quando comparadas ao grupo LPS ( $p=0,036$  e  $p=0,035$ , respectivamente). No MFI houve menor intensidade no grupo que recebeu 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de EV em relação ao grupo R10 ( $p=0,021$ ) e LPS ( $p=0,029$ ).

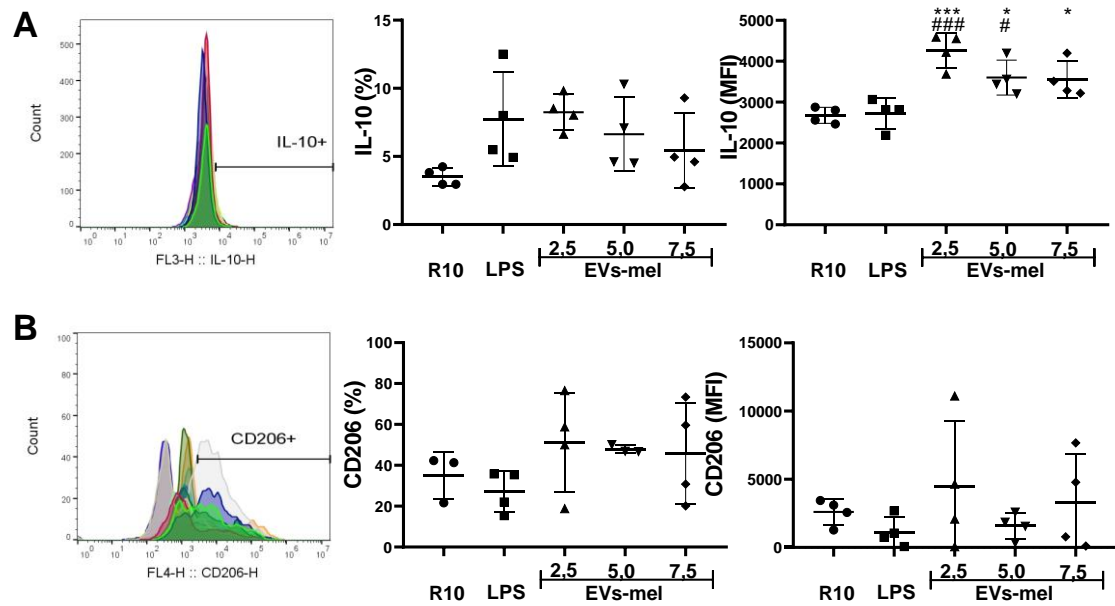
Na análise dos marcadores associados ao perfil M2 (**Figura 5**), para IL-10 houve diferença significativa no MFI [ $F(4,15)=12,11$ ,  $p=0,0001$ ], onde pós-teste de Tukey evidenciou maior MFI nos grupos tratados com EVs-mel em relação aos grupos R10 ( $p=0,0002$ ,  $p=0,02$  e  $p=0,03$ , respectivamente) e LPS ( $p=0,03$ ,  $p=0,0003$  e  $p=0,03$ , respectivamente). No percentual, não houve diferença significativa. Para CD206, não houve diferença no percentual nem no MFI na comparação entre todos os grupos ( $p>0,05$ ).



**Figura 3 |** Análise da diferenciação e viabilidade após tratamento com EVs-mel. BMDMs cultivados em R10 ou tratados com EVs de células B16F10, nas concentrações de 2,5, 5 ou 7,5 µg/mL por 48 horas ou com LPS por 24 horas foram coletadas para determinar percentual de células diferenciadas (CD11b) e viabilidade celular (7AAD). **(A)** Histograma representativo do percentual de células viáveis **(B)** Percentual de expressão de CD11b. **(C)** Gráficos representativos do percentual de células diferenciadas em macrófagos considerando a expressão de CD11b. Barras representam média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, dados analisados em quadruplicata. \*\*\* indica  $p < 0,001$ ,  $\alpha = 0,05$ .



**Figura 4 |** Análise fenotípica de moléculas do padrão M1 em BMDMs após tratamentos com EVs-mel. BMDMs foram cultivados com EVs nas concentrações de 2,5, 5 e 7,5 µg/mL e submetidos a análises de expressão por citometria de fluxo de marcadores associados ao perfil M1: **(A)** iNOS, **(B)** IL-12, **(C)** CD40 e **(D)** CD86/MHCII. Coluna 1 mostra a distribuição (histograma) da expressão de cada molécula, coluna 2 a representação gráfica do percentual de células positivas para cada marcador e, coluna 3 corresponde à intensidade média de expressão (MFI) de cada marcador. Como controles, macrófagos foram cultivados com R10, com ou sem adição de LPS. Teste ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey. Dados analisados em quadruplicata apresentados com média  $\pm$  desvio padrão \* Indica diferença em relação ao grupo R10, # Indica diferença em relação ao grupo LPS. \* e # indicam  $p < 0,05$ , \*\* e ## indicam  $p < 0,01$ , \*\*\* e ### indicam ( $p < 0,001$ ),  $\alpha = 0,05$ .



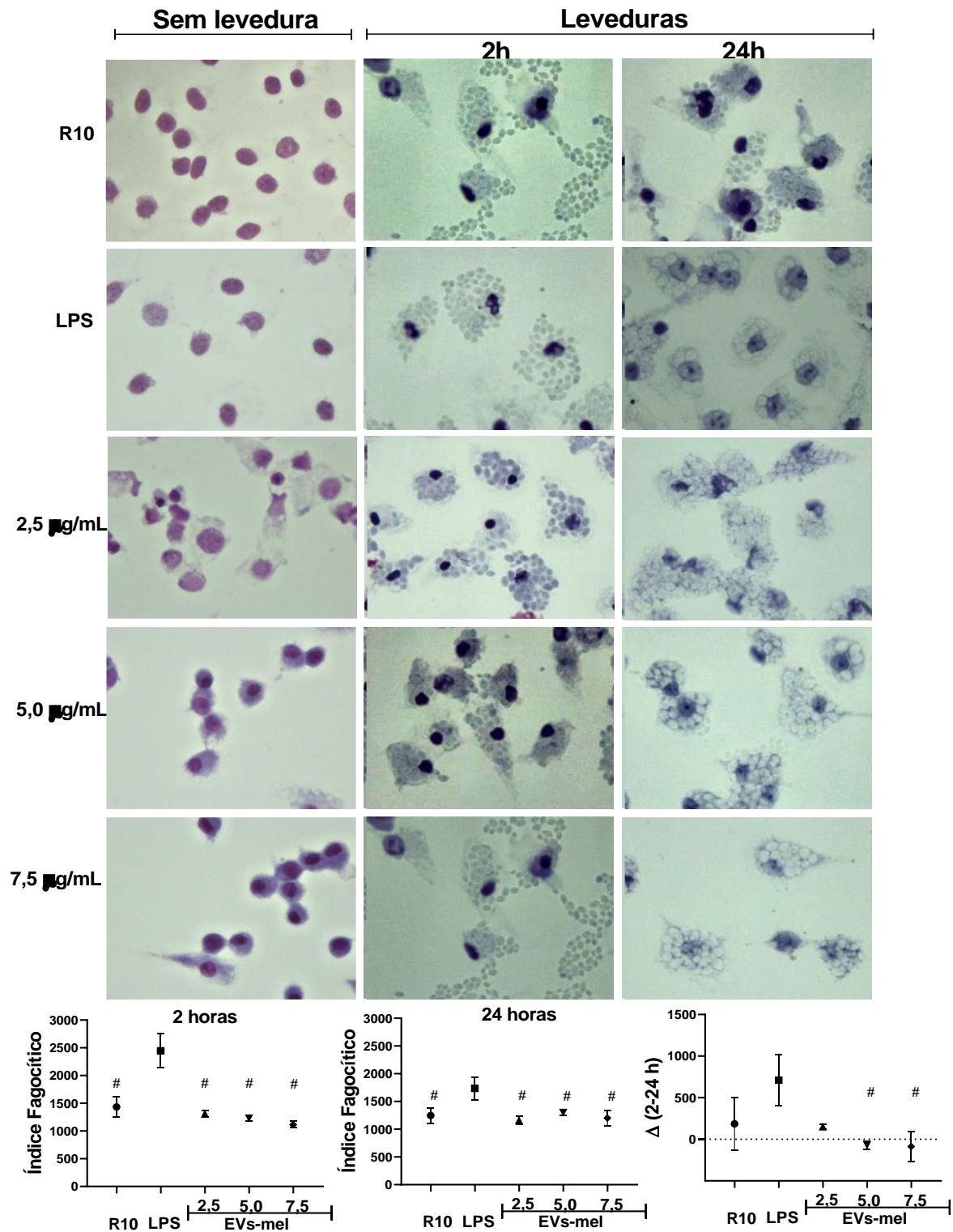
**Figura 5 |** Análise fenotípica de moléculas do padrão M2 em BMDMs após tratamentos com EVs-mel. BMDMs foram cultivados com EVs nas concentrações de 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e submetidos a análises de expressão por citometria de fluxo de marcadores associados ao perfil M2: **(A)** IL-10 e **(B)** CD206. Coluna 1 mostra a distribuição (histograma) da expressão de cada molécula, coluna 2 apresenta representação gráfica do percentual de células positivas para cada marcador e, coluna 3 corresponde à intensidade média de expressão (MFI) de cada marcador. Como controles, macrófagos foram cultivados com R10, com ou sem adição de LPS. Teste ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey. Dados analisados em quadruplicata apresentados com média  $\pm$  desvio padrão \* Indica diferença em relação ao grupo R10, # Indica diferença em relação ao grupo LPS. \* e # indicam  $p < 0,05$ , \*\* e ## indicam  $p < 0,01$ , \*\*\* e ### indicam ( $p < 0,001$ ),  $\alpha = 0,05$ .



### **EVs derivadas de células B16F10 após 48 horas em cultura não influenciam na fagocitose de BMDMs**

Foi determinado o índice fagocítico de BMDMs após tratamento com EVs de células B16F10 após 48 horas em cultura em três concentrações diferentes, utilizando o modelo *in vitro* de fagocitose com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 6**). ANOVA de uma via foi conduzida para analisar a diferença no índice fagocítico entre os grupos mostra diferença significativa entre os grupos nos tempos de 2 [F(4,10)=32,05,  $p < 0,0001$ ] e 24 horas [F(4,10)=9,48,  $p < 0,01$ ],  $p < 0,001$ ]. Duas horas após cultivo com leveduras pós-teste de Tukey mostrou diferenças no índice fagocítico nos grupos: macrófagos com LPS e macrófagos sem tratamento (R10) ( $p = 0,0001$ ), tratados com EVs-mel nas concentrações de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0,0001$ ), 5,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0,0001$ ) e 7,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $p = 0,0001$ ). Diferença significativa foi observada também entre estes grupos no tempo de 24 horas,  $p = 0,0072$ ,  $p = 0,0022$ ,  $p = 0,015$  e  $p = 0,0038$ , respectivamente. Por outro lado, não houve diferença significativa nos macrófagos tratados com EVs-mel quando comparados ao grupo não tratado (R10) nos dois tempos ( $p > 0,05$ ).

Foi analisado o delta ( $\Delta$ ) pela subtração do índice fagocítico do tempo de 24 horas no índice fagocítico em 2 horas. ANOVA de uma via indicou que houve diferenças entre os grupos [F(4,10)=6,88,  $p < 0,01$ ],  $p = 0,0063$ ] e pós-teste de Tukey revelou que a diferença foi maior no grupo LPS em relação ao grupo tratado com 5 e 7,5  $\mu\text{g/mL}$  de EVs-mel, respectivamente  $p = 0,008$  e  $p = 0,0006$ . Não houve diferença significativa entre grupo tratado com 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de EVs-mel e LPS, assim como das três concentrações de EVs mel em relação ao grupo R10 ( $p > 0,05$ ).



**Figura 6 |** Influência das EVs-mel na capacidade fagocítica de BMDMs - BMDMs foram cultivados sob lamínulas em placas de 24 poços com meio R10 acrescido ou não de EVs-mel nas concentrações de 2,5, 5 e 7,5 µg/mL ou com 100 ng/mL de LPS. Após 48 horas do tratamento, sobrenadante foi removido e substituído por meio novo contendo leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Após 2 ou 24 horas do desafio, lamínulas foram coletadas. Novo cultivo foi realizado nos grupos de 24 horas com meio novo livre de leveduras e após respectivo período lamínulas foram coletadas. Lamínulas foram coradas por *Giemsa* para determinação do índice fagocítico. Foi avaliada diferença entre índice fagocítico do tempo de 2 horas e 24 horas ( $\Delta$ ). Comparações múltiplas foram realizadas por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey. # Indica diferença em relação ao LPS. Dados analisados em triplicada apresentados com média  $\pm$  desvio padrão,  $\alpha=0,05$ .

### **EVs derivadas de células B16F10 coletadas após 48 horas de cultura aumentam produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em BMDMs**

Uma vez que o tratamento de BMDMs com EVs-mel induziu alterações no perfil fenotípico destas células, foi verificada a produção de citocinas referentes aos perfis Th1 e Th2 após diferentes condições. Após 48 horas do tratamento com EVs-mel (**Figura 7**), BMDMs exibiram aumento expressivo nas concentrações das citocinas TNF- $\alpha$  ( $F(4,15)=8,677$   $p=0,0007$ ), e IL-6 ( $F(4,15)=10,24$ ,  $p<0,0003$ ), em relação ao grupo R10 (**Figura 7 A,B**). A citocina IL-10 não foi detectada no grupo R10 e teve produção expressiva nos grupos tratados com EVs-mel (**Figura 7C**), entretanto este aumento foi inferior ao do grupo LPS [ $F(4,15)=10$   $p=0,0004$ ]. Como esperado, para as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-17, houve produção pouco significativa, não havendo diferença entre os grupos (**Figura Suplementar S2**).

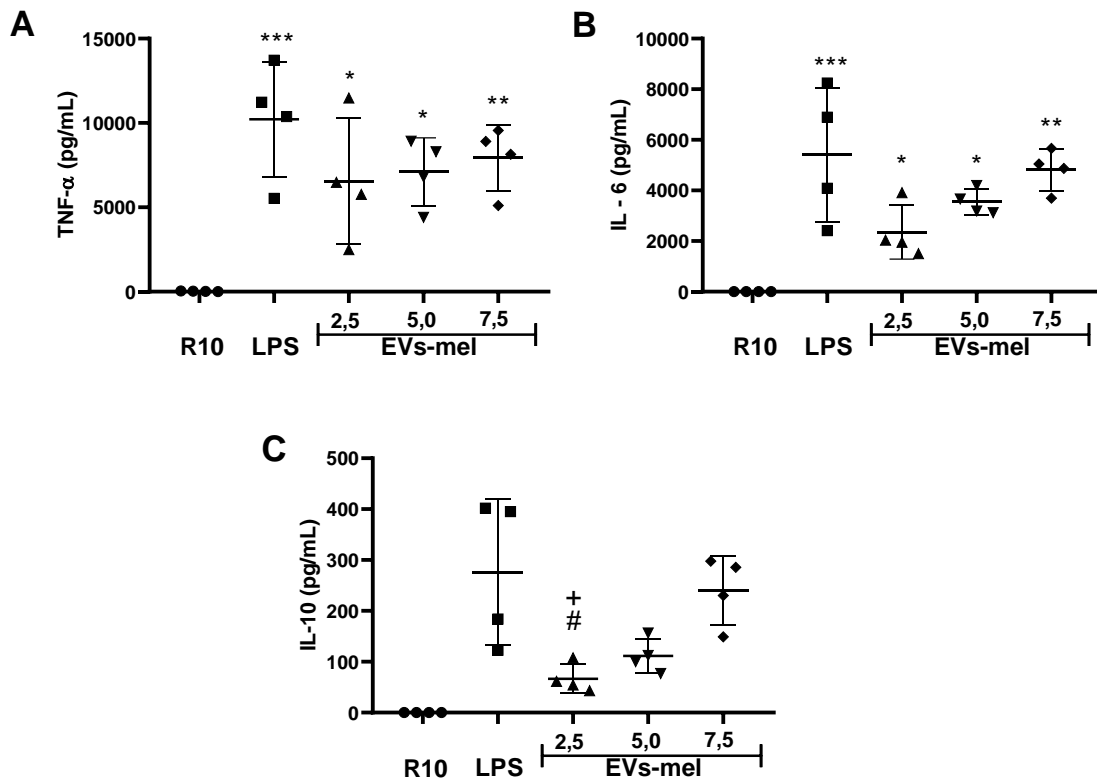
Uma vez que houve produção de citocinas de perfil Th1 (TNF- $\alpha$  e IL6) e Th2 (IL-10), foi realizada análise da razão entre TNF- $\alpha$ /IL-10 e IL-6/ TNF- $\alpha$ . Conforme observado na **Figura 8**, foi maior a razão das citocinas de perfil Th1 em relação a citocina de perfil Th2. ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey indicou que houve aumento desta razão em BMDMs tratados com EVs-mel, tanto em relação ao TNF- $\alpha$  ( $F(4,15)=9,422$   $p=0,0005$ ), quanto para IL-6 ( $F(4,15)=20,51$   $p<0,0001$ ).

Adicionalmente, análises da produção de citocinas foi realizada nos sobrenadantes de cultura coletados 2 e 24 horas após desafio com leveduras. Para avaliar se houve diferenças no perfil de citocinas produzidas pelos BMDMs pós ensaio de fagocitose, teste t de *student* foi empregado para análises individuais de cada citocina, comparando grupos cultivados com leveduras com grupos sem leveduras (controle).

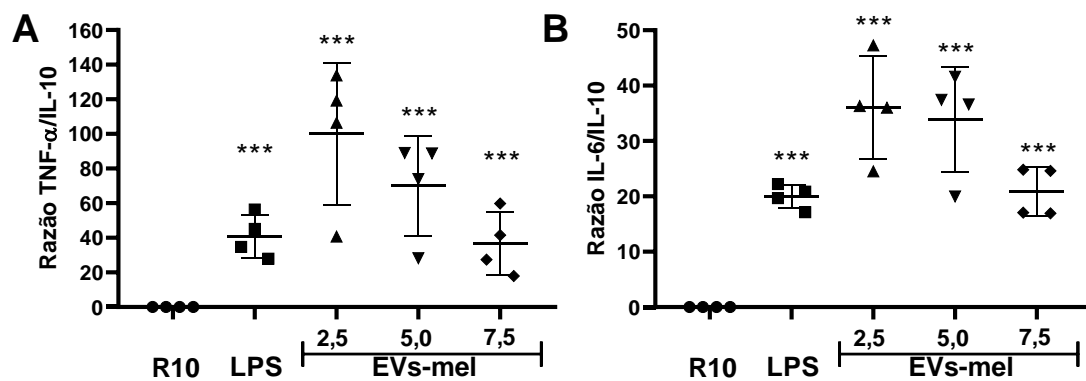
Após duas horas de cultivo com leveduras, a citocina TNF- $\alpha$  (**Figura 9A**) passou a ser produzida quando BMDMs foram cultivados com leveduras no grupo R10. Houve diminuição da produção de TNF- $\alpha$  no grupo cultivado com 7,5 $\mu$ g/mL e leveduras ( $p=0,01$ ) e não houve diferença para grupos LPS, 2,5 e 7,5  $\mu$ g/mL. Em relação à produção de IL-6 (**Figura 9B**), houve menor produção da citocina no grupo cultivado com 7,5  $\mu$ g/mL e leveduras ( $p=0,001$ ), entretanto não houve diferença significativa em relação aos grupos R10, LPS, 2,5, 5 e 7,5  $\mu$ g/mL. Para IL-10 (**Figura 9C**) não houve diferença significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ).

Análise individual das citocinas para o tempo de 24 horas mostrou que teve aumento significativo de TNF- $\alpha$  (**Figura 9A**) nos grupos tratados com 2,5 e 7,5  $\mu$ g/mL em relação ao grupo controle R10 ( $p=0,003$  e  $p=0,03$ , respectivamente). Não houve diferença significativa na citocina IL-6 (**Figura 9E**), com  $p>0,05$ . Citocina IL-10 não foi detectada em nenhum dos grupos após 24 horas do cocultivo com leveduras.

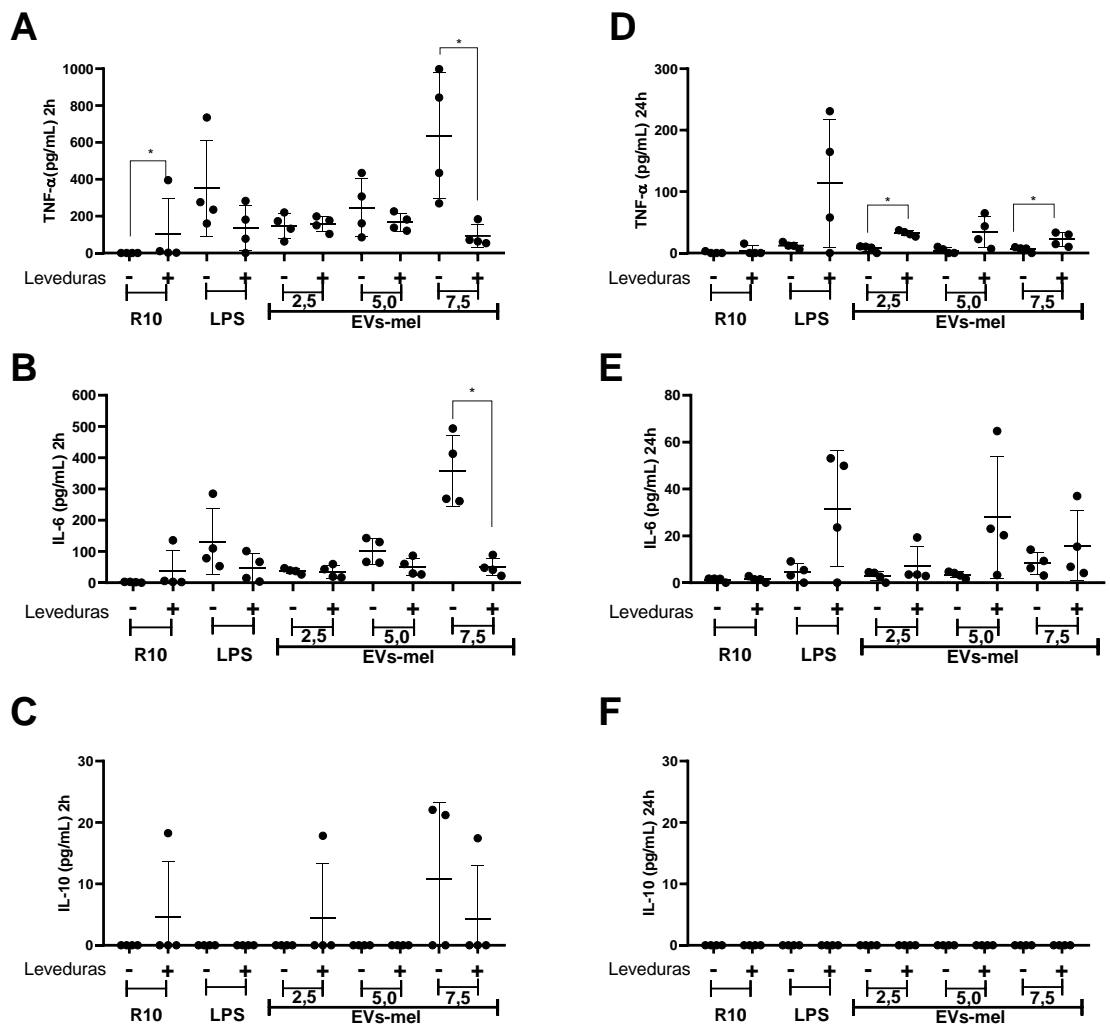
Houve produção pouco significativa das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-17 e os resultados estão agrupados na **Figura Suplementar S3**.



**Figura 7** | Avaliação do perfil de citocinas em BMDMs após tratamento com EVs-mel. Sobrenadantes de culturas foram coletados após 48 horas de tratamento com EVs-mel nas concentrações de 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{g/mL}$  ou 100 nm/mL de LPS por 24 horas para quantificação das citocinas: TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) e IL-10 (C). Teste ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey. Dados analisados em quadruplicata apresentados com média  $\pm$  desvio padrão \* Indica diferença em relação ao grupo R10, # Indica diferença em relação ao grupo LPS. \* e # indicam  $p < 0,05$ , \*\* indica  $p < 0,01$ , \*\*\* indica ( $p < 0,001$ ),  $\alpha = 0,05$ .



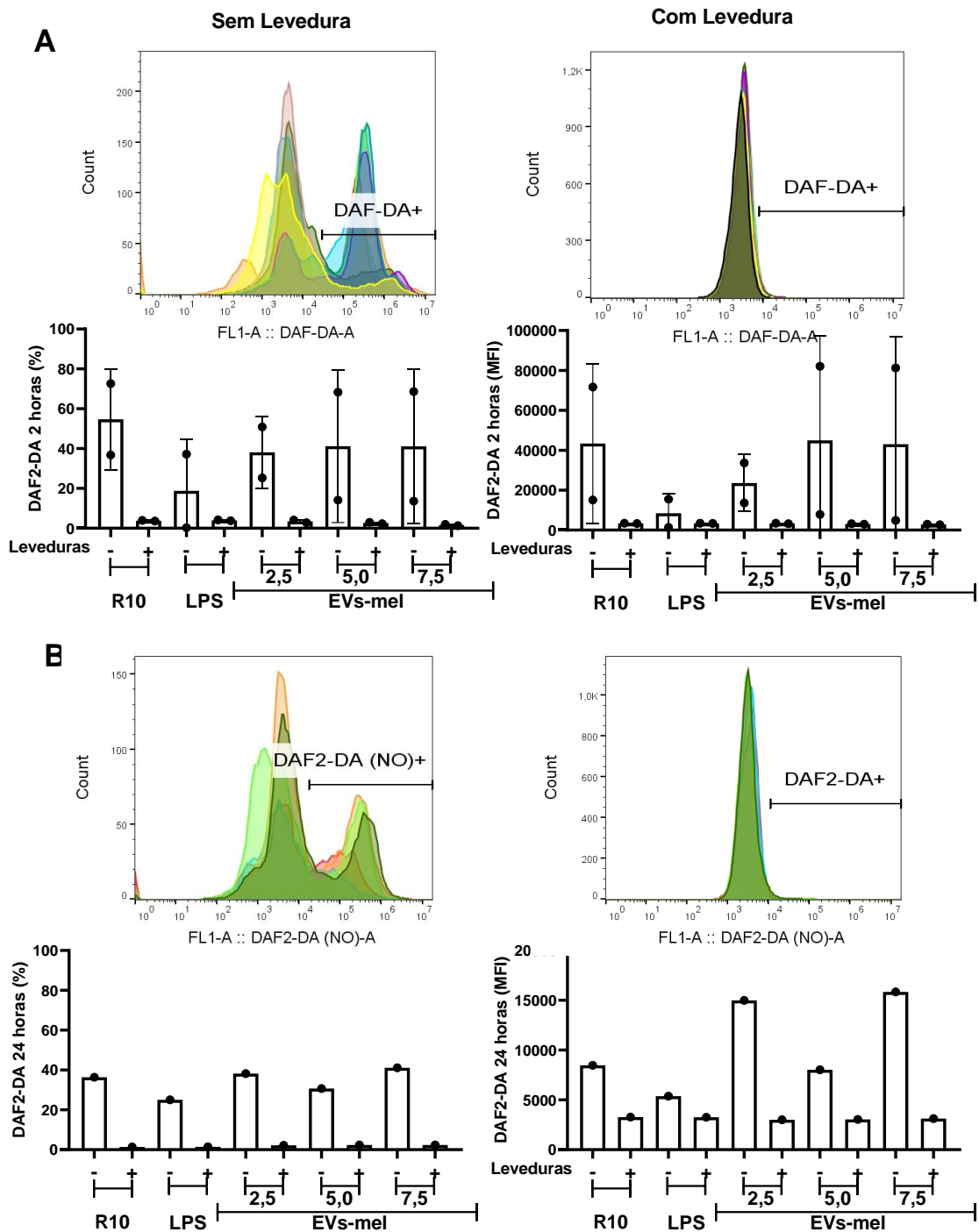
**Figura 8** | Razão entre citocinas Th1/Th2. Foi realizada razão entre produção de TNF- $\alpha$  por IL-10 (A) e IL-6 por IL-10 (B). Teste ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey. Dados analisados em quadruplicata apresentados com média  $\pm$  desvio padrão \*\*\* Indica diferença em relação ao grupo R10 com  $p < 0,001$ ,  $\alpha = 0,05$ .



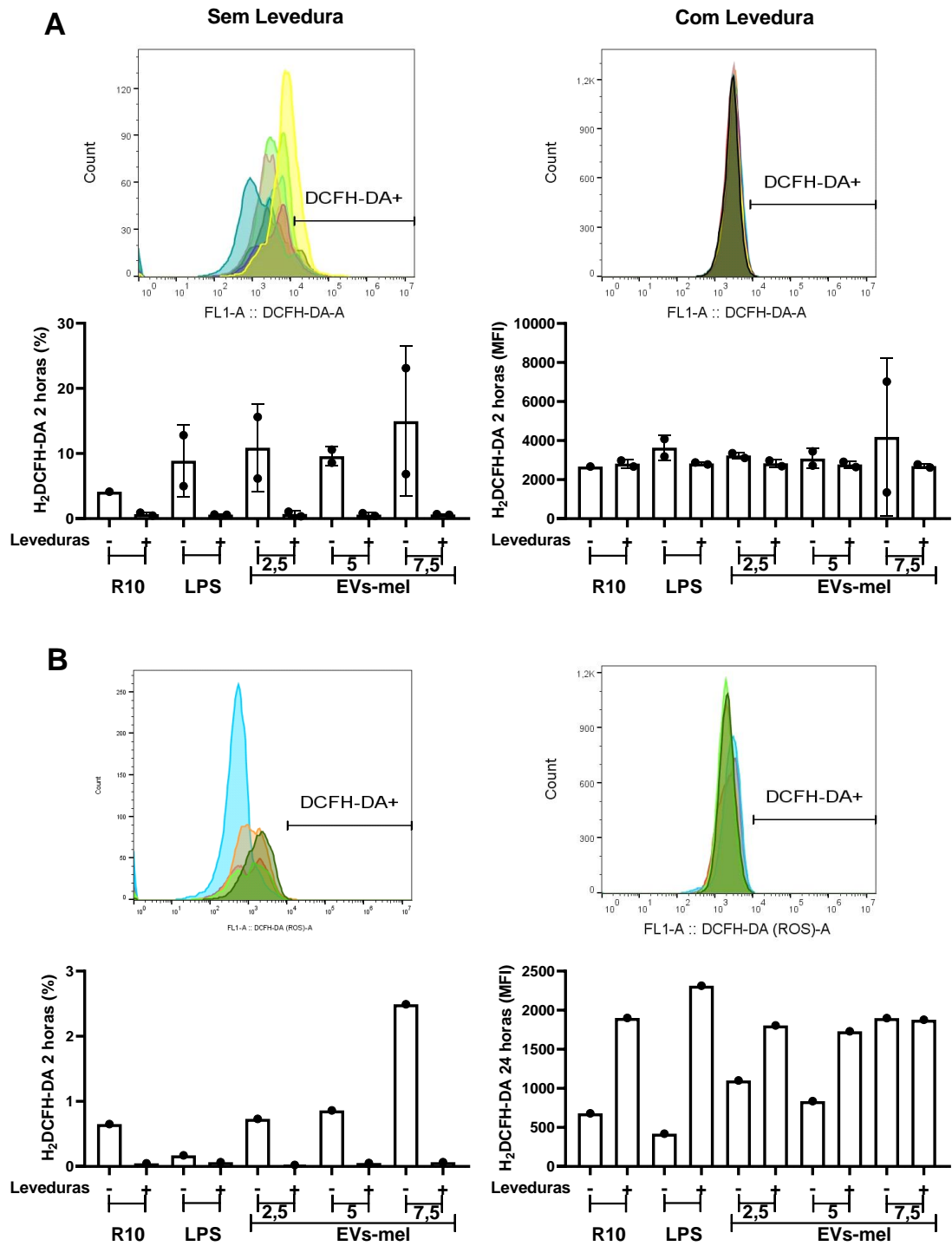
**Figura 9** | Perfil de citocinas 2 e 24 horas após cocultivo ou não com leveduras. BMDMs tratados ou não com EVs-mel por ou LPS por 24 horas foram desafiados ou não com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* por 2 horas para coleta e análises da produção de citocinas de perfil Th1 e Th2. Para análises de 24 horas, após cocultivo por duas horas com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, meio foi substituído por meio novo livre de leveduras, permanecendo em cultura por mais 24 horas para coleta do sobrenadante. TNF-α 2 horas (A), IL-6 2 horas (B), IL-10 2 horas (C), TNF-α 24 horas (D), IL-6 24 horas (E), IL-10 24 horas (F), IL-2 (G), IL-10 (E), IL-4 (F) e IL-17 (G). Teste t *student*. \* Indica diferença em relação ao grupo sem levedura. Dados analisados em quadruplicata apresentados como média ± desvio padrão,  $\alpha=0,05$ .

### **Tratamento com concentrações maiores de EVs tendem a aumentar a produção de ROS intracelular e óxido nítrico em BMDMs**

As Figuras 10 e 11 mostram dados preliminares do percentual e MFI da expressão da DAF2-DA (4-amino5-metilamino-2,7-difluorosceína diacetato) que interage com NO intracelular e H<sub>2</sub>DCFHDA, que interage com ROS intracelular respectivamente nos tempos de 2 (**Figura 10A e 11A**) e 24 horas (**Figura 10B e 11B**) após ensaio de fagocitose, em BMDMs cocultivados ou não com leveduras. Dados apresentados sugerem tendência de aumento na produção de ROS e NO em grupo de BMDMs tratados com 7,5 µg/mL de EVs-mel. Entretanto, estes dados são preliminares e necessitam de confirmação com maior número de amostras.



**Figura 10** | Expressão de DAF-DA (4-amino5-metilamino-2,7-difluoroscéina diacetato). BMDMs tratados com EVs coletadas de células B16F10 cultivadas por 48 horas na ausência de SFB ou LPS por foram desafiados ou não com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (1:10) por 2 horas. Após desafio células aderidas foram lavadas e incubadas por 1 h com sonda DAF2-DA para determinar a produção de NO intracelular após 2 (A) ou 24 horas (B) do desafio com leveduras.



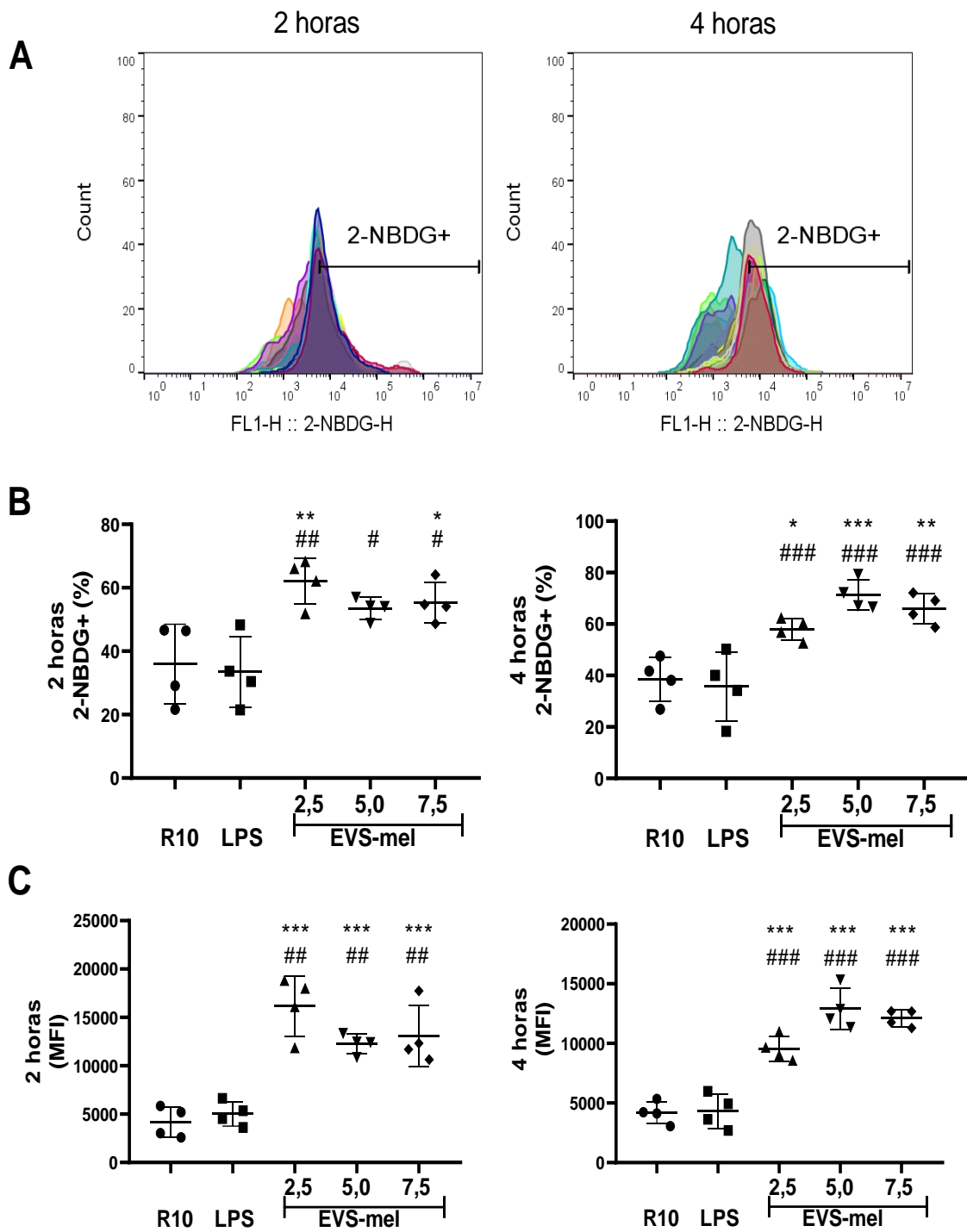
**Figura 11** | Expressão de H<sub>2</sub>DCFHDA. BMDMs tratados com EVs coletadas de células B16F10 cultivadas por 48 horas na ausência de SFB ou LPS por foram desafiados ou não com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (1:10) por 2 horas. Após desafio células aderidas foram lavadas e incubadas por 1 h com sonda H<sub>2</sub>DCFHDA para determinar a produção de ROS intracelular em 2 (**A**) ou após 24 horas (**B**) do desafio com leveduras.



### **BMDMs tratados com EVs liberadas por células B16F10 tiveram maior captação de glicose**

A fim de verificar o consumo de glicose em cada condição experimental foi avaliada a captação de glicose em BMDMs tratados com EVs-mel ou LPS após 2 ou 4 horas da adição de 2-NBDG, um análogo fluorescente de glicose (**Figura 12B**). ANOVA de uma via foi conduzida mostrando diferença significativa no percentual de células 2-NBDG+ em ambos os tempos [ $F(4,15)=8,22$ ,  $p=0,001$  e  $F(4,15)=17,937$ ,  $p=0,00001$  respectivamente]. Análise pós-teste de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos no tempo de duas horas indicou maior percentual de expressão de 2-NBDG nos grupos cultivados com 2,5 e 7,5  $\mu\text{g/mL}$  de EVs-mel tanto em relação ao grupo não tratado (R10) ( $p=0,006$ ,  $p=0,04$ , respectivamente) como ao grupo tratado com LPS ( $p=0,002$ ,  $p=0,03$ ,  $p=0,02$ , respectivamente). Análises dos BMDMs coletados após quatro horas de incubação com 2-NBDG também mostraram maior percentual nos grupos cultivados com EVs-mel quando comparadas ao grupo R10 ( $p=0,03$ ,  $p=0,004$ ,  $p=0,02$ , respectivamente) como ao grupo LPS ( $p=0,01$ ,  $p=0,0001$ ,  $p=0,09$ , respectivamente).

De forma semelhante, na análise da Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) (**Figura 12C**), houve diferença significativa nos dois tempos, [ $F(4,15)=22,3$   $p<0,0001$  e  $F(4,15)=9,23$ ,  $p=0,00057$ , respectivamente]. Pós-teste de Tukey revelou que grupos tratados com EVs-mel apresentaram maior MFI em relação aos grupos R10 ( $p=0,00001$ ,  $p=0,0009$  e  $p=0,0003$ ) e LPS ( $p=0,00003$ ,  $p=0,002$  e  $p=0,001$ ) no tempo de duas horas, assim como no tempo de quatro horas ( $p=0,0001$ ,  $p=0,000004$  e  $p=0,0001$  e  $p=0,0001$ ,  $p=0,000005$  e  $p=0,00001$  respectivamente).



**Figura 12** | Captação de glicose por BMDMs após tratamento com EVs-mel. BMDMs tratados ou não com EVs-mel nas concentrações de 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou 100ng/mL de LPS foram cultivados por duas ou quatro horas com RPMI livre de glicose e a captação de 2-NBDG em cada condição foi avaliada por citometria de fluxo. **(A)** Histograma representativo da expressão de 2-NBDG. **(B)** Percentual de captação de 2-NBDG. **(C)** Mediana da intensidade de fluorescência de 2-NBDG. ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, Dados analisados em quadruplicata apresentados com média  $\pm$  desvio padrão \* Indica diferença em relação ao grupo R10, # Indica diferença em relação ao grupo LPS. \* e # indicam  $p < 0,05$ , \*\* e ## indicam  $p < 0,01$ , \*\*\* e #### indicam ( $p < 0,001$ ),  $\alpha = 0,05$ .

## DISCUSSÃO

Estudos sobre o papel das vesículas extracelulares (EVs) derivadas de células tumorais são cada vez mais promissores, por refletir a natureza e *status* de suas células produtoras e por sua capacidade de mediar comunicação intercelular. Assim, diversos estudos buscam caracterizar a composição dessas EVs, analisando seu perfil proteômico, expressão gênica ou presença de miRNAs tumorais (Porcelli et al., 2021; Luan et al., 2021; Pietrowska et al., 2021). Uma vez que EVs carregam moléculas de sua célula produtora, estudos procuram estabelecer o potencial das EVs como biomarcador prognóstico e preditivo, correlacionando seu conteúdo molecular com resultados clínicos ou avaliando seu potencial para monitorar a resposta ao tratamento em pacientes com melanoma metastático (Xiong et al., 2020; Clark et al., 2020; Biagioni et al., 2021).

Além de fornecer informações sobre a célula originária, na medida em que contêm proteínas, lipídios, DNA, RNAs ou miRNAs da sua célula produtora, seu conteúdo molecular é bioativo e, uma vez liberado para o meio extracelular, podem ser transportadas para outras células presentes no microambiente tumoral ou células distantes, atuando como mensageiros tumorais. (Porcelli et al., 2021). Ao serem internalizadas pelas células receptoras, EVs transmitem o conteúdo da célula tumoral para outras células, chegando a modular vias de sinalização, expressão gênica e fenótipo celular (Alegre et al. 2015). Esta comunicação frequentemente é associada ao prognóstico ruim da doença, criando um ambiente favorável para desenvolvimento de metástases e escape da vigilância imunológica, promovendo o desenvolvimento do tumor (Hood et al., 2011; Daßler-Plenker et al., 2020).

Neste contexto, Pietrowska e colaboradores (2021) compararam o perfil proteômico das EVs derivadas de células de melanoma com EVs produzidas por células não malignas e sugeriu que o perfil proteico de EVs de melanoma desempenha um papel fundamental na progressão e metástase (Pietrowska et al., 2021). Luan e colaboradores (2021) entre outros pesquisadores, identificaram aumento na expressão dos miRNAs miR-106b-5p, miR-191 e let-7a em pacientes com melanoma sugerindo que estes miRNAs atuam na transição epitelial-mesenquimal, processo celular que favorece a tumorigênese, invasão e a metástase das células tumorais (Vella 2014; Greening et al., 2015; Xiao et al., 2016; Luan et al., 2021). Hu e colaboradores identificaram que exossomos derivados de melanoma induziram a reprogramação de fibroblastos em fibroblastos associados ao câncer (Hu et al., 2019). Wang e colaboradores corroboraram com estes dados ao identificarem maior capacidade invasiva em fibroblastos tratados com exossomos derivados de células de melanoma, por meio da maior expressão de metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), provavelmente promovido pela ação do miR-21 (Wang et al., 2019). Além da influência no microambiente tumoral, já foi demonstrado que EVs de melanoma atuam na promoção de um nicho pré-metastático nos linfonodos, encéfalo e pulmão, ativando sinalização pró-inflamatória e angiogênica (Hood et al., 2011). EVs de melanoma também mostraram direcionar células progenitoras da medula óssea para um fenótipo favorável à angiogênese e metástase (Peinado et al., 2012).

Células do sistema imunológico exercem grande influência no comportamento do tumor e diversos estudos avaliam a quantificação do infiltrado de células imunes no tumor, a fim de avaliar o seu valor prognóstico, como no *Immunescore* (Marliot et al., 2019). Neste cenário, Chen e colaboradores (2019) demonstraram que melanomas metastáticos liberam EVs contendo PD-L1 em sua superfície, o que

suprime a função das células T CD8 e facilita o crescimento do tumor (Chen et al., 2019). Também podem expandir populações de células supressoras como células T regulatórias (T reg) e mieloides e impedir a produção de perforina e granzima pelas células *natural killer*, proteínas importantes para sua função efetora (Tucci et al., 2018). Neutrófilos tratados com exossomos derivados de células de melanoma são direcionados para um fenótipo pró-tumoral (Guimarães-Bastos et al., 2021). Macrófagos também demonstraram ter seu fenótipo alterado após tratamento com EVs de melanoma (Bardi et al., 2018).

O macrófago é uma das células imunológicas de maior destaque no microambiente tumoral, uma vez que possui alta plasticidade podendo sofrer alterações fenotípicas e funcionais em resposta ao microambiente (Italiani, et al., 2014; O'Neil et al., 2016, Rabold et al., 2017; Tucci et al., 2018). No presente trabalho, investigamos o perfil de ativação de macrófagos por meio de marcadores associados aos perfis M1 e M2. Análises dos dados mostraram aumento na expressão de marcadores de ambos os perfis, com aumento de expressão de iNOS (M1) e IL-10 (M2). Já foi demonstrado que EVs derivadas de melanoma promovem uma polarização mista de macrófagos aumento da produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10, além de expressão de marcadores comuns aos perfis M1 e M2 (Bardi et al., 2018). Os resultados encontrados em nosso estudo corroboram com dados da literatura ao mostrar maior expressão de marcadores referentes aos dois perfis de ativação e, aumento da produção das citocinas do perfil M1: TNF- $\alpha$  e IL-6 e do M2: IL-10, em células cultivadas com EVs liberadas por células de melanoma em 48h (EVS-mel) em relação ao grupo controle. Embora na avaliação de marcadores expressos nos macrófagos não se tenha observado aumento significativo na sua expressão em células tratadas com LPS, na análise do perfil de citocinas produzidas por estas células foi possível observar padrão de produção semelhantes entre macrófagos cultivados com EVs-mel e cultivados com LPS. Análises da razão entre citocinas de perfil M1 (TNF- $\alpha$  e IL-6) e perfil M2 (IL-10) foi demonstrado que o aumento das citocinas pró-inflamatórias foi muito mais expressivo nos grupos tratados principalmente com EVs-mel.

Análise do perfil de citocinas de BMDMs obtidos no ensaio de fagocitose, que tradicionalmente direciona macrófagos desafiados para um perfil M1, mostrou que, antes mesmo do estímulo pelas leveduras, células já apresentaram perfil inflamatório com produção elevada das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6. Cabe ainda acrescentar, que as citocinas IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-17, como esperado, não são produzidas por macrófagos, por isto os níveis foram quase indetectáveis.

No contexto do microambiente tumoral, macrófagos de perfil inflamatório geralmente estão associados a um bom prognóstico, uma vez que possuem alta capacidade de apresentação de antígenos e são altamente pró-inflamatórios e microbicidas, mostrado pela maior produção de IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$  e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, importantes em suas funções efetoras (Covarrubias et al., 2013). Entretanto, alguns fatores tradicionalmente associados a uma resposta antitumoral já demonstraram exercer funções de suporte ao melanoma. Como por exemplo a citocina TNF- $\alpha$ , importante pró-inflamatória que participa na imunidade antitumoral mediada por M1, mas mostrou atuar na promoção da angiogênese tumoral, remodelação vascular e linfangiogênese (Baluk et al., 2009; Kim et al., 2010).

A citocina pró-inflamatória IL-6 também pode estimular o crescimento de células tumorais e facilitar a invasão e metástase, com importante papel na angiogênese (Gopinathan et al., 2015). A alta expressão da citocina IL-6 já foi correlacionada como um fator de risco na sobrevida de pacientes com melanoma, com

a carga tumoral e resistência à terapia (Soubrane et al., 2005; Mouawad et al., 2006; Yurkovetsky et al., 2007). Exossomos tumorais liberados na circulação induziram produção de IL-6 na medula óssea impedindo diferenciação de células dendríticas, levando à deficiência na apresentação de antígenos (Yu et al., 2007). IL-6 produzidas por macrófagos já levaram a indução da expressão de IL-10 em células tumorais, levando a um ambiente imunossupressor (Herbeuval et al., 2004).

A citocina IL-10 pode favorecer o crescimento tumoral por sua regulação negativa na resposta antitumoral e está correlacionada com uma sobrevida menor em pacientes com melanoma avançado (Torisu-Itakura et al., 2007; Wiguna et al., 2015). A literatura descreve uma relação entre IL-10 e TNF- $\alpha$ , uma vez que esta citocina pode induzir a expressão de IL-10, assim como IL-10 pode suprimir TNF- $\alpha$  (Bardi et al., 2018). Este evento pode estar correlacionado com mecanismos de controle da resposta inflamatória, dado o papel regulador de IL-10.

A enzima i-NOS pode ser superexpressa em células de melanoma e pode promover angiogênese e a proliferação de células tumorais (Lopez-Rivera et al., 2014). Uma vez que EVs produzidas por células tumorais podem transportar moléculas de sinalização, mRNAs ou miRNAs ou associadas à via i-NOS presentes em células de melanoma, estes podem ser retransmitidos para macrófagos via exossomos (Valadi et al., 2007).

Evidências mostram que os diferentes fenótipos de macrófagos são regulados por seu metabolismo celular, para se ajustar com as necessidades energéticas das células (Van den Bossche et al. 2017). A literatura descreve que macrófagos de perfil inflamatório apresentam elevada captação de glicose com indução de transportador de glicose GLUT1 e metabolismo dependente da glicólise anaeróbica (Tannahill et al., 2013; Freemerman et al., 2014; Artyomov et al., 2016; O'Neill et al., 2016). Este evento recebeu o nome de Efeito Warburg, descrito por Otto Warburg durante estudo com células tumorais, processo também presente em células altamente proliferativas como os leucócitos ativados (Tannahill et al., 2013; Kelly et al., 2015). No presente estudo, análises da captação de glicose por macrófagos após tratamento com EVs-mel foi verificada por meio de um análogo de D-glicose fluorescente (2-NBDG), captado pelas células via receptor GLUT1. Resultados aqui apresentados mostram que macrófagos tratados com EVs nas três concentrações propostas apresentaram maior captação de glicose, sugerindo aumento do transportador GLUT1 na membrana.

De acordo com a literatura, além da reprogramação metabólica para a via glicolítica, em macrófagos inflamatórios há o aumento da fermentação de ácido láctico e redução da atividade do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, mesmo em normóxia (Tannahill et al., 2013). Em contraste, quando ativados pela via alternativa apresentam o ciclo do ácido tricarbóxico e fosforilação oxidativa intactos, com menor ativação da glicólise decorrente da menor captação de glicose e maior dependência de oxigênio (Rabold et al., 2017). Uma possível explicação da mudança para glicólise em macrófagos M1 é que esta alteração é importante para explosões rápidas de ativação, necessárias para funções microbicidas, uma vez que é uma via mais rápida para obter energia (O'Neill et al., 2016; Viola et al., 2019). Ativação para o perfil M2 por sua vez necessita de uma ativação mais eficiente até a resolução da inflamação, sendo necessária ativação maior das vias metabólicas mitocondriais, tornando a resposta mais lenta (O'Neill et al., 2016).

Enzimas da via glicolítica promovem funções inflamatórias em macrófagos, como a enzima Piruvato Quinase M2 (PKM2) que forma um complexo com fator 1 alfa induzível por hipóxia (HIF1 $\alpha$ ) e promove a expressão de IL-1 $\beta$ , aumentando também a expressão de IL-6 e IL-1b pela fosforilação de STAT3 (Palsson-McDermott et al.,

2015; Van den Bossche et al., 2017). As enzimas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), enolase e Hexoquinase 1 (Hk1) também contribuem para a produção de citocinas inflamatórias (Millet et al., 2016; Bae et al., 2012). A inibição do ciclo do Krebs leva ao acúmulo de seus metabólitos succinato e citrato, que também desempenham funções importantes na manutenção da resposta inflamatória (O'Neill et al., 2016). O acúmulo de succinato leva ao acúmulo de HIF1 $\alpha$  e indução de IL-1 $\beta$ , já o citrato atua na biogênese da membrana e alimenta vias que geram óxido nítrico e prostaglandina (Harber et al., 2020).

Além disso, a glicólise fornece intermediários metabólicos que podem ser incorporados à outras vias metabólicas, favorecendo síntese de moléculas importantes como ribose, aminoácidos e ácidos graxos, como por exemplo ocorre com a via das pentoses, iniciada pela enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e que ramifica da via da glicólise no intermediário glicose-6-fosfato (O'Neill et al., 2016; Singel., 2020). A via das pentoses é dividida em duas fases: não-oxidativa, onde ocorre síntese de ribose-5-fosfato, utilizada para síntese de nucleotídeos e aminoácidos, e oxidativa onde há a redução de NADP<sup>+</sup> em NADPH. Fagócitos como macrófagos e neutrófilos possuem grande atividade enzimática da NADPH oxidase, enzima responsável por oxidar o NADPH utilizada para formar espécies reativas de oxigênio (ROS) (Singel et al., 2016). O aumento da expressão do transportador de glicose GLUT1 já mostrou aumentar o fluxo por meio da via das pentoses (Nishizawa et al., 2014). Assim, o aumento na produção de ROS em macrófagos M1 é favorecido pela elevada captação de glicose que ocorre nestas células. Embora preliminares, dados obtidos no presente trabalho mostram aumento na liberação de ROS em macrófagos tratados com 7,5  $\mu$ g/mL de EVs.

Dados preliminares também apontaram tendência de aumento na produção de óxido nítrico (NO), o que pode estar correlacionado com o aumento na expressão da enzima iNOS em macrófagos tratados com EVs-mel. Entre os diferentes fenótipos de macrófagos, além de alterações em vias metabólicas alimentadas pela glicose, há também alterações entre outras vias metabólicas, dentre as quais estão vias do metabolismo de aminoácidos como por exemplo da arginina, que no macrófago M1 é convertida em NO pela enzima iNOS, enquanto no macrófago M2 é totalmente metabolizada pela enzima arginase-1 (Van den Bossche et al., 2016; Van den Bossche et al., 2017). Há uma intensa dicotomia dos efeitos do NO no câncer, onde estudos relatam sua ação em promover ações pró e antitumorais (Nath et al., 2020). Entretanto, grande parte destes achados associam elevados níveis de NO ao prognóstico ruim e evolução da doença (Yarlagadda et al., 2017).

Uma das principais funções do macrófago é a fagocitose, por meio da qual os macrófagos ingerem partículas para sua eliminação, apresentam antígenos para outras células efectoras do sistema imunológico e atuam da resposta inflamatória pela remodelação do tecido eliminando detritos (Karavitis et al., 2011). O aumento da capacidade fagocítica de macrófagos já foi correlacionado com a diminuição do crescimento tumoral no melanoma (Wang et al., 2013; Lecoultre et al., 2020). Em nosso estudo resultados mostram que não houve influência de EVs na capacidade fagocítica dos macrófagos, sugerindo que a fagocitose não é influenciada por EVs de melanoma.

Em conjunto, nossos dados sugerem que EVs-mel promovem a polarização de macrófagos para o perfil inflamatório. Esta hipótese é sustentada pelo aumento da captação de glicose, sugerindo uma reprogramação metabólica favorecendo a glicólise, também corroborando com esta hipótese o aumento expressivo de citocinas

características de macrófagos M1 e tendência de aumento na produção de ROS e NO.

Uma vez que macrófagos apresentam capacidade de alternar entre seus fenótipos de acordo com a natureza de sua ativação, a polarização de macrófagos para um perfil M1 tem sido um interessante campo para pesquisas como potencial alvo terapêutico, uma vez que M1 são associados a uma resposta antitumoral eficiente (Palmieri et al., 2017; Mehla et al., 2019). Embora o macrófago M1 e a inflamação aguda sejam fatores importantes da resposta imunológica no controle de doenças, a inflamação crônica e a criação de um microambiente inflamatório crônico estão frequentemente associadas ao desenvolvimento e progressão do câncer (Pesic et al. 2016; Suarez-Carmona et al., 2017). Este direcionamento para o perfil inflamatório abre espaço para novas pesquisas, utilizando esta característica como um alvo de futuras abordagens terapêuticas, dado a capacidade de macrófagos de perfil inflamatório no combate ao câncer. Entretanto, tendo em vista que EVs estão associadas à progressão tumoral e que vários dos fatores relacionados ao perfil M1 levam à respostas que sustentam a progressão tumoral quando presentes em um ambiente sustentado de inflamação, é concebível que esta polarização para um perfil inflamatório leve à criação de um microambiente favorável ao desenvolvimento do tumor, podendo ser este um mecanismo pelo qual as células tumorais adquirem capacidades mais agressivas. Estas hipóteses, no entanto, requerem investigação mais aprofundada em modelos *in vivo*, uma vez que os dados aqui apresentados advêm de estudos *in vitro*, com padrões limitados de respostas.

## **CONCLUSÕES**

Macrófagos tratados com EVs apresentaram maior captação de glicose, com aumento significativo de produção das citocinas de perfil M1 TNF- $\alpha$  e IL-6 e M2 IL-10 e, aumento da expressão de iNOS. Ensaio de fagocitose mostrou que EVs não influenciaram na capacidade fagocítica de macrófagos, assim como no perfil de citocinas produzidas após desafio com leveduras.

Em conjunto, dados aqui apresentados sugerem que há uma reprogramação metabólica em BMDMs tratados com EVs derivadas de células de melanoma, induzindo a uma polarização para o perfil inflamatório (M1).

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida na ausência de relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

## **DECLARAÇÃO DE ÉTICA**

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista (UNIP) sob número do protocolo 7898300819.

## **FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS

- Alegre, E., Zubiri, L., Perez-Gracia, J. L., González-Cao, M., Soria, L., Martín-Algarra, S., & González, A. (2016). Circulating melanoma exosomes as diagnostic and prognosis biomarkers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 454, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.12.031>
- Artyomov, M. N., Sergushichev, A., & Schilling, J. D. (2016). Integrating immunometabolism and macrophage diversity. *Seminars in immunology*, 28(5), 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.004>
- Bae, S., Kim, H., Lee, N., Won, C., Kim, H. R., Hwang, Y. I., Song, Y. W., Kang, J. S., & Lee, W. J. (2012).  $\alpha$ -Enolase expressed on the surfaces of monocytes and macrophages induces robust synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(1), 365–372. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102073>
- Baluk, P., Yao, L. C., Feng, J., Romano, T., Jung, S. S., Schreiter, J. L., Yan, L., Shealy, D. J., & McDonald, D. M. (2009). TNF-alpha drives remodeling of blood vessels and lymphatics in sustained airway inflammation in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(10), 2954–2964. <https://doi.org/10.1172/JCI37626>
- Bardi, G. T., Smith, M. A., & Hood, J. L. (2018). Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization. *Cytokine*, 105, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.02.002>
- Barbuddhe, S. B., Malik, S. V., & Gupta, L. K. (1998). Effect of in vitro monocyte activation by *Listeria monocytogenes* antigens on phagocytosis and production of reactive oxygen and nitrogen radicals in bovines. *Veterinary immunology and immunopathology*, 64(2), 149–159. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(98\)00129-9](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(98)00129-9)
- Biagioni, A., Laurenzana, A., Menicacci, B., Peppicelli, S., Andreucci, E., Bianchini, F., Guasti, D., Paoli, P., Serrati, S., Mocali, A., Calorini, L., Del Rosso, M., Fibbi, G., Chillà, A., & Margheri, F. (2021). uPAR-expressing melanoma exosomes promote angiogenesis by VE-Cadherin, EGFR and uPAR overexpression and rise of ERK1,2 signaling in endothelial cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 78(6), 3057–3072. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03707-4>
- Bian, C., Li, R., Wen, Z., Ge, W., & Shi, Q. (2021). Phylogenetic Analysis of Core Melanin Synthesis Genes Provides Novel Insights Into the Molecular Basis of Albinism in Fish. *Frontiers in genetics*, 12, 707228. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.707228>
- Chen, Z., Larregina, A. T., & Morelli, A. E. (2019). Impact of extracellular vesicles on innate immunity. *Current opinion in organ transplantation*, 24(6), 670–678. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000701>
- Clark, M. E., Rizos, H., Pereira, M. R., McEvoy, A. C., Marsavela, G., Calapre, L., Meehan, K., Ruhen, O., Khattak, M. A., Meniawy, T. M., Long, G. V., Carlino, M. S., Menzies, A. M., Millward, M., Ziman, M., & Gray, E. S. (2020). Detection of *BRAF* splicing variants in plasma-derived cell-free nucleic acids and extracellular



vesicles of melanoma patients failing targeted therapy therapies. *Oncotarget*, 11(44), 4016–4027. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27790>

Covarrubias, A., Byles, V., & Horng, T. (2013). ROS sets the stage for macrophage differentiation. *Cell research*, 23(8), 984–985. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.88>

Das, A., et al. (2018). High-Resolution Mapping and Dynamics of the Transcriptome, Transcription Factors, and Transcription Co-Factor Networks in Classically and Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in immunology*, 9, 22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00022>

Di Benedetto, P., Ruscitti, P., Vadasz, Z., Toubi, E., & Giacomelli, R. (2019). Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*, 18(10), 102369. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102369>

Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>

Duque, G., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*, 5, 491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>

Freemerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J., Kirk, E. L., Troester, M. A., Macintyre, A. N., Goraksha-Hicks, P., Rathmell, J. C., & Makowski, L. (2014). Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *The Journal of biological chemistry*, 289(11), 7884–7896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.522037>

Giacobino, C., Canta, M., Fornaguera, C., Borrós, S., & Cauda, V. (2021). Extracellular Vesicles and Their Current Role in Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 13(9), 2280. <https://doi.org/10.3390/cancers13092280>

Gopinathan, G., Milagre, C., Pearce, O. M., Reynolds, L. E., Hodivala-Dilke, K., Leinster, D. A., Zhong, H., Hollingsworth, R. E., Thompson, R., Whiteford, J. R., & Balkwill, F. (2015). Interleukin-6 Stimulates Defective Angiogenesis. *Cancer research*, 75(15), 3098–3107. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1227>

Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5), 593–604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>

Greening, D. W., Gopal, S. K., Mathias, R. A., Liu, L., Sheng, J., Zhu, H. J., & Simpson, R. J. (2015). Emerging roles of exosomes during epithelial-mesenchymal transition and cancer progression. *Seminars in cell & developmental biology*, 40, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.008>

Harber, K. J., de Goede, K. E., Verberk, S., Meinster, E., de Vries, H. E., van Weeghel, M., de Winther, M., & Van den Bossche, J. (2020). Succinate Is an Inflammation-

Induced Immunoregulatory Metabolite in Macrophages. *Metabolites*, 10(9), 372. <https://doi.org/10.3390/metabo10090372>

Heistein, J. B., & Acharya, U. (2021). Malignant Melanoma. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Herbeuval JP, Lelievre E, Lambert C, Dy M, Genin C. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4630-6. doi: 10.4049/jimmunol.172.7.4630. PMID: 15034082.

Hou, P. P., & Chen, H. Z. (2021). Extracellular vesicles in the tumor immune microenvironment. *Cancer letters*, 516, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.05.032>

Hu, T., & Hu, J. (2019). Melanoma-derived exosomes induce reprogramming fibroblasts into cancer-associated fibroblasts via Gm26809 delivery. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 18(22), 3085–3094. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1669380>

Judge, A., & Dodd, M. S. (2020). Metabolism. *Essays in biochemistry*, 64(4), 607–647. <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>

Kalra, H., Drummen, G. P., & Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 170. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>

Karavitis, J., & Kovacs, E. J. (2011). Macrophage phagocytosis: effects of environmental pollutants, alcohol, cigarette smoke, and other external factors. *Journal of leukocyte biology*, 90(6), 1065–1078. <https://doi.org/10.1189/jlb.0311114>

Kelly, B., & O'Neill, L. A. (2015). Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell research*, 25(7), 771–784. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.68>

Kim, N. H., Jung, H. J., Shibasaki, F., & Kwon, H. J. (2010). NBBA, a synthetic small molecule, inhibits TNF-alpha-induced angiogenesis by suppressing the NF-kappaB signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(3), 1500–1505. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.101>

Lecoultre, M., Dutoit, V., & Walker, P. R. (2020). Phagocytic function of tumor-associated macrophages as a key determinant of tumor progression control: a review. *Journal for immunotherapy of cancer*, 8(2), e001408. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001408>

Lopez-Rivera, E., Jayaraman, P., Parikh, F., Davies, M. A., Ekmekcioglu, S., Izadmehr, S., Milton, D. R., Chipuk, J. E., Grimm, E. A., Estrada, Y., Aguirre-Ghiso, J., & Sikora, A. G. (2014). Inducible nitric oxide synthase drives mTOR pathway activation and proliferation of human melanoma by reversible nitrosylation of TSC2. *Cancer research*, 74(4), 1067–1078. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0588>

Luan, W., Ding, Y., Xi, H., Ruan, H., Lu, F., Ma, S., & Wang, J. (2021). Exosomal miR-106b-5p derived from melanoma cell promotes primary melanocytes epithelial-mesenchymal transition through targeting EphA4. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 40(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01906-w>

Massagué, J., & Obenauf, A. C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>

Mehla, K., & Singh, P. K. (2019). Metabolic Regulation of Macrophage Polarization in Cancer. *Trends in cancer*, 5(12), 822–834. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.10.007>

Mouawad R, Soubrane C, Rixe O, Khayat D, Spano JP. An unexpected inverse correlation between soluble epidermal growth factor receptor and interleukin-6 in metastatic malignant melanoma patients. *Melanoma Res*. 2006 Aug;16(4):335-40. doi: 10.1097/01.cmr.0000205022.25397.86. PMID: 16845329.

Millet, P., Vachharajani, V., McPhail, L., Yoza, B., & McCall, C. E. (2016). GAPDH Binding to TNF- $\alpha$  mRNA Contributes to Posttranscriptional Repression in Monocytes: A Novel Mechanism of Communication between Inflammation and Metabolism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 196(6), 2541–2551. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501345>

Muñoz, J., Akhavan, N. S., Mullins, A. P., & Arjmandi, B. H. (2020). Macrophage Polarization and Osteoporosis: A Review. *Nutrients*, 12(10), 2999. <https://doi.org/10.3390/nu12102999>

Nagy, C., & Haschemi, A. (2015). Time and Demand are Two Critical Dimensions of Immunometabolism: The Process of Macrophage Activation and the Pentose Phosphate Pathway. *Frontiers in immunology*, 6, 164. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00164>

Nath, N., & Kashfi, K. (2020). Tumor associated macrophages and 'NO'. *Biochemical pharmacology*, 176, 113899. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113899>

Nishizawa, T., Kanter, J. E., Kramer, F., Barnhart, S., Shen, X., Vivekanandan-Giri, A., Wall, V. Z., Kowitz, J., Devaraj, S., O'Brien, K. D., Pennathur, S., Tang, J., Miyaoka, R. S., Raines, E. W., & Bornfeldt, K. E. (2014). Testing the role of myeloid cell glucose flux in inflammation and atherosclerosis. *Cell reports*, 7(2), 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.028>

Noe, J. T., & Mitchell, R. A. (2019). Tricarboxylic acid cycle metabolites in the control of macrophage activation and effector phenotypes. *Journal of leukocyte biology*, 106(2), 359–367. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1218-496R>

O'Neill, L. A., & Pearce, E. J. (2016). Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *The Journal of experimental medicine*, 213(1), 15–23. <https://doi.org/10.1084/jem.20151570>

Palsson-McDermott, E. M., Curtis, A. M., Goel, G., Lauterbach, M. A., Sheedy, F. J., Gleeson, L. E., van den Bosch, M. W., Quinn, S. R., Domingo-Fernandez, R., Johnston, D. G., Jiang, J. K., Israelsen, W. J., Keane, J., Thomas, C., Clish, C., Vander Heiden, M., Xavier, R. J., & O'Neill, L. A. (2015). Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 $\alpha$  activity and IL-1 $\beta$  induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell metabolism*, 21(1), 65–80. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.005>

Palmieri, E. M., Menga, A., Martín-Pérez, R., Quinto, A., Riera-Domingo, C., De Tullio, G., Hooper, D. C., Lamers, W. H., Ghesquière, B., McVicar, D. W., Guarini, A., Mazzone, M., & Castegna, A. (2017). Pharmacologic or Genetic Targeting of Glutamine Synthetase Skews Macrophages toward an M1-like Phenotype and Inhibits Tumor Metastasis. *Cell reports*, 20(7), 1654–1666. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.054>

Passarelli, A., Mannavola, F., Stucci, L. S., Tucci, M., & Silvestris, F. (2017). Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget*, 8(62), 106132–106142. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22190>

Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., Nitoro-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., Brady, M. S., ... Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*, 18(6), 883–891. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>

Pesic, M., & Greten, F. R. (2016). Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Current opinion in cell biology*, 43, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.07.010>

Pietrowska, M., Zebrowska, A., Gawin, M., Marczak, L., Sharma, P., Mondal, S., Mika, J., Polańska, J., Ferrone, S., Kirkwood, J. M., Widlak, P., & Whiteside, T. L. (2021). Proteomic profile of melanoma cell-derived small extracellular vesicles in patients' plasma: a potential correlate of melanoma progression. *Journal of extracellular vesicles*, 10(4), e12063. <https://doi.org/10.1002/jev2.12063>

Rabold, K., Netea, M. G., Adema, G. J., & Netea-Maier, R. T. (2017). Cellular metabolism of tumor-associated macrophages - functional impact and consequences. *FEBS letters*, 591(19), 3022–3041. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12771>

Rambow, F., Marine, J. C., & Goding, C. R. (2019). Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes & development*, 33(19-20), 1295–1318. <https://doi.org/10.1101/gad.329771.119>

Rihawi, K., Ricci, A. D., Rizzo, A., Brocchi, S., Marasco, G., Pastore, L. V., Llimpe, F., Golfieri, R., & Renzulli, M. (2021). Tumor-Associated Macrophages and Inflammatory Microenvironment in Gastric Cancer: Novel Translational Implications. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 3805. <https://doi.org/10.3390/ijms22083805>

Senga, S. S., & Grose, R. P. (2021). Hallmarks of cancer-the new testament. *Open biology*, 11(1), 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>

Soubrane C, Rixe O, Meric JB, Khayat D, Mouawad R. Pretreatment serum interleukin-6 concentration as a prognostic factor of overall survival in metastatic malignant melanoma patients treated with biochemotherapy: a retrospective study. *Melanoma Res.* 2005 Jun;15(3):199-204. doi: 10.1097/00008390-200506000-00009. PMID: 15917702.

Singel, K. L., & Segal, B. H. (2016). NOX2-dependent regulation of inflammation. *Clinical science (London, England : 1979)*, 130(7), 479–490. <https://doi.org/10.1042/CS20150660>

Simiczyjew, A., Dratkiewicz, E., Mazurkiewicz, J., Ziętek, M., Matkowski, R., & Nowak, D. (2020). The Influence of Tumor Microenvironment on Immune Escape of Melanoma. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8359. <https://doi.org/10.3390/ijms21218359>

Suarez-Carmona, M., Lesage, J., Cataldo, D., & Gilles, C. (2017). EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular oncology*, 11(7), 805–823. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12095>

Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., Beasley, F. C., ... O'Neill, L. A. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature*, 496(7444), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11986>

Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., et al., (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

Torisu-Itakura, H., Lee, J. H., Huynh, Y., Ye, X., Essner, R., & Morton, D. L. (2007). Monocyte-derived IL-10 expression predicts prognosis of stage IV melanoma patients. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 30(8), 831–838. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e318158795b>

Tucci, M., Passarelli, A., Mannavola, F., Felici, C., Stucci, L. S., Cives, M., & Silvestris, F. (2019). Immune System Evasion as Hallmark of Melanoma Progression: The Role of Dendritic Cells. *Frontiers in oncology*, 9, 1148. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01148>

Turner, N., Ware, O., & Bosenberg, M. (2018). Genetics of metastasis: melanoma and other cancers. *Clinical & experimental metastasis*, 35(5-6), 379–391. <https://doi.org/10.1007/s10585-018-9893-y>

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötval, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>

Van den Bossche, J., O'Neill, L. A., & Menon, D. (2017). Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends in immunology*, 38(6), 395–406. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.03.001>

Van Overmeire, E., Laoui, D., Keirsse, J., Van Ginderachter, J. A., & Sarukhan, A. (2014). Mechanisms driving macrophage diversity and specialization in distinct tumor microenvironments and parallels with other tissues. *Frontiers in immunology*, 5, 127. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00127>

Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., & Castegna, A. (2019). The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Frontiers in immunology*, 10, 1462. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462>.

Xiong, J., Xue, Y., Xia, Y., Zhao, J., & Wang, Y. (2020). Identification of key microRNAs of plasma extracellular vesicles and their diagnostic and prognostic significance in melanoma. *Open medicine (Warsaw, Poland)*, 15(1), 464–482. <https://doi.org/10.1515/med-2020-0111>.

Wang, Y., Xu, Z., Guo, S., Zhang, L., Sharma, A., Robertson, G. P., & Huang, L. (2013). Intravenous delivery of siRNA targeting CD47 effectively inhibits melanoma tumor growth and lung metastasis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(10), 1919–1929. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.135>

Wang, C., Wang, Y., Chang, X., Ba, X., Hu, N., Liu, Q., Fang, L., & Wang, Z. (2020). Melanoma-Derived Exosomes Endow Fibroblasts with an Invasive Potential via miR-21 Target Signaling Pathway. *Cancer management and research*, 12, 12965–12974. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S273718>

Williams, C. B., Yeh, E. S., & Soloff, A. C. (2016). Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ breast cancer*, 2, 15025–. <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2015.25>

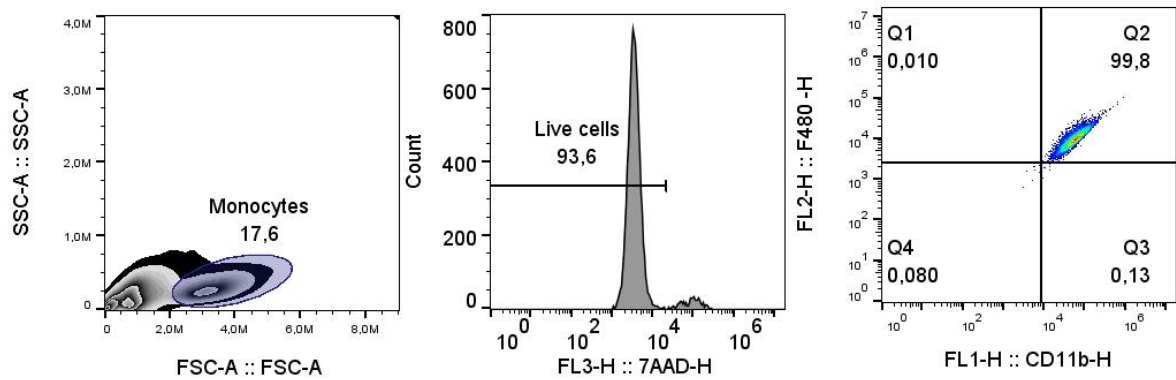
Yarlagadda, K., Hassani, J., Foote, I. P., & Markowitz, J. (2017). The role of nitric oxide in melanoma. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1868(2), 500–509. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.09.005>

Yu S, Liu C, Su K, Wang J, Liu Y, Zhang L, Li C, Cong Y, Kimberly R, Grizzle WE, Falkson C, Zhang HG. Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. *J Immunol*. 2007 Jun 1;178(11):6867-75. doi: 10.4049/jimmunol.178.11.6867. PMID: 17513735.

Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington HD, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Winans MT, Gorelik E, Lokshin AE. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha2b. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 15;13(8):2422-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1805. PMID: 17438101.

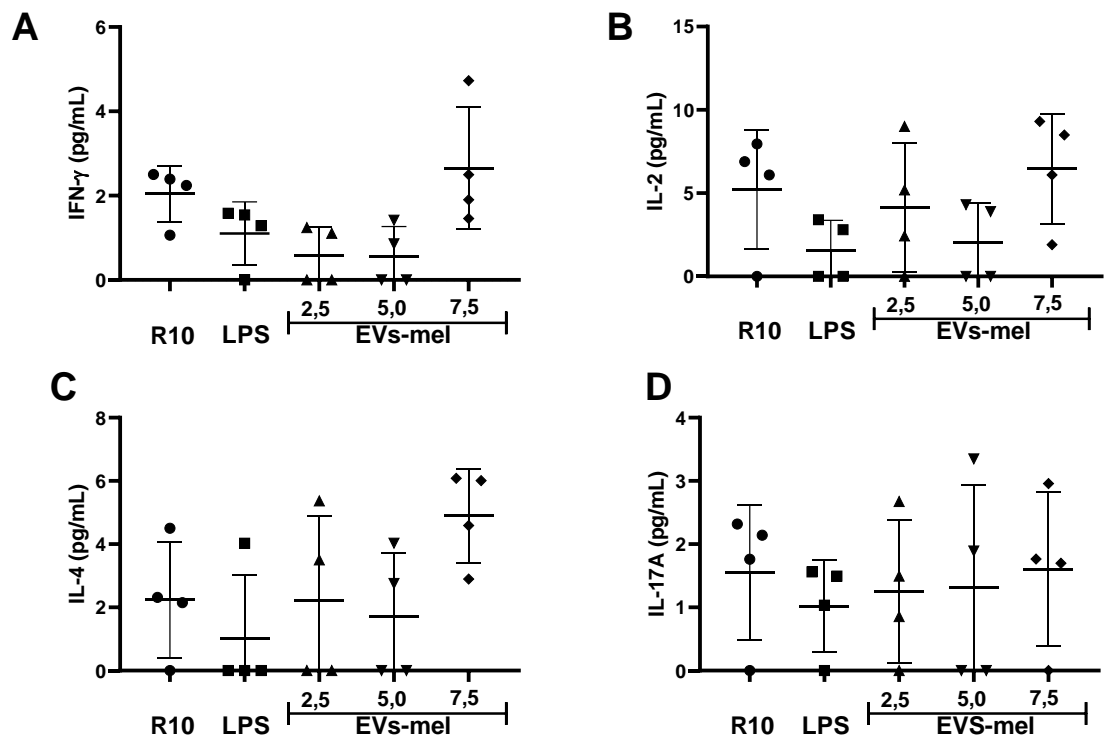
Zhou, E., Li, Y., Wu, F., Guo, M., Xu, J., Wang, S., Tan, Q., Ma, P., Song, S., & Jin, Y. (2021). Circulating extracellular vesicles are effective biomarkers for predicting response to cancer therapy. *EBioMedicine*, 67, 103365. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103365>

## FIGURAS SUPLEMENTARES

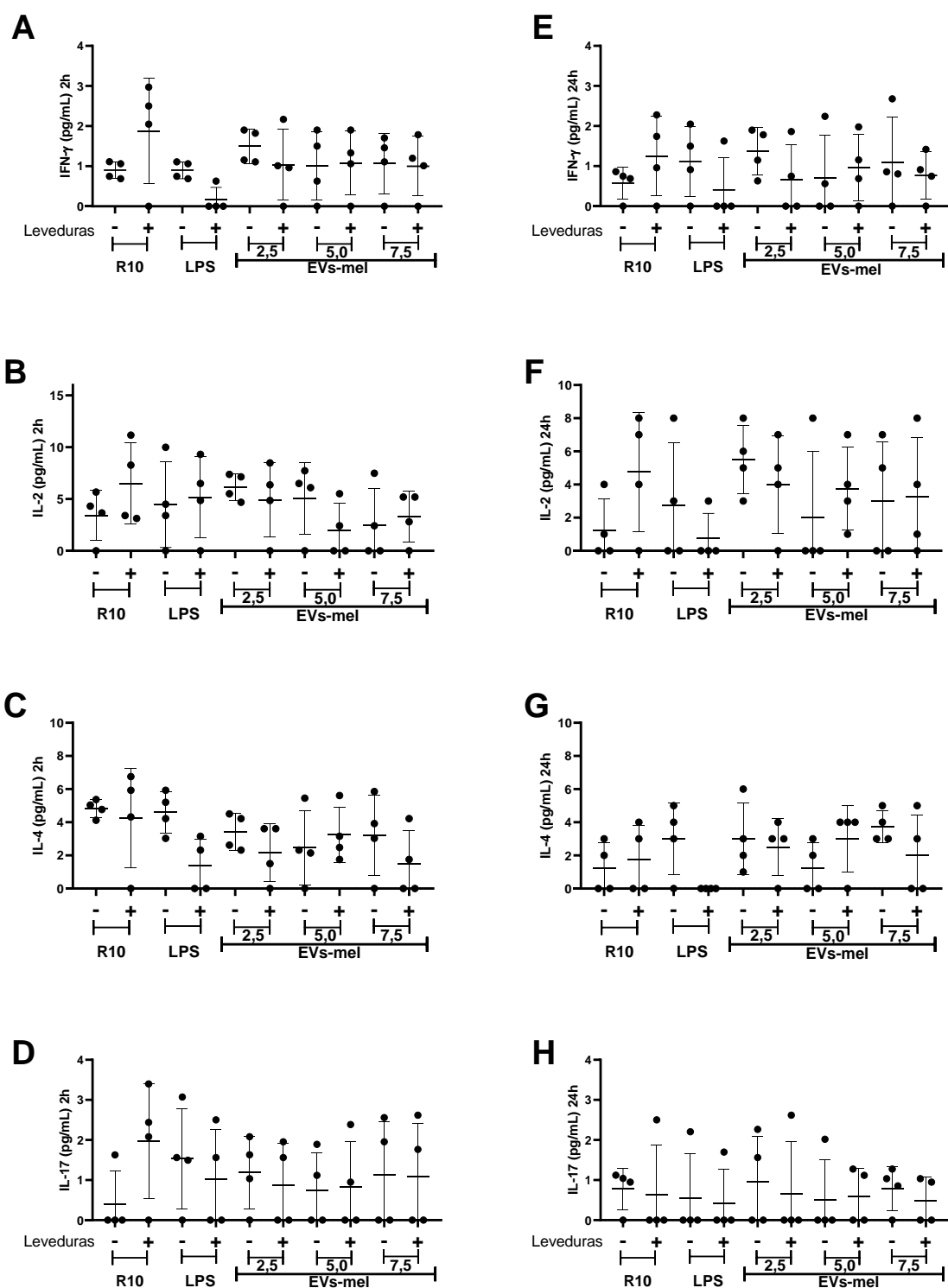


**Figura Suplementar S1** | Percentual de macrófagos diferenciados a partir de monócitos de medula óssea. Pureza e viabilidade de BMDM após sete dias de diferenciação. No sétimo e último dia de diferenciação, células foram coletadas e marcadas com CD11b, F4/80 e 7AAD para análise da diferenciação e viabilidade celular.





**Figura Suplementar S2** | Avaliação do perfil de citocinas em BMDMs após tratamento com EVs-mel. Sobrenadantes de culturas foram coletados após 48 horas de tratamento com EVs-mel nas concentrações de 2,5, 5 e 7,5  $\mu\text{g/mL}$  ou 100  $\text{nm/mL}$  de LPS por 24 horas. IFN- $\gamma$  (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-17 (D). Dados analisados em quadruplicata apresentados com média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura Suplementar S3** | Perfil de citocinas 2 e 24 horas após cocultivo ou não com leveduras. BMDMs tratados ou não com EVs-mel por ou LPS por 24 horas foram desafiados ou não com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* por 2 horas. IFN- $\gamma$  2 horas (A), IL-2 2 horas (B), IL-4 2 horas (C), IL-17 2 horas (D), IFN- $\gamma$  24 horas (E), IL-2 24 horas (F), IL-4 24 horas (G), IL-17 24 horas (H)

## ANEXOS