

Luis Batista Tan

A influência da eritrofagocitose sobre macrófagos associados a melanomas



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia

Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro / 2021

Trabalho realizado no Departamento de Imunologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Marcelo Torres Bozza e coorientação de Jamil Zola Kitoko.

CIP - Catalogação na Publicação

BL953i Batista Tan, Luis
A influência da eritrofagocitose sobre macrófagos
associados a melanomas / Luis Batista Tan. -- Rio
de Janeiro, 2021.
52 f.

Orientador: Marcelo Torres Bozza.
Coorientador: Jamil Zola Kitoko.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2021.

1. Melanoma. 2. Macrófagos. 3. Hemácias. 4.
Eritrofagocitose. 5. Microambiente tumoral. I.
Torres Bozza, Marcelo, orient. II. Zola Kitoko,
Jamil, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO: **Luis Batista Tan**

DRE: 117078730

BANCA EXAMINADORA: Profa. Juliana Echevarria Lima (Presidente)

Prof. Rodrigo Tinoco Figueiredo

Prof. Frederico Alisson da Silva

Título da Monografia: **“A influência da eritrofagocitose sobre os macrófagos associados à tumor”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/kii-zcfd-pps> Data e hora de início: **16 de junho de 2021 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 16 de junho de 2021.

NOTA

10

10

10

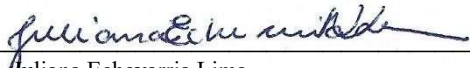
Banca Examinadora:

Profa. Juliana Echevarria Lima

Prof. Rodrigo Tinoco Figueiredo

Prof. Frederico Alisson da Silva

Presidente da banca


 Prof. Juliana Echevarria Lima


Aluno:


 Luis Batista Tan

Orientador:

 
 Prof. Marcelo Torres Bozza / Coorientador: Dr. Jamil Zola Kitoko

Coordenador


 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

de TCC

Agradecimentos

Nossos mais sinceros agradecimentos ao Dr. Rafael Cardoso Maciel da Silva pelo aconselhamento e ajuda em todas as etapas deste projeto e ao grupo do Laboratório de Inflamação e Imunidade, à equipe técnica do CCS e à FAPERJ pelo auxílio no dia-a-dia e auxílio financeiro.

RESUMO

Luis Batista Tan

A influência da eritrofagocitose sobre macrófagos associados a melanomas

Orientador: Marcelo Torres Bozza e Jamil Zola Kitoko

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O desenvolvimento do tumor é acompanhado pelo estabelecimento do microambiente tumoral em que o fenótipo de todas as células constituintes é alterado para um funcionamento patológico, auxiliando o crescimento do tumor e a ocorrência de eventos metastáticos. Este ambiente mantém as condições para a progressão da doença, regulando minuciosamente o funcionamento da resposta imune ao tumor pela secreção de fatores solúveis, mudanças nas propriedades físico-químicas do tecido e interação direta com os leucócitos. Este ambiente também é caracterizado pela formação de vasos defeituosos, propensos à ruptura e vazamentos, liberando o conteúdo do sangue no tumor, incluindo as hemácias. As hemácias extravasadas são removidas, principalmente, pela fagocitose por macrófagos associados ao tumor, o que resulta em alterações nestas células, que se adaptam para detoxificar e transportar as grandes quantidades de hemoglobina, expressando enzimas como a Heme Oxigenase-1. No entanto, ainda se sabe pouco sobre o efeito que esta interação possui sobre os macrófagos tumorais e sua função na doença, geralmente associado com a progressão do tumor, sendo este o foco deste trabalho. Foi observado que a eritrofagocitose leva à um estado de super ativação dos macrófagos, expressando MHCII, CD38, CD64, CX3CR1 e CD206 *in vivo*, mas não *in vitro*, em que reduziu a expressão dos marcadores. Foi visto que mais de 70% dos macrófagos eritrofagocíticos eram hipóxicos e que a hipóxia está associada com a expressão de CD206 por macrófagos *in vivo*, sendo sugerido que a eritrofagocitose induz uma resposta inflamatória, enquanto a hipóxia polariza os macrófagos para o espectro M2. A fim de simular os efeitos da hipóxia *in vitro*, utilizou-se o lactato de sódio, molécula resultante do metabolismo hipóxico com capacidade de polarizar macrófagos para o tipo M2. No entanto, a eritrofagocitose na presença de lactato *in vitro* não reproduziu o fenótipo *in vivo*. Foram realizadas injeções de hemácias nos tumores, simulando grandes hemorragias. Essas injeções não aumentaram a quantidade de eritrofagócitos no tumor, mas levaram à diminuição do infiltrado de macrófagos e aumento do recrutamento de monócitos, havendo uma renovação dos macrófagos tumorais. Assim, viu-se que no contexto tumoral a eritrofagocitose ocorre principalmente em regiões hipóxicas e polariza os macrófagos para um perfil super ativo, resultando em sua migração para fora do tumor e recrutamento de monócitos, sendo ainda necessário reproduzir este fenótipo *in vitro* e desvendar sua função biológica.

Palavras-chave: Melanoma, macrófagos, hemácias, eritrofagocitose e microambiente tumoral

Abstract

Luis Batista Tan

A influência da eritrofagocitose sobre macrófagos associados a melanomas

Orientador: Marcelo Torres Bozza e Jamil Zola Kitoko

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The development of tumors is followed by the establishment of the tumoral microenvironment in which the phenotype of all forming cells is altered to a pathological state, helping the tumor grow and favoring metastatic events. This environment maintains the conditions for disease progression, thoroughly regulating the functionality of the immune response against the tumor by secreting soluble factors, altering the tissue's physical-chemical properties and by directly interacting with leukocytes. This environment is also characterized by its malformed vasculature leading to blood content leakage into the tumor, including red blood cells (RBC). These RBCs are removed, mainly by tumor associated macrophages, which undergo adaptations to detoxify and transport the large amounts of hemoglobin, expressing enzymes such as Heme Oxygenase-1. The current knowledge of what effects this interaction has on tumor associated macrophages and their function in disease, generally associated with tumor progression, is still obscure. This work aims to shed light on this subject. It has been observed that erythrophagocytosis in tumor leads to the hyperactivation of macrophages, expressing MHCII, CD38, CD64, CD11c and CD206 *in vivo*, but not *in vitro* in which conditions it led to a reduction of the marker's expression. It was also observed that the bulk of erythrophagocytosis was made by hypoxic cells and that hypoxia is associated with CD206 expression, being suggested that erythrophagocytosis induces an inflammatory response while hypoxia polarizes macrophages to the M2 specter. In order to simulate the effects of hypoxia *in vitro* macrophages were stimulated with sodium lactate, a metabolite resulting from the hypoxic response that has the ability to polarize macrophages to the M2 type. However, erythrophagocytosis in the presence of lactate *in vitro* did not reproduce the results *in vivo*. Hemorrhagic events were simulated by the injection of red blood cells into tumors. These injections did not increase erythrophagocytic macrophage numbers, but diminished macrophage infiltration overall while increasing monocyte recruitment, undergoing a renewal in tumor macrophages. In conclusion, in the tumoral context, erythrophagocytosis occurs mainly in hypoxic regions, polarizing macrophages to a hyperactive state, resulting in their migration from the tumor site and monocyte recruitment. The biological function of these macrophages is yet unknown.

Key words: Melanoma, macrophages, red blood cells, erythrophagocytosis and tumor microenvironment.

Resumo para pessoas leigas

Luis Batista Tan

A influência da eritrofagocitose sobre macrófagos associados a melanomas

Orientador: Marcelo Torres Bozza e Jamil Zola Kitoko

Resumo para pessoas leigas da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O câncer é resultado do acúmulo de mutações no material genético de uma célula, fazendo com que esta perca o controle da divisão celular e prolifere ininterruptamente, formando um tumor. Estes tumores não são formados apenas pelas células cancerígenas, havendo vários tipos de células saudáveis o habitando, como as células do sistema imune. As células cancerígenas são capazes de alterar o funcionamento destas células saudáveis, fazendo com que assumam um papel patológico, ou seja, que auxilia o desenvolvimento da doença. O resultado da interação entre as células cancerígenas e as células saudáveis conhecido como o microambiente tumoral, que mantém as condições para a progressão da doença e controla a resposta imune contra o tumor por uma série de mecanismos. Uma das características dos tumores é a formação de vasos sanguíneos defeituosos propensos à ruptura e vazamentos. Nestas ocasiões o conteúdo do sangue é extravasado para o tumor, incluindo as hemácias, as células vermelhas do sangue que transportam o oxigênio pelo corpo. Estas hemácias são engolidas por células da imunidade chamadas de macrófagos, que são capazes de desempenhar muitas funções diferentes e são essenciais para a resposta imune contra o tumor. Ao engolir estas hemácias os macrófagos passam por mudanças que alteram sua função imune, que ainda são desconhecidas no contexto do tumor. Este trabalho tem como objetivo esclarecer quais os efeitos que a ingestão de hemácias possui sobre os macrófagos no tumor. Neste trabalho, foi observado que este fenômeno leva à super ativação dos macrófagos tumorais, expressando moléculas pró e anti-inflamatórias. Estes macrófagos migram para fora do tumor, provavelmente para entregar o conteúdo de ferro das hemácias para o fígado, e são substituídos por novas células da corrente sanguínea. Também se observou que quase toda ingestão de hemácias é feita por células hipóxicas, ou seja, com pouco oxigênio. A hipóxia mostrou-se importante para a função pró tumoral dos macrófagos, sendo sugerido que a ingestão de hemácias ativa a resposta inflamatória e a hipóxia fazem com os macrófagos assumam funções que auxiliam o crescimento do tumor, resultando no perfil super ativado.

Palavras-chave: Melanoma, macrófagos, hemácias, eritrofagocitose e microambiente tumoral

Lista de figuras

Figura 1 - O tumor é infiltrado por macrófagos TER-119 ⁺	20
Figura 2 – Os macrófagos TER-119 ⁺ assumem um perfil superativado	22
Figura 3 - A hipóxia é importante para a expressão de CD206 em eritrofagócitos tumorais	24
Figura 4 - Fenotipagem de BMDMs estimulados com hemácias frescas.....	25
Figura 5 - Fenotipagem de BMDMs estimulados com hemácias envelhecidas.....	26
Figura 6 - Hemácias frescas e envelhecidas induzem a secreção de IL-6 e TNF-alfa <i>in vitro</i>	27
Figura 7 - A população de células mielóides do tumor é alterada pela injeção de hemácias	29
Figura 8 – Ocorre aumento na quantidade de macrófagos indiferenciados nos melanomas após a injeção de hemácias.....	30
Figura 9 - A injeção de hemácias resulta em maior infiltração de linfócitos no tumor:	31

Lista de abreviaturas e siglas:

- HO-1 - Heme Oxigenase 1
- TNF - *Tumor Necrosis Factor*
- IL - Interleucina
- NO - Óxido Nítrico
- ROS - Espécies reativas de oxigênio
- Arg - Arginase
- TGF - *Transforming growth factor*
- HIF - *Hypoxia inducible factor*
- CO - Monóxido de carbono
- TAM - Macrófagos associados a tumor
- DAMP - Padrão molecular associado a dano
- SFB - Soro fetal bovino
- BMDM - Macrófagos derivado de medula óssea
- MGM - *Macrophage growth medium*
- IFN - Interferon

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 A resposta imune e o microambiente tumoral.....	1
1.2 Os <i>hypoxia inducible factors</i> (HIF) são fatores de transcrição importantes na modulação do microambiente tumoral.....	4
1.3 A Heme Oxigenase-1 auxilia o crescimento de tumores e sua expressão é induzida pelo microambiente tumoral.....	6
1.4 A fagocitose de hemácias por macrófagos do tumor.....	9
1.5 O desenvolvimento dos melanomas pode ser afetado por hemorragias intratumorais.....	13
2. Justificativa.....	14
3. Objetivos.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4. Materiais e Métodos.....	15
4.1 Cultura de células B16-OVA e coleta de macrófagos derivados de medula óssea.....	15
4.2 Isolamento de hemácias.....	16
4.3 Modelo <i>in vivo</i> de indução tumoral.....	16
4.4 Excisão e preparo de suspensões celulares a partir de tumores.....	16
4.5 Estímulo <i>in vitro</i> de BMDM.....	17
4.6 Imunofenotipagem e citometria de Fluxo.....	17
4.7 ELISA.....	18
5. Resultados.....	19
5.1 Os tumores são habitados por um grupo fenotipicamente distinto de macrófagos eritrofagocitários.....	19
5.2 A expressão do CD206 nos eritrofagócitos está associada com a hipóxia no tumor.....	22

5.3 Fatores do microambiente tumoral levam à polarização diferencial de eritrofagócitos comparado com condição <i>in vitro</i>	24
5.4 A injeção de hemácias no tumor causa mudanças no infiltrado de células mieloides e linfoides	28
6. Discussão	32
7. Bibliografia:	36

1 Introdução

1.1 A resposta imune e o microambiente tumoral

Os tumores sólidos são formados por uma massa anormal de células e tecidos. Os principais tipos celulares encontrados em um tumor são fibroblastos, leucócitos, células endoteliais, vasos linfáticos e as células tumorais em si, além da matriz extracelular (Petrova et al., 2018). Células neoplásicas têm, de forma geral, uma ou mais mutações em proteínas reguladoras do ciclo celular ou apoptose, levando a alterações proliferativas e metabólicas importantes para a gênese e progressão tumoral. Além disso, muitos tumores são associados a processos de inflamação crônica, que propicia a expansão descontrolada das células tumorais e a invasão de outros tecidos (Pollard, 2004).

O sistema imune possui um papel importante no controle de tumores através da ação antitumoral de células como os macrófagos e células *natural killer* – sistema imune inato, e linfócitos – sistema imune adaptativo. A resposta imune adaptativa é suportada pela ativação de linfócitos T pelas células apresentadoras de antígenos, carregando neo antígenos tumorais. Normalmente ocorre uma resposta de células TCD4 do subtipo Th1, caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias como Interferon (IFN)-gama, fator de necrose tumoral (TNF)-alfa e Interleucina(IL)-12, regulando tanto as células da imunidade inata como a progressão tumoral. O tumor também é infiltrado por Linfócitos TCD8 citotóxicos que realizam a destruição direta das células tumorais em conjunto com células da imunidade inata como células *natural killers* e macrófagos (Gonzalez, Hagerling e Werb, 2018). Após esta resposta inicial é comum que o crescimento do tumor seja controlado, podendo até ocorrer sua eliminação. No entanto, quando o tumor persiste, em geral ocorre a exaustão celular. Este é um fenômeno em que os linfócitos responsivos ao tumor perdem gradativamente sua função antitumoral, afetando principalmente os linfócitos TCD8 (Workman et al., 2004; Day et al. 2006; Wherry, 2011).

A resposta adaptativa é responsável pela liberação de uma série de fatores importantes na regulação da imunidade inata, como IFN-gama pelas células Th1 e IL-4 e IL-13 pelas células Th2. A exaustão linfocitária restringe a liberação desses importantes mediadores inflamatórios, (Wherry, 2011; Sica e Mantovani 2012; Zhen et al., 2020), o que pode comprometer a função tumoricida exercida pelas células do sistema imune que infiltram o tumor, passando a ficarem expostas à regulação pelos fatores do microambiente tumoral. Nesta etapa, é muito comum que

ocorra o escape imune do tumor, tanto pela forte pressão seletiva como pela exaustão das células da resposta imune. Neste trabalho iremos nos aprofundar no papel que as interações entre macrófagos, células tumorais e hemorragias possuem sobre a progressão e resposta antitumoral.

Como foi mencionado anteriormente, vários tipos de células integram o tumor. O conjunto de interações celulares, metabólicas e de secretoma destas diferentes células forma o que se chama de microambiente tumoral. Devido às drásticas alterações transcricionais e metabólicas das células cancerígenas, ocorrem mudanças no tecido que estas células habitam, diferenciando o microambiente tumoral do tecido saudável. Desta forma, todas as células integrantes do tumor têm seu fenótipo afetado, exercendo efeitos importantes na progressão e na resposta antitumoral (Motterlini et al., 2000; Colegio et al., 2017; Petrova et al., 2018).

Macrófagos são células da imunidade inata com grande plasticidade funcional, habitando uma variedade de órgãos distintos, como o cérebro, fígado, pele, pulmões e outros sob diferentes formas e desempenhando funções distintas, como vigilância imune, manutenção da homeostase dos tecidos por eliminação de corpos apoptóticos e respostas de regeneração tecidual após lesões ou inflamações (Bögels et al., 2012). Essa variedade de funções e localizações dos macrófagos se traduz em inúmeros fenótipos, compreendidos em um espectro de diferenciação celular que compreende dois subtipos extremos, os macrófagos M1, ou classicamente ativados e os macrófagos M2, ou alternativamente ativados. Em tumores, os macrófagos são uma das maiores populações de células do estroma, (Pollard, 2004; Noy e Pollard, 2014) possuindo assim um papel muito relevante no controle ou até mesmo no desenvolvimento da doença.

O fenótipo M1 consiste na versão ativada pró-inflamatória dos macrófagos, apresentando maior capacidade fagocítica, maior migração celular a sítios inflamatórios e secreção aumentada de citocinas como IL-6, IL-1 e TNF-alfa. Também possuem função como células apresentadoras de antígenos, expressando mais HLA, CD80 e CD86 e ativando a resposta imune adaptativa participando, de forma geral, de uma resposta do tipo Th1, secretando quimiocinas que recrutam linfócitos Th1 como CXCL9 e CXCL10 (Subhra et al., 2010; Bonnevier et al., 2017). A expressão de CD38 por macrófagos também foi identificada como um marcador específico muito útil na identificação destas células *in vitro* (Jablonski et al., 2015). O CD38 é uma enzima que forma ADP-ribose cíclica, importante na sinalização de Ca²⁺ e recrutamento de neutrófilos, no entanto sua função na atividade inflamatória de macrófagos ainda não é clara (Partida-Sánchez et al., 2001). Estes macrófagos possuem atividade tumoricida sendo capazes de realizar o killing de células tumorais pela fagocitose mediada por anticorpos e pela secreção de moléculas citotóxicas como Óxido Nítrico (NO) e Espécies

Reativas de Oxigênio (ROS), sendo componentes importantes da resposta antitumoral (Subhra et al., 2010). No entanto, estes macrófagos nem sempre apresentam atividade antitumoral, visto que o estabelecimento de inflamações crônicas, pela liberação excessiva de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas pró-inflamatórias auxilia ativamente na progressão e desenvolvimento do tumor e na supressão de uma imunidade antitumoral efetiva (Gonzalez, Hagerling e Werb, 2018).

O fenótipo M2 consiste no outro extremo de ativação destas células com um perfil anti-inflamatório. Estas células são caracterizadas pela expressão de Arginase (Arg)-1, CD206 e IDO (Naito, Takagi e Higashimura, 2014), que atuam reduzindo a disponibilidade dos substratos arginina, manose e triptofano, respectivamente, para as células do sistema imune e produzindo subprodutos com atividade imunorreguladora, além de secretarem moléculas imunossupressoras como IL-10 e *Transforming growth factor* (TGF)-beta. Estes macrófagos tem como função a regulação do sistema imune e recuperação da homeostase dos tecidos, possuindo fortes capacidades antioxidativas pela ação de enzimas como a HO-1 e de indução da proliferação celular, secretando fatores de crescimento como VEGF e EGF, sendo associados com respostas do tipo Th2 contra parasitas (Noy e Pollard, 2014; Henze e Mazzone, 2016). Ao contrário das células M1, os macrófagos M2 possuem expressão reduzida de HLA (Mohavedi et al. 2010; Subhra e Mantovani, 2010; Marchesi et al. 2013; Bonnevier et al. 2017), realizando menos apresentação de antígenos, além de levarem à diferenciação de células Treg e regularem sua migração para o tumor pela secreção das quimiocinas CCL17 e CCL22, promovendo a tolerância imune.

Na maioria dos casos, a presença de macrófagos em tumores é associada com um mau prognóstico, visto que é comum que assumam um perfil M2, que suprime a imunidade antitumoral e auxilia no crescimento do câncer (Pollard, 2004; Petrova et al. 2018). No entanto, estas células também podem atuar a favor da eliminação do tumor, fagocitando células tumorais e ajudando a ação da imunidade adaptativa (Bögels et al, 2012). Inclusive, um trabalho recente (Kaczanowska et al., 2021) explorou o uso de macrófagos modificados geneticamente para secretarem IL-12. Observou-se que estas células são capazes de se acumular em sítios pré-metastáticos e tumores primários, revertendo a imunossupressão e estimulando uma imunidade adaptativa duradoura com grande capacidade de controlar a doença, mostrando o papel fundamental dos macrófagos na regulação da resposta antitumoral. O microambiente tumoral é um meio muito complexo, fornecendo uma série de sinais moleculares importantes para o fenótipo de macrófagos e das diversas outras células que integram o tumor, sendo crucial para a progressão ou rejeição tumoral.

1.2 Os *hypoxia inducible factors* (HIF) são fatores de transcrição importantes na modulação do microambiente tumoral

É muito comum a formação de ambientes hipóxicos de forma aguda ou crônica em tumores, devido à vascularização inadequada do tecido em expansão, formando regiões que não são supridas por capilares (Laoui et al., 2014). Isso causa mudanças na expressão gênica das células integrantes do tumor, que são em grande parte mediadas pelos *Hypoxia Inducible Factors* (HIF). Este grupo consiste em 3 fatores de transcrição que são regulados positivamente pela hipóxia e outras condições de estresse. O HIF-1 e HIF-2 são mais bem estudados e conduzem uma reprogramação genética em que a célula se adapta, adotando um metabolismo anaeróbico com predominância de glicólise sobre a respiração celular e subsequente acúmulo de metabólitos ácidos, como piruvato e ácido láctico, acidificando o meio intersticial (Colegio et al, 2017), induzindo a produção de moléculas angiogênicas e por vezes levando à apoptose das células (Koukorakis et al., 2002; Sowter et al., 2003). O meio hipóxico e acidificado influencia o fenótipo de todas as células que compõe o tumor, levando à secreção de moléculas que formam um tecido distinto do saudável, caracterizado pela replicação incessante do tumor, neovascularização, migração celular alterada, inflamação crônica, degradação da matriz extracelular e eventualmente, eventos metastáticos (Petrova et al. 2018). Dentre estes fatores se destaca o HIF-1, um fator expresso em resposta à hipóxia aguda, cuja expressão aumentada foi detectada tanto nas células tumorais quanto nas células do estroma e está relacionada com a progressão tumoral em diversos modelos (Beasley et al., 2002; Kurokawa et al., 2003). A ativação deste programa transcricional é regulada pela Prolil hidroxilase 2 (PHD2), uma proteína sensível ao oxigênio que promove a degradação do HIF-1a nos proteassomos.

A secreção de ácido láctico pelas células tumorais induz a expressão de HIF-1 nos macrófagos associados ao tumor (TAM), o que leva à diferenciação para o fenótipo M2 (Laoui et al., 2014; Colegio et al., 2018), sendo importante ressaltar que estes efeitos são tecido-dependentes e podem ter ação pró- ou antitumoral. Nestas células, o HIF-1 leva ao aumento na expressão de Arginase-1, IL-10 e TGF-beta que inibem a imunidade adaptativa antitumoral e a ativação de células apresentadoras de antígenos (Laoui et al., 2014). A secreção de IL-10 pelos macrófagos M2 leva à expressão de PD-L1, de maneira parácrina e autócrina nos mesmos, auxiliando na desativação dos linfócitos T reativos ao tumor (Kuang et al., 2009). O HIF-1 também induz um aumento na expressão de moléculas degradadoras da matriz extracelular como a proteinase MMP9, que leva à liberação de TGF-beta e VEGF que são acumulados nestes proteoglicanos (Yu e Stamenkovic, 2000; Pollard, 2004). A liberação de TGF-beta fortalece o

efeito imunossupressor, enquanto o VEGF induz a angiogênese e aumenta a dilatação dos capilares, o que junto com o afrouxamento da matriz extracelular permite que as células cancerígenas invadam tecidos vizinhos e a corrente sanguínea, o que facilita a ocorrência de metástases. Estes macrófagos M2 também são as principais fontes de fatores de crescimento como VEGF e EGF, estimulando a vascularização e efetivamente permitindo a continuidade da expansão tumoral ao oxigenar estes tecidos e levar nutrientes, auxiliando na multiplicação das diversas células integrantes do tumor (Colegio et al., 2017). Além disso, macrófagos que habitam regiões de hipóxia em tumores apresentam maior expressão de quimiocinas como CCL6, CCL7 e CCL9 que atraem monócitos para o tumor (Mohavedi et al. 2010; Henze e Mazzone, 2016). Esses monócitos podem se diferenciar em macrófagos, o que é muito importante para a manutenção da população de macrófagos no tumor, visto que estas células terminalmente diferenciadas possuem pouco potencial proliferativo e precisam ser repostas por monócitos circulantes Ly6c⁺.

A expressão aumentada de HIF-1 nas células de câncer esofágico e câncer de pescoço e cabeça é associado com estágio avançado da doença, piora na sobrevivência geral dos pacientes e aumento da invasão tumoral, além de funcionar como um marcador de metástases nodais, enquanto o HIF-2 parece possuir uma influência significativa sobre o crescimento de Carcinoma Renal em que favorece a replicação celular, mas não em outros tipos de Câncer, como Câncer de pescoço e cabeça, embora estes dados sejam contraditórios em diferentes trabalhos (Beasley et al., 2002; Koukorakis et al., 2002; ;Kurokawa et al., 2003; Winter et al., 2006)]. No entanto, em trabalhos avaliando cânceres de Pulmão a deleção de HIF-2 aumentou o potencial proliferativo e metastático destas células, sugerindo uma função antitumoral desta molécula (Branco-Price et al., 2012). O mesmo se observa para o HIF-1 em um modelo de câncer de Mama (Kachamakova et al., 2020), em que a indução de HIF-1 leva à diminuição da viabilidade das células cancerígenas, ocorrendo a morte por apoptose e a melhora na entrega da droga quimioterápica Gemcitabine. Esses achados demonstram que os programas metabólicos ativados por HIF-1 e HIF-2 causam mudanças fenotípicas nas células que promovem o crescimento tumoral e a imunossupressão, sendo estes efeitos, no entanto, altamente tecido-específicos, havendo respostas muito distintas à hipóxia em diferentes tipos de tumor, podendo haver expressão de HIF-1 e/ou HIF-2, com diferentes resultados.

1.3 A Heme Oxigenase-1 auxilia o crescimento de tumores e sua expressão é induzida pelo microambiente tumoral

Outra molécula importante que é expressa diferencialmente em tumores é a Heme Oxigenase (HO)-1. Esta enzima catalisa a clivagem do Heme livre, formando quantidades equimolares de biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro livre, que é capturado pela ferritina, sendo a principal enzima responsável pela detoxificação do heme. Estes três subprodutos possuem atividades que auxiliam no controle de inflamações. A Biliverdina é convertida em Bilirrubina que é um forte agente antioxidante capaz de interferir no ciclo celular. O Ferro livre resulta na reação de Fenton, formando radicais Hidroxila que danificam o DNA e lipídeos, no entanto, também induz a produção de Ferritina, uma proteína que captura o Ferro livre, impedindo-o de realizar a reação de Fenton e interagir com outras proteínas celulares (Was, Dulak e Jazkowic, 2010). O CO é uma molécula muito ativa no organismo possuindo propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, vasodilatadora e citoprotetora mediando, em grande parte, os efeitos da IL-10, inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa e IL-1beta e a produção de NO por macrófagos (Tzong e Lee-Young, 2002). Pela atividade destes subprodutos, a HO-1 inibe a atividade de proteínas como NOX, COX e iNOS2 que são importantes para a ativação do programa inflamatório de macrófagos (Soares e Hamza, 2016). Além da ação imunossupressora direta dos subprodutos da catálise do Heme, a HO-1 possui atividade não-enzimática na sua forma nuclear, interferindo na expressão de genes com atividade citoprotetora (Lin et al., 2007; Biswas et al., 2014). A expressão de HO-1 é benéfica em uma série de patologias, como aterosclerose (Yoshimi, Kazuo e Yurihiko, 2019) e diabetes (Ptilovanciv et al., 2013), funcionando como um regulador negativo intrínseco da inflamação, sendo expressa fisiologicamente em feridas e tecidos altamente replicativos. Sua atividade ajuda a manter a homeostase, estimulando a divisão celular, regulando negativamente processos inflamatórios, inibindo a apoptose e prevenindo o acúmulo de ROS reações de óxido-redução que podem gerar danos a macromoléculas, como o DNA, possuindo assim atividade anti-carcinogênica (Was, Dulak e Jozkowicz, 2010; Furfaro et al., 2015). Sua expressão pode ser induzida por uma série de condições de estresse celular, como estresse oxidativo, por metais pesados, pela presença de heme extracelular, tratamentos radio- e quimioterápicos, pela IL-10 e em resposta à hipóxia, reforçando a capacidade da célula de suportar estes danos por uma série de mecanismos antioxidantes, coordenados pelo fator de transcrição Nrf-2 e suas proteínas (Tzong e Lee-Young, 2002; Laoui et al., 2014; Naito, Takagi e Nashimura, 2014; Furfaro et al., 2015). A resposta à hipóxia e a HO-1 provavelmente são conectadas pela ferritina, visto que a

queação do Fe^{2+} intracelular leva ao desacoplamento do inibidor PHD2 do HIF-1a, ocorrendo uma resposta de hipóxia mesmo em condição de normóxia (Soares e Hamza, 2016) ou pela ação do CO, que também é capaz de estabilizar o HIF-1a (Chin, et al., 2007).

Desta forma, a HO-1 através de suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, exerce efeitos citoprotetores importantes, diminuindo a lesão tecidual em diferentes modelos. No entanto, na maioria dos casos, sua atividade nas células de tumor melhora sua sobrevivência e favorece o seu crescimento (Was, Dulak e Jozkowicz, 2010). Em diversos tipos de tumores foram detectados níveis aumentados de HO-1 nos macrófagos e nas células tumorais (Deininger et al., 2000; Was et al., 2006).

Sua expressão em macrófagos é relacionada com a mudança para o fenótipo M2, cujas propriedades regenerativas promovem o crescimento tumoral interferindo no ciclo celular e induzindo a angiogênese, além de assumir um papel anti-inflamatório protetor, que suprime a imunidade antitumoral (Alaluf et al. 2020; Weis et al., 2009). A presença de macrófagos com alta expressão de HO-1 em tumores foi associada com maior vascularização e grau de malignidade aumentado em gliomas e melanomas (Akihiro et al., 1999; Deininger et al., 2000; Torisu-Itakura et al., 2000). Estes macrófagos induzem a angiogênese pela liberação de fatores como VEGF e IL-8, mas também pela interação da HO-1 com a expressão da Thymidine Phosphorylase, uma proteína importante em processos angiogênicos em macrófagos e nas células tumorais, sendo estas células uma das principais fontes de estímulos para a angiogênese em tumores (Torisu-Itakura et al., 2000; Naito, Takagi e Nashimura, 2014). A expressão de HO-1 também foi relacionada com maior número de macrófagos infiltrantes no tumor, o que reforça a atividade promotora do crescimento tumoral que estas células desempenham.

Os macrófagos são componentes essenciais na reciclagem e detoxificação do heme no organismo, fagocitando hemácias senescentes e renovando o ferro, presente como hemoglobina, para a geração de novos eritrócitos (Soares e Hamza, 2016). Devido às propriedades citotóxicas do heme, os macrófagos precisam sofrer algumas mudanças fenotípicas tornando-se capazes de suportar altas doses de heme intracelular. O CO derivado da catálise do heme pela HO-1 leva à reprogramação metabólica destas células, que passam a realizar menos respiração celular e desviam o uso da glicose para a via de pentose fosfato, assumindo um perfil bioenergético reduzido. Estas alterações permitem à célula manter a homeostase oxidativa. O CO também leva à estabilização do HIF-1a, que é importante para o estabelecimento deste programa metabólico pelos macrófagos, aumentando a recepção de glicose por Glut1 por estas células (Bories G.F et al., 2020).

A HO-1 exerce efeito sobre o ciclo celular de alguns tipos de células estimulando a proliferação, como em células endoteliais e queratinócitos e em alguns tipos de tumores, como em melanomas. O controle da produção de ROS pela HO-1 é importante para esta atividade, visto que ROS são inibidoras do ciclo celular e diminuem a responsividade das células à mitógenos. É importante ressaltar que a HO-1 também é capaz de influenciar a expressão e localização celular de uma série de moléculas reguladoras do ciclo celular, como p21 e as MAPKs pela ação de seus subprodutos, por vezes estimulando ou inibindo a reprodução das células (Was et al., 2006; Was, Dulak e Jozkowicz, 2010).

Em vários tipos de tumor ocorre o estímulo da expressão de HO-1 após tratamentos radio- e quimioterápicos, levando a um aumento na resistência dessas células a esses tratamentos (Berberal et al., 2005; Sae Lo-oom et al., 2016). De fato, uma série de trabalhos promissores já foram publicados em que foi explorada a possibilidade de utilizar inibidores da HO-1 e Nrf2 de forma terapêutica junto com outros tratamentos, a fim de aumentar a susceptibilidade das células tumorais com grau de sucesso promissor (Fang et al., 2004; Frank et al., 2007; Regehly et al., 2007). Em um trabalho com câncer pancreático in vitro (Berberal et al., 2005), foi feita a inibição da HO-1 utilizando siRNA e foi visto um aumento na sensibilidade destas células à morte causada por Gemcitabine, radiação gama e estresse oxidativo, comparado com células não tratadas. Também foi visto uma redução na proliferação e viabilidade celular em meio de cultivo puro, demonstrando que a HO-1 possui atividade importante na sobrevivência destas células. Um dos mecanismos principais pelo qual a radioterapia induz a apoptose das células cancerígenas é pela formação de ROS que causa danos oxidativos na célula. Estima-se que as fortes propriedades antioxidativas da HO-1 exerçam um papel citoprotetor, que aumenta as taxas de sobrevivência celular (Jayakumar et al., 2014; Mantovani e Allavena, 2015; Sae Lo-oom et al., 2016).

A HO-1 inibe de forma direta os mecanismos de apoptose pelos seus subprodutos. Tanto a bilirrubina quanto CO são capazes de regular este processo, estimulando a expressão de Bcl2, uma molécula anti apoptótica e inibindo a expressão de p53, respectivamente (Fang et al., 2004; Kim et al., 2009). O CO também é capaz de inibir a liberação do Citocromo C mitocondrial, um passo crucial na iniciação da apoptose.

A administração de terapias antitumorais convencionais causa danos nos tecidos, havendo a liberação de padrões moleculares associadas à dano (DAMPs) que levam a uma resposta inadequada de reparo tecidual por esses macrófagos, em que promovem a vascularização e detoxificação do meio tumoral, auxiliando na reincidência da doença (Mantovani e Allavena, 2015). Neste contexto, a expressão de HO-1 e HIF-1, tanto pelas células

tumorais, como pelas células do estroma é associada com maior angiogênese, supressão da resposta imune, maior taxa de crescimento tumoral, maior resistência contra danos oxidativos e tratamentos anticâncer com evolução mais rápida para metástase, sendo fatores importantes na moldagem do microambiente tumoral (Henke Mazzone, 2016; Petrova et al., 2018; Was, Dulak e Jozkowicz 2010).

1.4 A fagocitose de hemácias por macrófagos do tumor

As hemorragias são eventos frequentes em tumores murinos e humanos, devido à instabilidade vascular e a invasão de outros tecidos pelas células cancerígenas (Miller e McGregor, 1980; Ryschich et al., 2002; Hamzah et al., 2008). Nestas ocasiões, ocorre o extravasamento de hemácias para o meio tumoral junto com uma série de moléculas do plasma, sendo removidas pelos TAMs.

As hemácias são as células do sangue que realizam o transporte de gases no organismo, carregando oxigênio para os tecidos e levando o gás carbônico gerado pelo corpo para ser exalado nos pulmões, além de outros gases, estando presentes em altas concentrações no sangue. O carregamento de gases por estas células é realizado pela hemoglobina, uma proteína que possui 4 moléculas de Heme na sua composição e está presente em enormes quantidades dentro das hemácias, havendo cerca de $2,5 \times 10^8$ moléculas por hemácia, sendo o seu principal componente (Soares e Hamza, 2016).

As hemácias humanas possuem uma vida útil de 120 dias em condições fisiológicas. Neste período a hemácia acumula danos oxidativos que diminuem sua capacidade de carregamento de gases, sendo por fim removida da circulação por macrófagos no fígado, medula óssea ou no baço e recicladas para a produção de novas hemácias (Soares e Hamza, 2016). No entanto, a fisiologia das hemácias é alterada com a progressão tumoral, sendo comum o desenvolvimento da anemia em animais com tumores, ocorrendo a redução no hematócrito e no teor de hemoglobina destes animais (Knight, Wade e Balducci, 2004). Este fenômeno pode ocorrer por conta das próprias hemorragias tumorais, em que uma quantidade considerável de células se perde de forma crônica.

Modificações hematológicas também são observadas nesses animais e podem contribuir para o quadro anêmico. Em camundongos e humanos, foi descrito que diferentes tipos de tumores (Câncer de mama, Cólon e Ehrlich) são capazes de induzir uma redução no status redox de glutathiona (GSH/GSSG) no sangue, um medidor importante do ambiente oxidativo (Navarro et al., 1999). Este aumento ocorre, dentre outros fatores, devido a produção de altas quantidades

de ROS pelos tumores e pela liberação de GSSG por outros tecidos no sangue, podendo causar danos oxidativos nas hemácias. O estresse oxidativo em hemácias reduz sua deformabilidade, necessária para passar por capilares pequenos e transportar oxigênio, além de induzir o envelhecimento da célula, propiciando a sua remoção precoce da circulação (Mohanty, Nagababu e Rifkind, 2014), condizente com relatos de menor tempo de vida das hemácias em pacientes com câncer de rim (Li et al., 2019). Este tipo de estresse ocorre especialmente em resposta à exposição destas células à hipóxia, quando a hemoglobina se encontra parcialmente oxigenada, sofrendo auto-oxidação que produz ROS na membrana celular. Assim tumores, que são altamente oxidativos e hipóxicos, contribuiriam para um ambiente de estresse para as hemácias, levando à sua fagocitose por leucócitos e especialmente, macrófagos.

O heme é um indutor clássico de HO-1, de forma que sua liberação pode resultar num aumento da sua expressão nas células que formam o tumor. Essa hipótese condiz com relatos de expressão aumentada de HO-1 em melanomas e TAMs (Deininger et al., 2000; Torisu-Itakura et al 2000). Desta forma, o heme, através da indução de HO-1, poderia estar atuando como um fator que promove a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2. Inclusive, a expressão de HO-1 é necessária para a sobrevivência dos macrófagos eritrofagocitários (Kovtunovych et al., 2010), ocorrendo a depleção desta população por necroptose no fígado e baço de animais HO-1^{-/-}. A incapacidade dos macrófagos destes animais em metabolizar o heme das hemácias fagocitadas resultou em danos renais e hepáticos, hipoesplenismo, anemia, hemólise intravascular e redistribuição do conteúdo de ferro no corpo, com aumento da quantidade de heme e hemoglobina no sangue, rins e hepatócitos.

O heme também pode induzir a expressão de HO-1 nas células tumorais diretamente, auxiliando a sobrevivência e progressão do tumor, sendo visto em um trabalho com células de hepatocarcinoma que o heme estimula a proliferação celular das células cancerígenas (Wen, 2002).

Um trabalho publicado por Pfefferlé M. e colaboradores (Pfefferlé M. et al 2020) demonstrou o potencial que a eritrofagocitose possui na polarização de macrófagos anti-inflamatórios. Neste trabalho utilizou-se animais com uma mutação no gene *Spta sph/sph*, que produz uma proteína do citoesqueleto específica de eritrócitos, gerando um modelo de hemólise hepática crônica. Nestes animais as células de Kupffer (os macrófagos residentes do fígado) se diferenciam em um fenótipo altamente anti-inflamatório que foi denominado de eritrofagócito, visto que realizam constantemente a fagocitose de eritrócitos danificados no fígado, sendo descritos como *MarcchiHmoxhiMHCIIlow*.

Estas células apresentaram função protetora em dois modelos de doença inflamatória, inibindo fortemente o dano hepático. Um dos modelos de doença foi induzido pela dieta deficiente em metionina e colina, que causa esteatose, inflamação e dano hepatocelular em animais selvagens, sendo estes sintomas quase ausentes nos animais *Spta sph/sph* devido à atividade dos eritrofagócitos. Estes eritrofagócitos também são pouco responsivos à inflamação induzida por LPS e IFN-gama, apresentando secreção reduzida de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, foi demonstrado, neste modelo, que a fagocitose de heme por macrófagos após eventos hemolíticos leva à sua diferenciação em um fenótipo anti-inflamatório regulado pela expressão de HO-1 e Nrf2.

A influência das hemácias sobre a progressão de tumores é um assunto mais polêmico. Foi reportado que a liberação de hemoglobina ou hemácias no meio tumoral é capaz de promover o crescimento do tumor em modelo de câncer de mama e melanoma murino (Yin, 2015). Observou-se um aumento da proliferação celular mediado pela expressão de c-myc, cyclin D1 e HO-1 pelas células tumorais, além de maior resistência a quimioterapia pela expressão do mecanismo ABCB1 de transporte de múltiplas drogas e Nf-kappaB. Também foi visto um aumento na presença de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF-alfa, mas também de TGF-beta e moléculas pró-angiogênicas como IL-8 e VEGF, havendo maior formação de capilares nos tumores expostos ao conteúdo de hemácias lisadas. De forma geral as hemácias levaram ao estabelecimento de um meio inflamatório promotor da progressão tumoral, caracterizado pela formação de novos vasos e proliferação celular aumentada. Neste trabalho também se viu um aumento na população dos macrófagos do tipo M2 dentro do tumor pela expressão de marcadores de diferenciação, no entanto eles não conseguiram reproduzir estes resultados in vitro, em que observaram uma polarização para o tipo M1 provavelmente devido à atividade do Heme como um DAMP (Prestes et al., 2020; Bozza e Jeney, 2020). Também não foram realizados experimentos para analisar o estado funcional destas células, restando uma dúvida sobre como as hemácias induzem esta polarização in vivo.

Interessantemente, outro trabalho mais recente fez achados opostos, em que se concluiu que o extravasamento de hemácias leva à polarização de macrófagos a fenótipos antitumorais, resultando na formação de tumores menores (Costa e Silva et al., 2017). Neste artigo foram encontrados macrófagos associados a regiões com extravasamento de hemácias de tumores de pulmão carregados com ferro intracelular, o que seria um sinal de que ocorreu a fagocitose destas hemácias. Argumenta-se que estes macrófagos possuem atividade inflamatória, devido a um aumento de citocinas pró-inflamatórias e de células Gr-1⁺, apesar de haver um aumento na quantidade de mRNA de HO-1, CD163 e CSF-1, um fator de crescimento associado com

malignidade em vários tipos de tumores (Pollard 2004; Pyonteck et al., 2013). Outros experimentos que caracterizaram o fenótipo e funcionalidade destes macrófagos foram realizados apenas *in vitro*, correspondendo com as observações feitas por (Yin et al., 2015) e observados especialmente pelo estímulo com Hemácias envelhecidas por meios químicos, sendo menos acentuados quando utilizadas Hemácias normais. Desta forma, não se abordou diretamente os efeitos da sinalização pelo Heme em macrófagos no contexto do microambiente tumoral.

Ambos os trabalhos não levam em consideração a heterogeneidade de ambientes no tumor e as diferentes populações de macrófagos infiltrantes, sendo possível que a sinalização pelo heme leve a efeitos distintos, de acordo com cada situação.

As diferentes propriedades físico-químicas do microambiente tumoral estão conectadas para a manutenção das características do tumor. Desta forma, o mesmo estímulo pode levar a respostas diferentes em tipos de tumores distintos, devido a presença ou ausência de um fator e do tipo celular. Por exemplo, dentro de um mesmo tumor, existem populações heterogêneas de células mieloides, inclusive de diferentes TAMs devido às diferentes condições do microambiente, com células M2 se concentrando em regiões hipóxicas e células M1 em regiões de normóxia (Mohavedi et al., 2010). Em diferentes tipos de tumores a colonização por macrófagos pode ser um bom ou mau marcador prognóstico, como no câncer colorretal em que a presença de macrófagos auxilia no controle da doença devido à sua atividade antitumoral (Forsell et al., 2007). Da mesma forma, a expressão de HO-1 e HIF-1 possui efeitos distintos dependendo do tipo celular do tumor, podendo possuir função pró- ou antitumoral (Petrova et al., 2018; Was, Dulak e Jozkowicz, 2010).

A liberação de Heme após eventos hemolíticos induz uma resposta inflamatória forte que contribui para o desenvolvimento de diversas doenças como sepse (Rasmus et al., 2010), dano cerebral pós-hemorragico (Cássia et al., 2018) e na patologia de doenças hemolíticas como a Beta-Talassemia e Anemia Falciforme (Vinchi et al., 2013). Além disso, o Heme foi descrito como um ativador de TLR4 e NLRP3 (Figueiredo et al., 2007; Dutra e Bozza, 2014) induzindo a liberação de TNF-alfa e IL-1b (Fortes et al., 2012; Dutra et al., 2014). No entanto, no meio tumoral, onde são comuns regiões de hipóxia com altas concentrações de ácido láctico e outros metabólitos que afetam a expressão de vias de estresse como a HO-1 (Furfaro et al., 2015; Colegio et al., 2017; Pollard 2004), é possível que a fagocitose de hemácias leve à polarização ao tipo M2, anti-inflamatório, visto que a atividade elevada da HO-1 conseguiria neutralizar o Heme, transformando-o em subprodutos anti-inflamatórios com geração reduzida de ROS.

1.5 O desenvolvimento dos melanomas pode ser afetado por hemorragias intratumorais

O câncer de pele é o tipo de câncer mais diagnosticado no Brasil, correspondendo a cerca de 30% dos diagnósticos, no entanto muitos destes casos não são malignos (INCA). Os Melanomas são o tipo mais perigoso de câncer de pele afetando os Melanócitos, células que habitam a parte basal da epiderme e produzem melanina. Nos casos malignos, o tumor se expande primeiro de forma radial, permeando a epiderme e depois de forma vertical, penetrando na derme e tecidos conjuntivos subdermais, causando hemorragias e tipicamente o espalhamento de metástases em órgãos distantes como o pulmão, ossos, cérebro e fígado, etapa na qual aumenta-se muito as chances de óbito do indivíduo (INCA).

Um trabalho (Was, 2006) descreveu os efeitos da superexpressão de HO-1 em melanomas de camundongo utilizando células B16, lembrando que a expressão de HO-1 é naturalmente detectada em melanomas humanos e murinos (Naito, Takagi e Nashimura, 2014; Furfaro et al., 2015). Neste trabalho, induziu-se a superexpressão de HO-1 em células tumorais pela inserção de plasmídeos, apresentando taxas de proliferação celular até 2.5 vezes maior em comparação a células normais. Se postulou que este efeito ocorre pela inibição de p21, um inibidor importante do ciclo celular, de BTG2, um inibidor da pRb, e de Mdm2, o inibidor da p53, mediado pela ação da HO-1, provavelmente pela ação de seus subprodutos. A HO-1 também levou a um aumento da resistência a danos oxidativos nestas células auxiliando na adaptação das células tumorais às condições do microambiente em que se encontram, e mais resilientes aos ataques do sistema imune, visto que a produção de ROS leva a danos em diversas macromoléculas, inibe o ciclo celular e estimula a apoptose. As células de Melanoma possuem capacidade de induzir a angiogênese pela secreção de VEGF e EGF, potencial que foi aumentado em até 10 vezes pela superexpressão de HO-1. A HO-1 também contribuiu na supressão imune do tumor. A quantificação de citocinas pró-inflamatórias no tecido tumoral, como TNF-alfa revelou que a HO-1 manteve os níveis de TNF iguais aos de um tecido saudável, enquanto o Melanoma selvagem apresentou níveis elevados de TNF sérico e tecidual. Adicionalmente, detectou-se uma maior concentração de sTNFRI no soro e no tumor. Esta molécula é uma 'scavenger' de TNF, competindo com receptores celulares e inibindo a sinalização do TNF-alfa. Isso resultou na diminuição dos edemas inflamatórios e infiltração leucocítica.

Depois de uma hemorragia intratumoral o extravasamento de hemácias no tumor pode estar associado a estes efeitos anti-inflamatórios. Desta forma, seria interessante avaliar a influência que as hemácias possuem sobre a modulação do microambiente tumoral de

melanomas. A ativação da HO-1 pela hemoglobina possivelmente resulta no aumento da sobrevivência e vascularização dos tumores, tanto por efeitos mediados por macrófagos quanto pela expressão de mecanismos citoprotetores nas células tumorais.

A linhagem celular B16 de melanomas foi utilizada para a realização dos experimentos. Das linhagens celulares utilizadas no trabalho citado acima (Was, 2006) observou-se que a B16 foi a mais sensível a danos oxidativos mediados pelo H_2O_2 e que a expressão de HO-1 teve um efeito mais protetor, preservando a viabilidade celular. Existem trabalhos que exploram a resposta imune contra esta linhagem tumoral. As células B16 são células cancerígenas agressivas com grande potencial proliferativo. Foi visto que possuem capacidade de ativar uma resposta imune adaptativa em camundongos BALBC pela expressão de neoantígenos tumorais, no entanto essa resposta não é capaz de levar à rejeição do tumor, permitindo o desenvolvimento da doença até o óbito, sendo necessário descobrir maneiras de aumentar o potencial imunogênico contra estas células (Heath e Boyle, 1985).

Os macrófagos são células que desempenham um papel importante na resposta antitumoral, em que sua interação com as células cancerígenas levaria à apresentação de neoantígenos e ativação da imunidade, porém este processo não ocorre de forma eficiente, sendo sugerido que seria interessante descobrir formas de melhorar a interação dos macrófagos com o tumor. É possível que o microambiente tumoral seja um fator determinante na função destes macrófagos. Como já foi discutido, o microambiente tumoral apresenta características físico-químicas, como a hipóxia, baixo pH e presença de grandes quantidades de ROS. Estas são capazes de modular o fenótipo de macrófagos pela regulação da expressão gênica governada por mecanismos de resposta ao estresse como HIF-1 e HO-1, polarizando estas células para o tipo M2, que possui potencial pró-tumoral e função de apresentação de antígenos reduzida. Nossa hipótese é que a eritrofagocitose pelos macrófagos tumorais estimule estas células a assumirem características de macrófagos M2 e desempenhar funções pró tumorais, expressando a HO-1 e outras moléculas da via de Nrf-2.

2 Justificativa

Melanomas são tumores altamente agressivos e prevalentes no Brasil. Apesar de já existirem uma série de tratamentos contra esta doença, estes apresentam baixa eficácia após a ocorrência de metástases do tumor. O microambiente tumoral é decisivo na progressão da doença e resistência a imunoterapia, definindo o fenótipo das células integrantes do tumor e modulando a resposta imune antitumoral, no entanto, ainda não se sabe exatamente como ocorre

a formação deste microambiente. Desta forma, seria interessante explorar a função que as hemácias desempenham na modulação de macrófagos no microambiente tumoral e na progressão de melanomas.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Determinar a influência que as hemácias oriundas de eventos hemorrágicos possuem sobre macrófagos em microambiente tumoral.

3.2 Objetivos Específicos

Caracterizar a população de macrófagos fagocíticos de hemácias em melanomas.

Avaliar o efeito das hemácias sobre a população de células imunes no melanoma.

Analisar simultaneamente em tumores a localização de células hipóxicas e eritrofagocíticas.

Caracterizar macrófagos estimulados com hemácias e Lactato *in vitro*.

4 Materiais e Métodos

4.1 Cultura de células B16-OVA e coleta de macrófagos derivados de medula óssea

As células de melanoma murino B16 foram mantidas em meio DMEM High-Glucose completo (Lonza) (10% de Soro Fetal Bovino inativado (SFB), 1% HEPES, 1% Piruvato de Sódio, 0,1% Beta-Mercaptoetanol e 1% Penicilina-Estreptomicina) à 37° C com 5% gás carbônico (CO₂).

Para a obtenção dos macrófagos derivados de medula óssea (BMDM), foram sacrificados camundongos B57/6c e extraiu-se os fêmures e as tíbias. As extremidades dos ossos foram cortadas e a medula óssea foi extraída utilizando uma seringa de 1mL com meio RPMI-1640 (Lonza). Em seguida, a medula óssea de cada animal foi distribuída entre 3 placas contendo 8 mL de meio RPMI completo (10% SFB e 1% Penicilina e Estreptomicina) e 2 mL de meio RPMI condicionado por células L929 contendo M-CSF para a diferenciação em macrófagos. As células foram mantidas à 37°C com 5% CO₂.

Número do CEUA: IMPG011

4.2 Isolamento de hemácias

Um capilar de vidro para microhematócrito foi utilizado para coletar cerca de 200uL de sangue através da via plexo orbital dos animais. O sangue foi coletado em um eppendorf contendo 200uL de Heparina sódica para impedir a coagulação. O tubo foi centrifugado à 1800 g por 5 minutos a temperatura ambiente, em seguida, o sobrenadante e a camada de leucócitos foram removidos. Em seguida as hemácias restantes foram lavadas 3 vezes com 200uL de PBS estéril e centrifugada a 2000 g por 5 minutos. Por fim, as hemácias foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI e utilizadas frescas ou envelhecidas *in vitro* para serem utilizadas para o estímulo de macrófagos.

Para o envelhecimento *in vitro*, hemácias (1×10^9) foram incubadas em 1 mL de meio RPMI contendo 100 uM de Cloreto de Cálcio (CaCl_2) e 4 uM de ionomicina por 2h a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS, a fim de remover o CaCl_2 e ionomicina, antes de terem sido ressuspensas em meio RPMI para os estímulos dos macrófagos.

4.3 Modelo *in vivo* de indução tumoral

As células B16-OVA foram soltas da garrafa utilizando tripsina 0,25% por 3 minutos a 37°C. Em seguida as células foram contadas e ressuspensas em PBS a fim de atingir uma concentração de 3×10^6 células/mL. Foram injetados 100ul por animal (3×10^5 células) no flanco direito dos camundongos e após 14 ou 21 dias o tumor foi removido e processado.

Em alguns ensaios, hemácias foram injetadas no tumor no dia 12 após a injeção inicial do tumor. Para a injeção nos tumores, diluiu-se 1×10^8 hemácias em 50 uL e estas foram injetadas o mais próximo possível do tumor.

4.4 Excisão e preparo de suspensões celulares a partir de tumores

Os tumores murinos foram mecanicamente dissociados utilizando-se um par de tesouras cirúrgicas e digeridos quimicamente com colagenase IV e DNase I em DMEM 10% SFB por 30 minutos a 37° C, sob movimentação (150 rpm). Após este tempo, a massa celular foi passada repetidamente por uma agulha de 18G para melhor dissociação dos grumos e deixada mais 30 minutos em meio de digestão. Em seguida, foi adicionado EDTA 1:15 para parar a reação. A suspensão tumoral foi filtrada utilizando um filtro celular de 70 um, lavada com tampão de FACS e centrifugada a 400 g a 4° C. As hemácias foram lisadas após incubação com tampão ACK por 1 minuto seguido de lavagem com tampão de FACS. As amostras foram

ressuspensas em tampão de FACS e mantidas em gelo e seguiram para a marcação imunofenotípica e citometria de fluxo.

4.5 Estímulo *in vitro* de BMDM

Foram plaqueadas 5×10^5 BMDMs por poço em placas de 12 poços em 1 mL de RPMI completo por 24 horas até os macrófagos aderirem ao fundo. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado ou coletado e substituído por 1 mL de Macrophage growth medium (MGM) composto de 75% de RPMI completo e 25% de meio condicionado de L929 no qual foram feitos os estímulos. As células foram estimuladas por 24 horas com LPS 200 ng/mL (InVivoGen), IL-10 20 ng/mL (eBioscience), lactato de sódio 25 mM doado pela Professora Miriam Werneck, heme 100 uM e hemácias frescas (10^8 células/mL) ou envelhecidas (10^8 células/mL). Após o estímulo, as células foram utilizadas para citometria de fluxo, extração de proteínas seguida de western blot e o sobrenadante foi utilizado para ensaio imunoenzimático.

4.6 Imunofenotipagem e citometria de Fluxo

Para os experimentos *in vitro*, os macrófagos foram lavados 3 vezes com PBS e poços com hemácias foram tratados por 30 segundos com ACK para sua remoção. Logo após, foram coletados em 600 uL de FACS Buffer (PBS 2% SFB), centrifugados a 400 g por 5 min e ressuspensos em PBS contendo anti-CD16/32 (1:50) e Live/Dead (1:1000) por 30 min a 4°C para impedir a ligação destes receptores com a porção Fc dos anticorpos de marcação. Em seguida, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços com fundo em V. Para marcação extracelular utilizou-se os seguintes anticorpos monoclonais anti-camundongo conjugados a fluorocromos: anti-CD86, CD80, MHC-II, CD38 e CD64 diluídos em tampão de FACS. Em seguida, as células foram lavadas e fixadas com 100 uL de tampão de fixação/permeabilização da eBioscience REF 00-5132-43 por 20 min. A partir deste momento as lavagens foram realizadas utilizando o tampão de Permeabilização da eBioscience REF 00-8333-56. As células foram lavadas duas vezes e as marcações intracelulares foram feitas com anticorpos monoclonais anti-CD206, Egr-2, arginase-1 e TER-119 diluídos em tampão de permeabilização durante 30 minutos. Após lavagem, as células foram ressuspensas em tampão de FACS e foram levadas para a aquisição no citômetro de fluxo.

As suspensões de tumor foram marcadas com 2 coquetéis de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos distintos. O coquetel 1 foi composto de anti-CD45, CD11b, MHC II, CD64, Ly6C, CD11c, F4/80, CD206, CX3CR1 e TER-119. O coquetel 2 foi composto de anti-CD45, CD4, CD25, CD127, CD44, TCRb e CD8. Além disso, em determinados ensaios

os animais foram injetados com EF5 para a detecção de células em hipóxia de acordo com o protocolo do kit “EF5 Hypoxia Detection Kit, Cyanine 3” (EF5-30C3) da Millipore Corp.

Todas as amostras foram lidas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa™ da unidade multiusuário de citometria da UFRJ e analisadas utilizando o programa FlowJo X.

Lista de anticorpos utilizados:

CD86 PE 12086181 eBioscience

CD80 APC 17090181 eBioscience

MHC-II Bv 711

CD38 Bv421 48038180 eBioscience

CD64 PE/D 139320 Biolegend

CD206 PECy7 141720 Biolegend

Egr-2 PE 12669180 eBioscience

Arg-1 APC

TER-119 FITC 557915 BD Biosciences

CD45 Bv785 103149 Biolegend

CD11b e780 47011282 Thermo Fischer Scientific

Ly6C PercPy 5.5 128011 Biolegend

CD11c PE 557401 BD Biosciences

F4/80 APC 50480181 eBioscience

CX3CR1 Bv650

CD4 Bv421 48004282 eBioscience

CD25 FITC 553072 BD Biosciences

CD127 APC 17127182 eBiosciences

CD44 PE 553134 BD Biosciences

TCRb PECy7 25596182 eBioscience

CD8 PerCP-Cy5.5 47008182 eBioscience.

4.7 ELISA

Para a quantificação de IL-10, IL-6 e TNF-alfa no sobrenadante das células foram utilizados os seguintes kits comerciais: Murine TNF-alfa Standard TMB ELISA Development Kit #900 T-54 da Peprotech, Mouse IL-6 DuoSet ELISA #DY406-05 da R&D Systems e Murine IL-10 ELISA Development Kit #900-K53 da Peprotech. As dosagens foram realizadas de acordo com o protocolo dos kits.

5 Resultados

5.1 Os tumores são habitados por um grupo fenotipicamente distinto de macrófagos eritrofagocitários

Como discutido na introdução, as hemorragias são eventos frequentes em tumores, nos quais ocorre a liberação de grandes quantidades de hemácias da corrente sanguínea para o tecido tumoral. A remoção destas células é realizada principalmente pelos macrófagos, células da imunidade inata com grande capacidade fagocítica capazes de suportar quantidades elevadas de Heme intracelular, mantendo a “homeostase” do tumor. Desta forma, nosso primeiro objetivo foi localizar e caracterizar fenotipicamente a população de macrófagos eritrofagocitários.

Para este fim, foram injetadas células de linhagem de melanoma B16 em camundongos B57/6c nos quais o desenvolvimento tumoral ocorreu sem interferência por 14 ou 21 dias e os tumores formados foram analisados por citometria de fluxo. A marcação intracelular com anti-TER-119 foi usada como critério para identificar células eritrofagocitárias. O TER-119 é uma molécula de superfície expressa exclusivamente em eritrócitos maduros e sua presença em outras células é um potencial indicador da fagocitose de hemácias. Sendo esperado que a maior parte das células TER-119⁺ sejam macrófagos.

Nos tumores de 14 dias, foi observado que cerca de 12% das células mielóides infiltrantes (CD11b⁺CD45⁺) eram TER-119⁺, sendo, realmente, a maioria destes macrófagos (CD64⁺F4/80⁺) (Figura 1a), de forma que os macrófagos TER-119⁺, a quem nos referiremos como eritrofagócitos, representaram 10% das células mielóides infiltrantes. Enquanto isso os macrófagos TER-119⁻ representaram em média 50% (Figura 1b). Aos 21 dias houve uma diminuição não significativa na quantidade de macrófagos, sendo os eritrofagócitos 5,5% das células mielóides enquanto os macrófagos TER-119⁻ representaram 41.4%, observando-se uma tendência discreta para a diminuição do infiltrado de macrófagos com a progressão da doença.

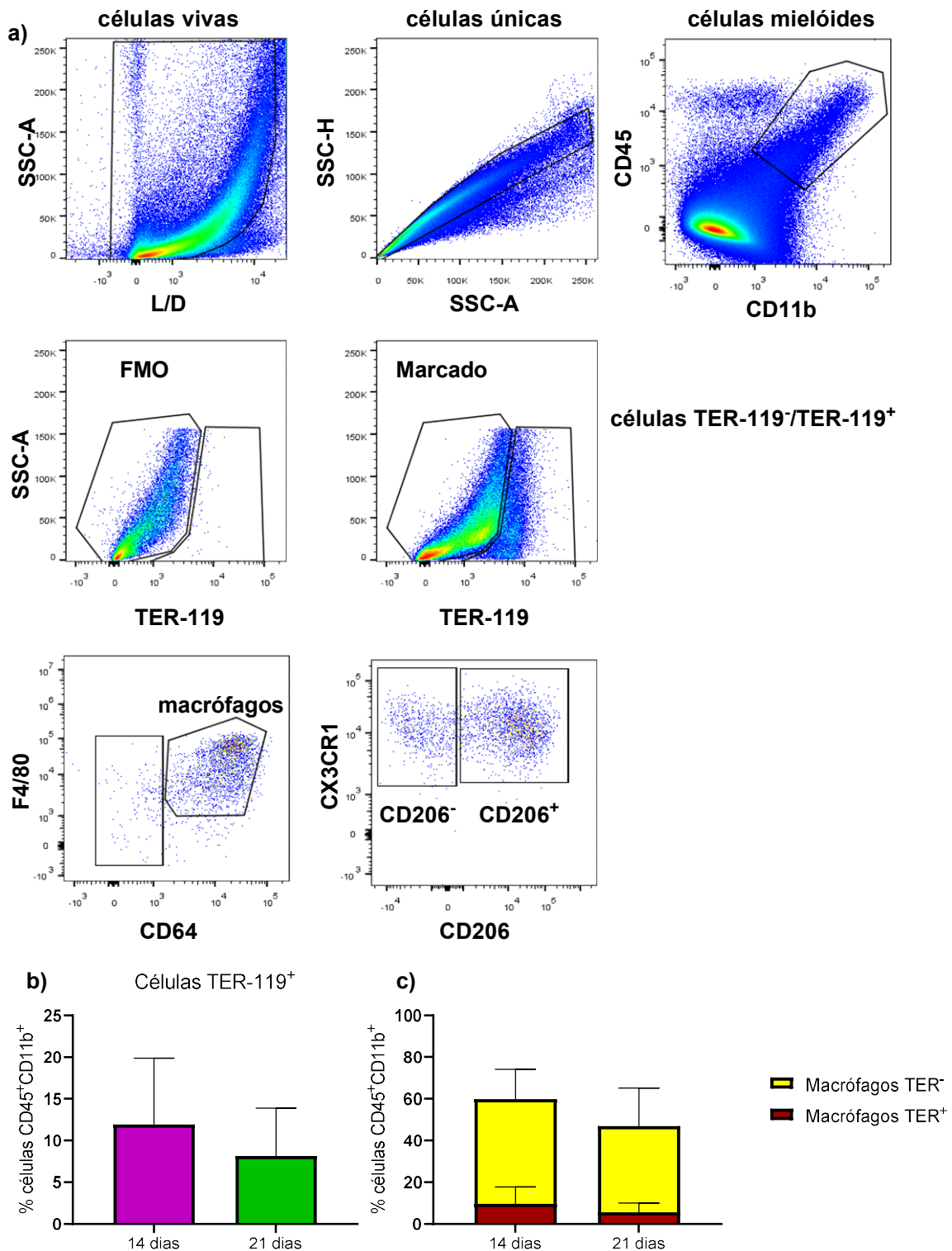


Figura 1 - O tumor é infiltrado por macrófagos TER-119⁺: Gráficos representando populações de células em suspensões de tumores de 14 ou 21 dias. Porcentagens alcançadas pelo agrupamento das células em *gates*. (a) Estratégia de gate utilizada para separar os macrófagos da suspensão de células do tumor. Primeiro foram separadas as células vivas pela marcação com live/dead e de células únicas. Em seguida, as células positivas para CD45 e CD11b foram agrupadas como células mielóides infiltrantes. Dentro deste grupo, as células foram separadas pela presença do TER-119 intracelular. Esse gate foi feito com o auxílio de um grupo FMO, que são células marcadas com todos os anticorpos utilizados exceto o anti-TER-119, visualizando-se melhor a marcação. Dentro dos grupos TER-119⁻ ou TER-119⁺ foram separados os macrófagos pela expressão de CD64 e F4/80 e em seguida esses foram

separados em grupos distintos pela expressão do CD206. Essa estratégia foi utilizada nos outros experimentos com macrófagos *in vivo*. (b) Porcentagem das células mieloides (CD45/CD11b⁺) que eram TER-119⁺. (b) Representação em porcentagem dos macrófagos TER⁻/TER⁺ dentro das células mieloides (CD45/CD11b⁺). Os tumores foram coletados de animais após crescerem por 14 ou 21 dias e foram processados em suspensões de células, usadas para marcação por citometria de fluxo. Para o grupo de 14 dias foram realizados 3 experimentos, totalizando 7 animais e para o grupo de 21 dias foram realizados 5 experimentos totalizando 8 animais.

Em seguida, os macrófagos foram analisados para a expressão do marcador M2 CD206. Enquanto os macrófagos TER-119⁻ possuíram uma distribuição aproximadamente equivalente de células CD206⁺ e CD206⁻, observou-se um enriquecimento significativo na expressão de CD206 nos eritrofagócitos, sendo cerca de 77% destes CD206⁺ (Figura 2a). Este efeito foi mais acentuado com a progressão do tumor no dia 21, em relação ao dia 14.

A partir disso, os macrófagos foram separados de acordo com a expressão de CD206 para avaliar mais profundamente seus fenótipos. Foi visto que os mesmos eritrofagócitos que expressam CD206 também expressam altas quantidades de MHCII, CD38, CD64 e CD11c (Figura 2b). Os macrófagos TER⁻ CD206⁺ também apresentaram aumento na expressão de MHCII e CD64, no entanto sua expressão de CD38 se manteve baixa. O conjunto dos resultados sugere que a eritrofagocitose contribui para a ativação dos macrófagos, expressando marcadores em ambos os espectros de diferenciação. É comum que os macrófagos tumorais não estejam completamente polarizados, devido à abundância de sinais pró e anti-inflamatórios no tumor.

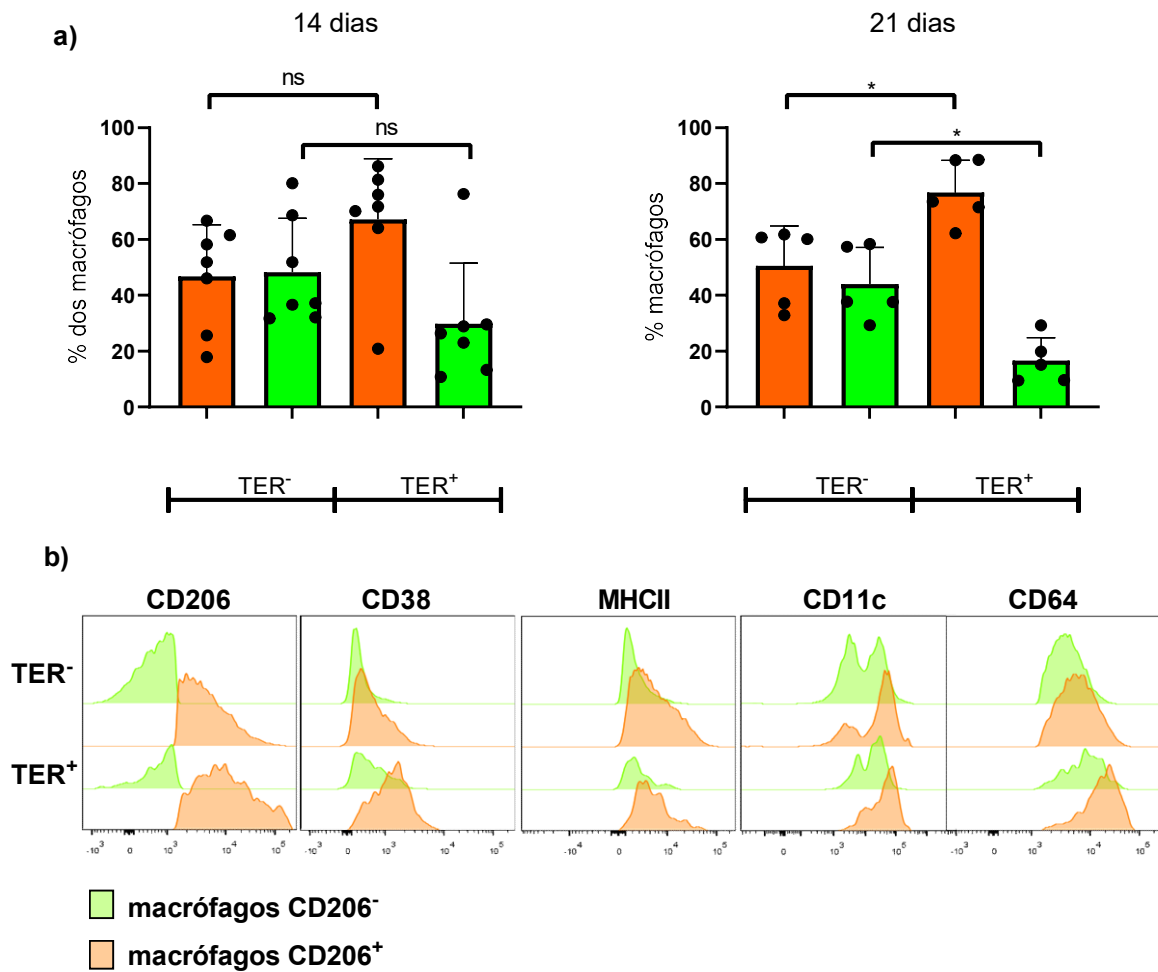


Figura 2 – Os macrófagos TER-119⁺ assumem um perfil superativado: (a) Proporção de macrófagos tumorais que expressam CD206 de acordo com a presença de TER-119 nos dias 14 e 21. (b) Gráfico representativo de 12 tumores de 14 ou 21 dias, mostrando a expressão dos marcadores CD38, MHCII, CD11c e CD64 em quatro grupos distintos de macrófagos tumorais, de cima para baixo no gráfico; TER⁻CD206⁻, TER⁻CD206⁺, TER⁺CD206⁻ e TER⁺CD206⁺. A cor verde representa macrófagos CD206⁻ e a cor laranja representa células CD206⁺. Resultados obtidos a partir da citometria de fluxo de suspensões de células de tumor. N (14 dias) = 7 animais; N (21 dias) = 5 animais. * significa P-valor < 0.05, ns significa não significativo.

5.2 A expressão do CD206 nos eritrofagócitos está associada com a hipóxia no tumor

A hipóxia é um fator ambiental proeminente de tumores que é capaz de induzir a expressão de marcadores do tipo M2 em macrófagos, sendo possivelmente um fator importante para o estabelecimento da polarização observada. Assim, a fim de explorar a relação entre a expressão de CD206 nos macrófagos eritrofagocitários e a hipóxia, foi realizada a injeção intravenosa do composto EF5 nos animais horas antes da eutanásia. O EF5 é um composto capaz de formar adutos em células com baixa pressão de oxigênio intracelular, gerando um sinal fluorescente detectável.

Primeiramente, observamos que a maior parte (>70%) dos macrófagos eritrofagocitários se encontram em hipóxia. Por outro lado, a maioria dos macrófagos TER⁻

(>70%) estão em normoxia (Figura 3b). Como esperado, a hipóxia foi fortemente relacionada com a expressão de CD206 nos macrófagos, sendo expresso em cerca de 80% dos macrófagos hipóxicos, e em apenas 43% dos macrófagos normóxicos (Figura 3a).

A análise simultânea da hipóxia e expressão de CD206 em macrófagos eritrofagocitários, revelou que a grande maioria das células CD206⁺ desse grupo são hipóxicas, enquanto as células hipóxicas representam menos da metade das células CD206⁺ do grupo TER⁻ (Figura 3c). Visto que, a presença de macrófagos eritrofagocitários ocorre em regiões de hipóxia, era esperado que a maior parte da expressão de CD206 fosse associado à essa condição, enquanto para as células TER⁻, que ocorrem principalmente em normóxia, grande parte da expressão de CD206 foi associado a outros fatores do meio tumoral. Desta forma, a causa para a expressão do CD206 nos macrófagos TER⁺ fica ambígua, o TER-119 pode ter um papel na indução, mas não há como isolar a influência do TER-119 da hipóxia quando quase todas estas células são hipóxicas.

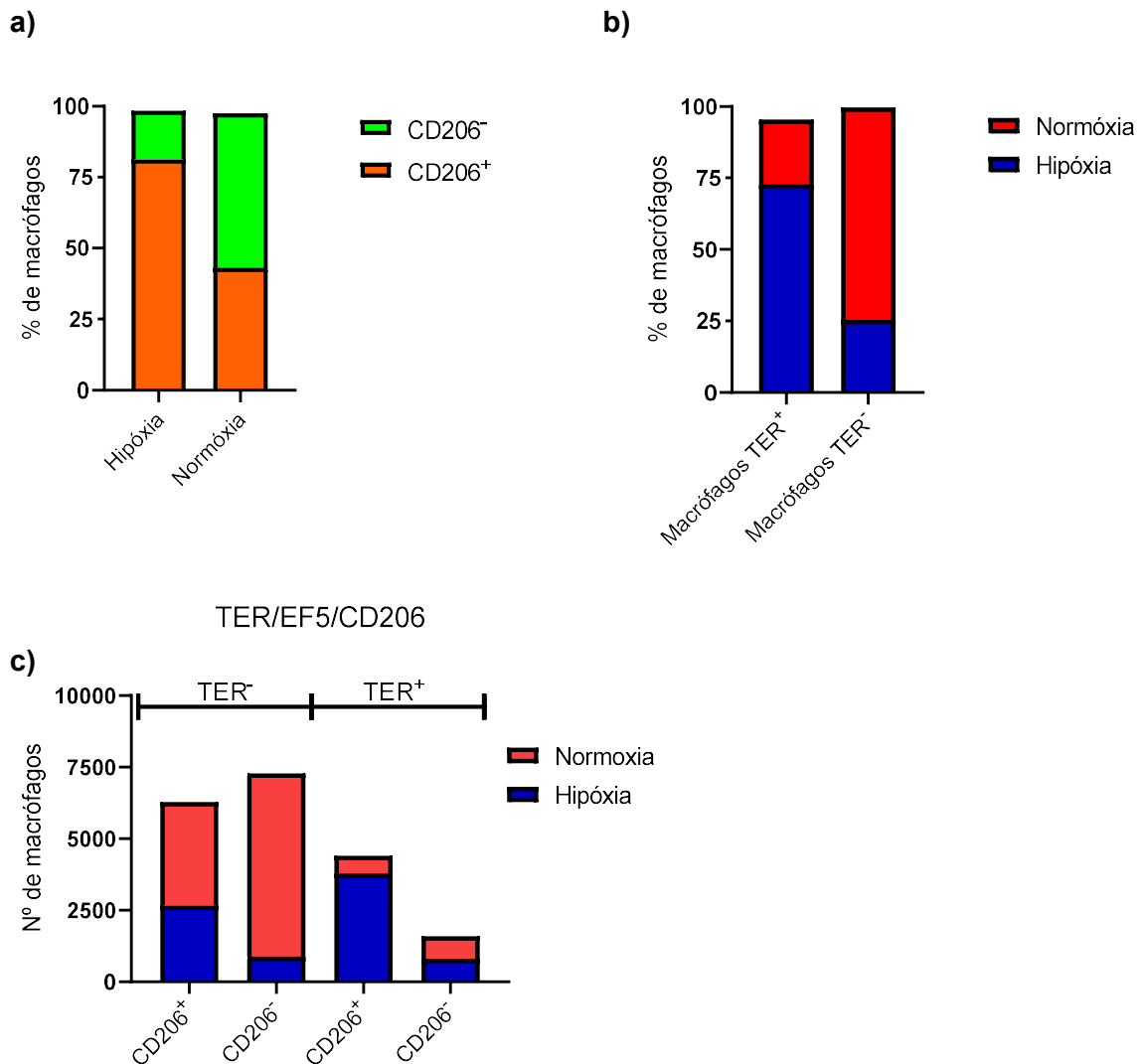


Figura 3 - A hipóxia é importante para a expressão de CD206 em eritrofagócitos tumorais: Animais com tumores de 14 dias foram injetados com EF5 intravenoso 3 horas antes de serem sacrificados. (a) Comparação entre macrófagos hipóxicos e normóxicos sobre sua expressão de CD206 mostra que uma maior proporção dos macrófagos hipóxicos expressam esse marcador (b) Relação entre a presença de TER-119 intracelular e a hipóxia em macrófagos tumorais, mostrando que o TER-119 se relaciona com células hipóxicas e a sua ausência se relaciona com células normóxicas. (c) Representação simultânea do número de macrófagos de acordo com a expressão de CD206, presença de TER-119 intracelular e hipóxia. Resultado obtido por citometria de fluxo em um experimento com dois animais.

5.3 Fatores do microambiente tumoral levam à polarização diferencial de eritrofagócitos comparado com condição *in vitro*

Após a caracterização dos eritrofagócitos *in vivo*, tivemos como objetivo isolar o efeito das hemácias e da hipóxia sobre macrófagos *in vitro*, a fim de compreender se esses sinais do meio tumoral estão envolvidos na polarização dos macrófagos. Devido à dificuldade de encontrar uma câmara de hipóxia utilizamos uma abordagem minimalista em que selecionamos o L-ácido láctico, uma molécula proeminente no meio tumoral resultante do metabolismo glicolítico de células hipóxicas, cuja capacidade de polarizar macrófagos para um fenótipo M2 é conhecida. Sua forma mais estável no organismo é como o sal de lactato de sódio, que foi utilizado como estímulo para os experimentos.

O meio tumoral é um ambiente de estresse para as hemácias, sendo expostas à ROS como peróxido de hidrogênio e à hipóxia, condição em que ocorre a auto oxidação da hemoglobina, causando estresse oxidativo na membrana da hemácia. Com o objetivo de simular as condições das hemácias no meio tumoral, foi utilizado o estímulo de hemácias envelhecidas *in vitro* com cloreto de cálcio e ionomicina. O uso dessas hemácias favorece a sua fagocitose pelos macrófagos em cultura, visto que o envelhecimento leva à exposição de fosfatidilserina na membrana das hemácias, no entanto outras alterações também ocorrem, como maior incidência de hemólise e liberação do conteúdo celular no meio de cultura.

Foram realizadas co-culturas de macrófagos com hemácias frescas ou envelhecidas (eHemácias), adicionando-se ou não 25 mM de lactato de sódio no meio, a fim de se observar a expressão de marcadores M1: CD38, CD64, CD80, CD86; Marcadores M2: CD206, Egr-2; e a expressão de HO-1 nestes macrófagos além da secreção das citocinas IL-10, IL-6 e TNF-alfa.

A co-cultura com hemácias frescas levou à diminuição na expressão de todos os marcadores de macrófago observados, tanto no espectro M1 quanto no M2; CD38, CD64, CD80, CD86, CD206 e Egr-2 (Figura 4), ocorrendo uma aparente inativação metabólica destas células. Não houve uma diferença significativa com a adição ou não de Lactato nestas culturas, exceto para a expressão de CD38, para o qual a adição de Lactato levou a um padrão errático de expressão. Esse perfil de ativação não se assemelhou com o observado *in vivo*.

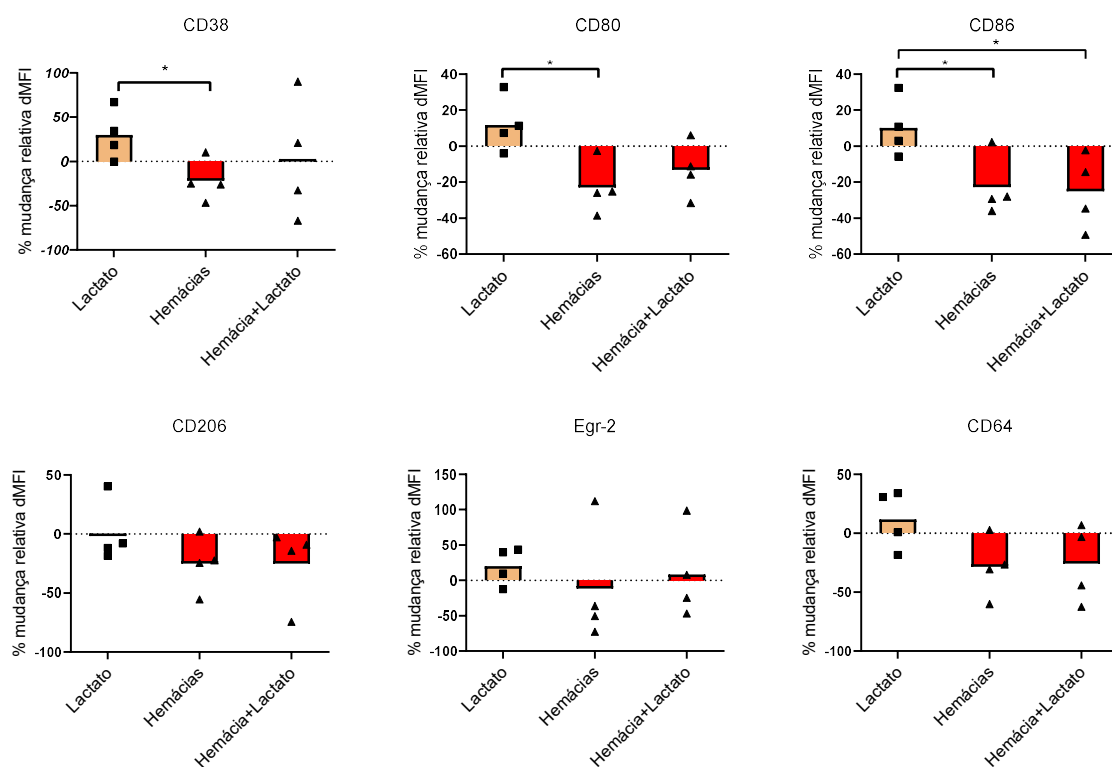


Figura 4 - Fenotipagem de BMDMs estimulados com hemácias frescas: BMDMs foram cultivados por 24 horas em 1 mL de RPMI completo suplementado com 25% sobrenadante de L929 com os estímulos apontados e expressão dos marcadores foi analisada por citometria de fluxo. Foram analisadas alterações na expressão de CD38, CD80, CD86, CD206, Egr-2 e CD64 em macrófagos derivados de medula óssea após o estímulo com lactato de sódio 25 mM e 10^8 hemácias/mL comparado com controle não estimulado, representado por linha pontilhada. Resultado de quatro experimentos com estímulos feitos em duplicata.

Nas culturas com hemácias envelhecidas os macrófagos apresentaram um perfil de ativação bem diferente. Estas hemácias levaram a um aumento na expressão de CD38, CD64 e CD86, enquanto reduziram a expressão de CD80, CD206 e Egr-2, assumindo um perfil pró-inflamatório clássico. No entanto, parte destes efeitos foi atenuado pela adição de lactato no meio, impedindo a indução de CD86 e CD64 e reduzindo o aumento de CD38, porém tendo pouco efeito sobre a expressão de CD80, CD206 e Egr-2, que ainda foram reduzidos em comparação com o controle (Figura 5). Assim, o lactato apresentou atividade reguladora destes macrófagos *in vitro*, mas não foi capaz de induzir o perfil de ativação duplo observado em eritrofagócitos *in vivo*, o que sugere a influência adicional de outros metabólitos e macromoléculas do microambiente.

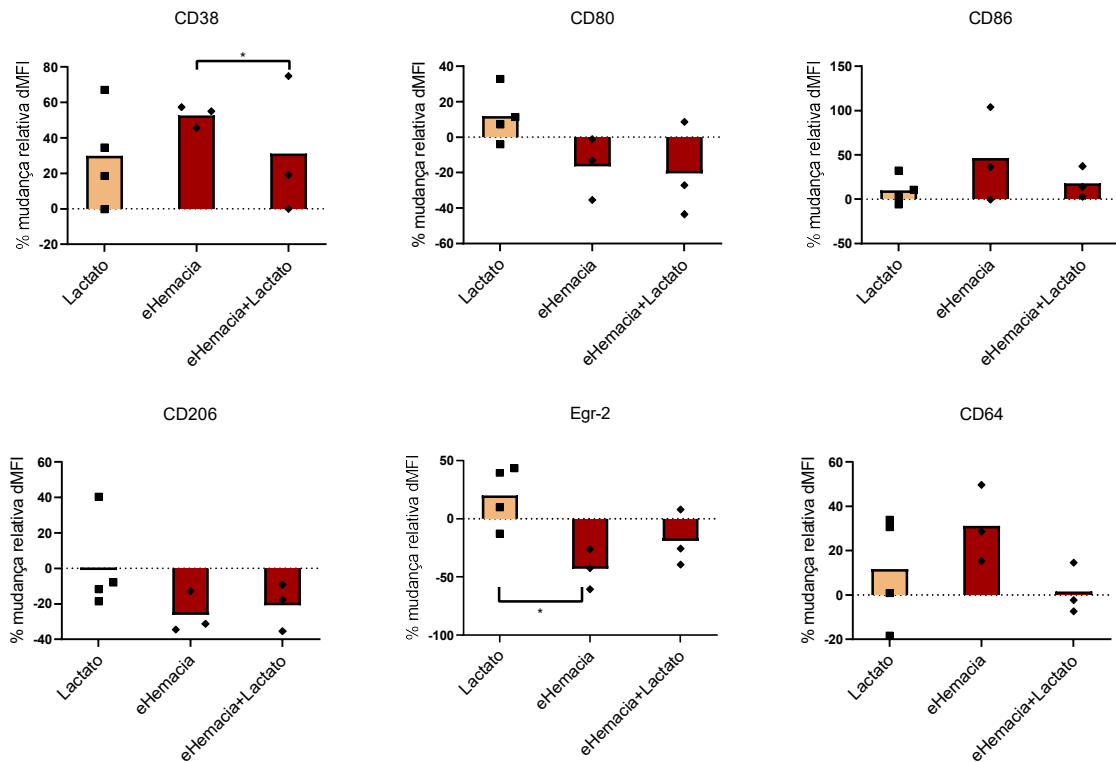


Figura 5 - Fenotipagem de BMDMs estimulados com hemácias envelhecidas: BMDMs foram cultivados por 24 horas em 1 mL de RPMI completo suplementado com 25% sobrenadante de L929 com os estímulos apontados e expressão dos marcadores foi analisada por citometria de fluxo. Foram analisadas alterações na expressão de CD38, CD80, CD86, CD206, Egr-2 e CD64 em macrófagos derivados de medula óssea após o estímulo com lactato de sódio 25 mM e 10^8 hemácias envelhecidas/ mL comparado com controle não estimulado, representado por linha pontilhada. Resultado de três experimentos com estímulos feitos em duplicata.

Os macrófagos cultivados com hemácias frescas e envelhecidas apresentaram um aumento na secreção de IL-6 e TNF-alfa sem aumento na secreção de IL-10 (Figura 6). A secreção de citocinas não foi alterada pela adição de lactato no meio. O perfil de ativação com as hemácias envelhecidas foi mais semelhante com o observado *in vivo*, que apresenta maior expressão de marcadores pró-inflamatórios.

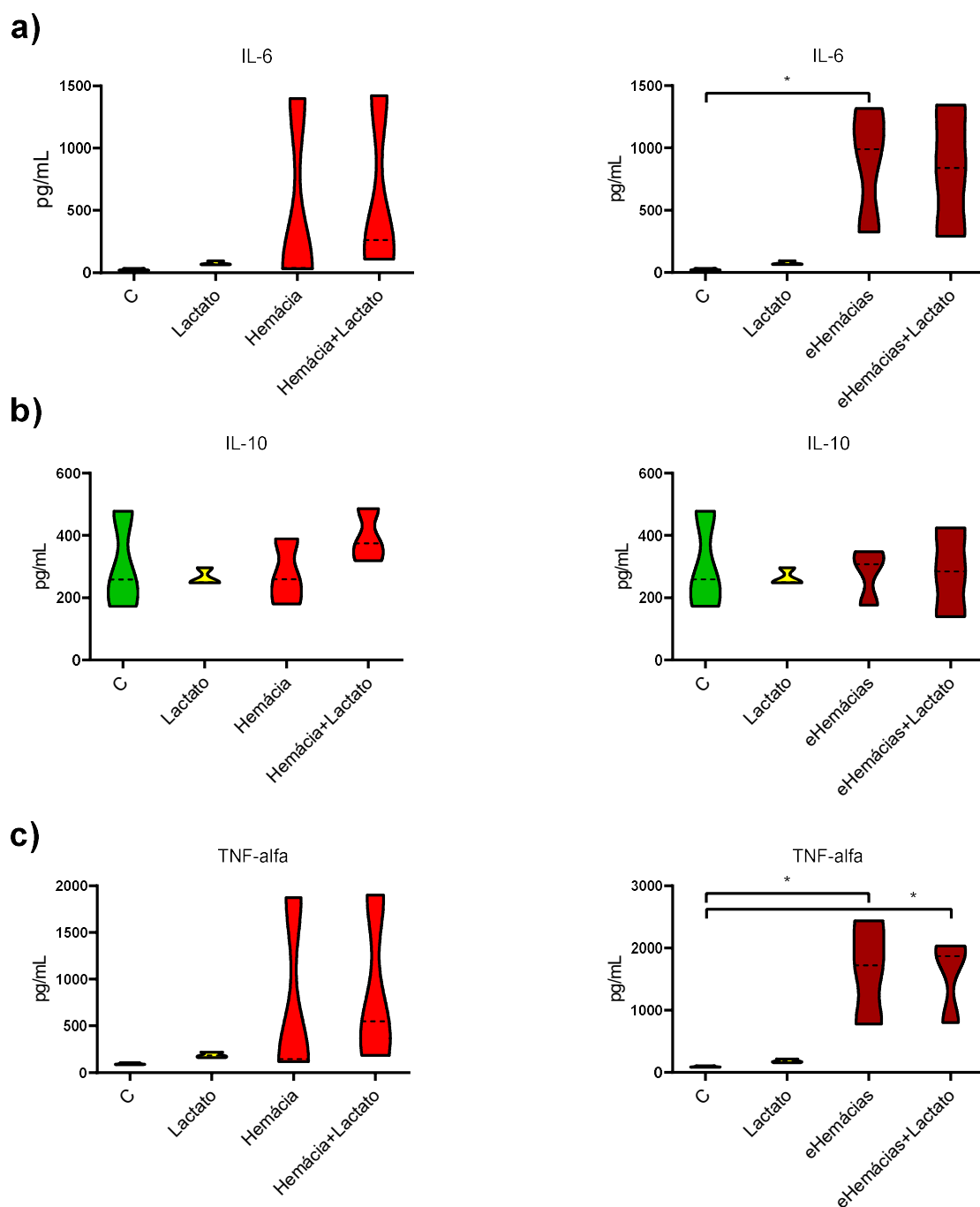


Figura 6 - Hemácias frescas e envelhecidas induzem a secreção de IL-6 e TNF-alfa *in vitro*: BMDMs foram cultivados por 24 horas em 1 mL de RPMI completo suplementado com 25% sobrenadante de L929 com os estímulos apontados e a secreção de citocinas no sobrenadante foi quantificada por ELISA. Concentração de (a) IL-6, (b) IL-10 e (c) TNF-alfa nos sobrenadantes de macrófagos em pg/mL estimulados com lactato de sódio 25mM e 10^8 hemácias frescas ou hemácias envelhecidas (eHemácias). Quantificações obtidas a partir de ELISA dos sobrenadantes. Resultado de três experimentos independentes.

5.4 A injeção de hemácias no tumor causa mudanças no infiltrado de células mieloides e linfoides

Após caracterizar os eritrofagócitos no tumor, tivemos como objetivo simular um evento hemorrágico a fim confirmar nossas observações sobre os macrófagos TER⁺ e acentuar os efeitos da liberação de hemácias no tumor, tornando-os mais facilmente observáveis. Para tanto, foi realizada a injeção de 10⁸ hemácias nos tumores no dia 12 após a injeção tumoral, sendo feita a coleta e análise destes tumores no dia 14.

Primeiramente, observou-se uma diminuição notável na quantidade de macrófagos totais, especialmente os TER⁻, caindo de 50,1% para 21,3% das células mielóides infiltrantes. Inesperadamente, este fenômeno não foi acompanhado de um aumento na quantidade dos eritrofagócitos, tendo na realidade caído de 9,7% para 4,5% do infiltrado mielóide (Figura 7a). Essa diminuição na quantidade de macrófagos foi surpreendente. Seria esperado que tal redução dos macrófagos tumorais fosse acompanhado de sua renovação por monócitos da circulação. De fato, observamos que a injeção de hemácias provocou um aumento significativo de 2 vezes na quantidade de monócitos infiltrantes (CD45⁺CD64⁻Ly6C^{high}) comparado com tumores não tratados (Figura 7b).

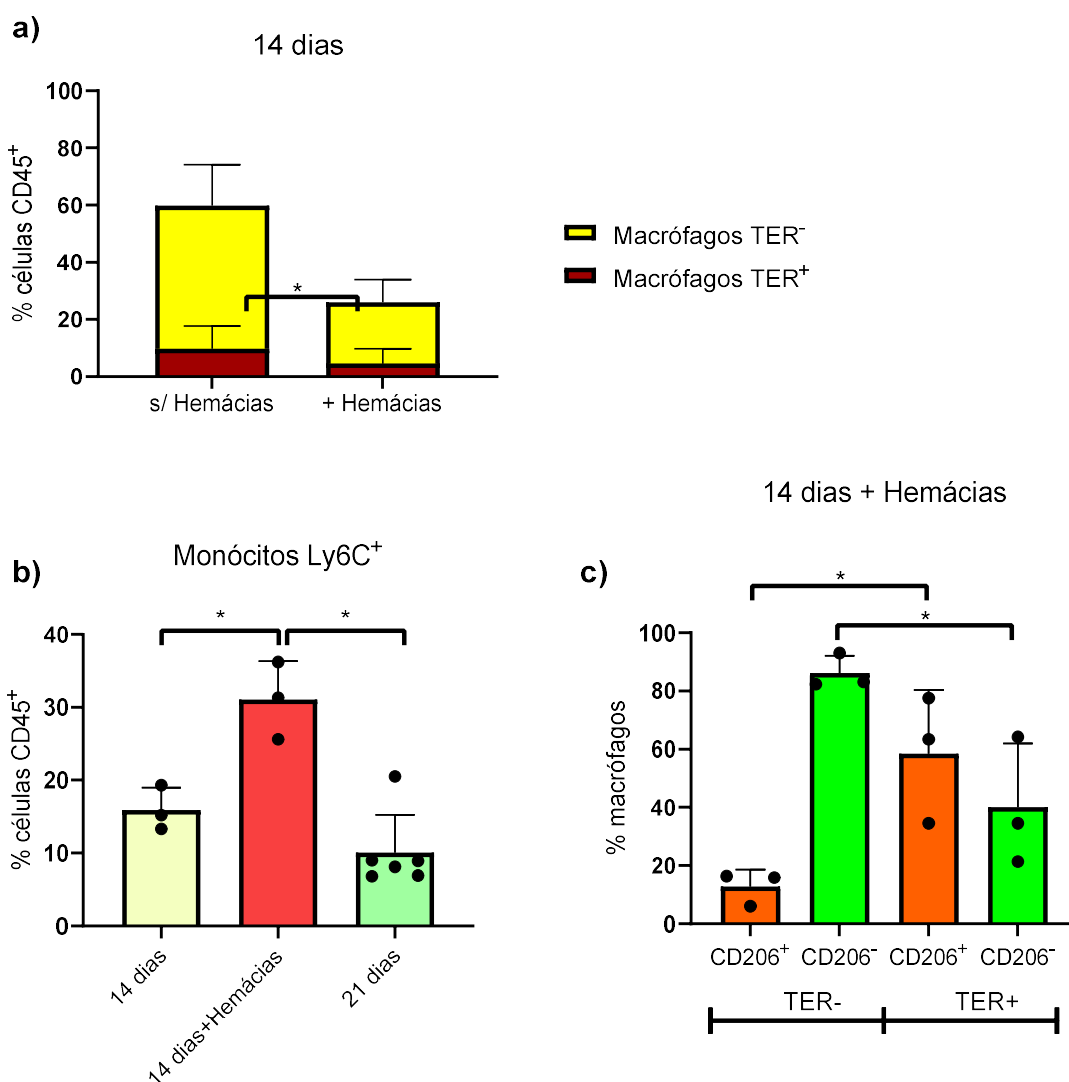


Figura 7 - A população de células mielóides do tumor é alterada pela injeção de hemácias: Análise de populações de células na suspensão de tumores injetados com 10^8 hemácias no dia 12 e coletados no dia 14. (a) Representatividade dos macrófagos TER⁻ ou TER⁺ dentro do grupo de células mielóides do tumor. À esquerda estão os tumores de 14 dias sem tratamento e à direita mostra-se o infiltrado de tumores de 14 dias que receberam a injeção de hemácias. (b) Infiltrado de monócitos em tumores de 14 dias sem e com injeção de hemácias e tumores de 21 dias. (c) Expressão de CD206 por macrófagos TER⁻ ou TER⁺ no dia 14 (2 dias após a injeção de hemácias). Resultado de um experimento com três animais. * significa P-valor < 0.05.

Em seguida, buscamos possíveis alterações fenotípicas nos macrófagos tumorais. Observou-se uma pequena diminuição na proporção de eritrofagócitos CD206⁺, tendo estas células seguido sendo hiperativadas. Também, observou-se uma alteração notável no perfil dos macrófagos TER⁻, que passaram a se concentrar fortemente (>85%) no grupo CD206⁻ (Figura 7c). Tanto os macrófagos TER⁺ quanto TER⁻ que foram negativos para CD206 possuíram um perfil semelhante à monócitos transitórios sendo; Ly6C^{int-high}, CD64^{low} e CX3CR1^{int}, no entanto as células TER⁺ apresentaram comparativamente maior expressão de MHCII e CD38, reforçando que a expressão destes marcadores é estimulada pela eritrofagocitose. Já as células

CD206⁺ se parecem mais com macrófagos diferenciados, sendo Ly6C^{low} MHCII^{high} e CD64^{high} (Figura 8).

O enriquecimento da população CD206⁻Ly6C^{high} acompanhado da diminuição na população de macrófagos CD206⁺ reforça a ideia de que a injeção de hemácias provocou a renovação dos macrófagos tumorais. Neste modelo, as células CD206⁻Ly6C^{high} seriam monócitos recém-chegados no tumor que ainda não terminaram seu processo de diferenciação. Ao realizar a eritrofagocitose estas células se diferenciariam em macrófagos maduros e passariam a expressar o CD206, migrando para fora do tumor e sendo substituídos por novos monócitos.

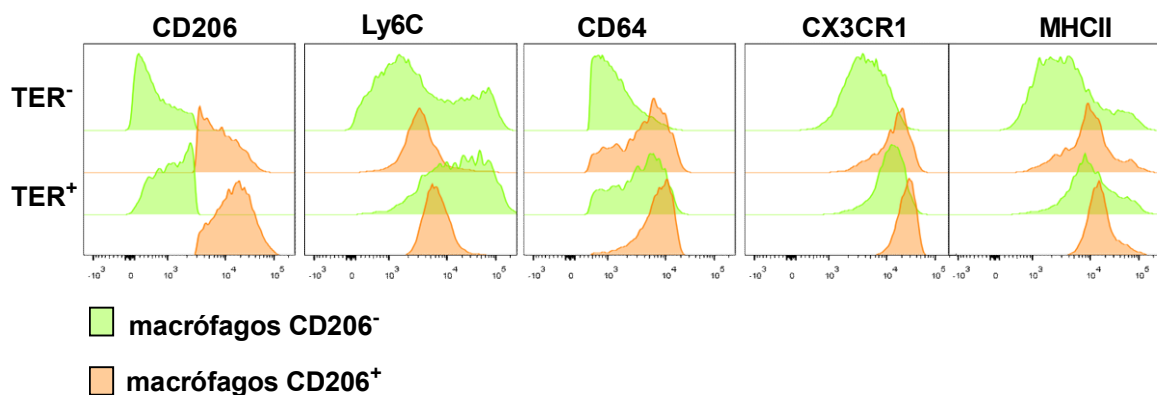


Figura 8 – Ocorre aumento na quantidade de macrófagos indiferenciados nos melanomas após a injeção de hemácias: Gráfico representativo de 3 tumores de 14 dias (2 dias após injeção de hemácias), mostrando a expressão dos marcadores CD206, Ly6C, CD64, CX3CR1 e MHCII em quatro grupos distintos de macrófagos tumorais, de cima para baixo no gráfico; TER⁻CD206⁻, TER⁻CD206⁺, TER⁺CD206⁻ e TER⁺CD206⁺. A cor verde representa macrófagos CD206⁻ e a cor laranja representa células CD206⁺. Resultados obtidos a partir da citometria de fluxo de suspensões de células de tumor.

Os macrófagos são um dos principais componentes da imunidade inata contra tumores, sendo fundamentais na regulação da resposta adaptativa, de forma que é esperado que alterações no perfil dos macrófagos vá resultar em alterações na população de linfócitos do tumor. A fim de explorar esse aspecto da imunidade antitumoral, a população de linfócitos TCD8⁺, TCD4⁺ e Treg foram analisadas em tumores de 14 dias que receberam, ou não, a injeção de hemácias. Nos tumores que receberam a injeção de hemácias, tanto a população de linfócitos TCD8⁺ quanto os TCD4⁺ tiveram um aumento relativo, passando de 1,84% para 4% e 2,12% para 5,3% das células CD45⁺ (Figura 9a e 9b) respectivamente. Houve uma tendência modesta de aumento na população de linfócitos Treg, no entanto esta não foi significativa (Figura 9c).

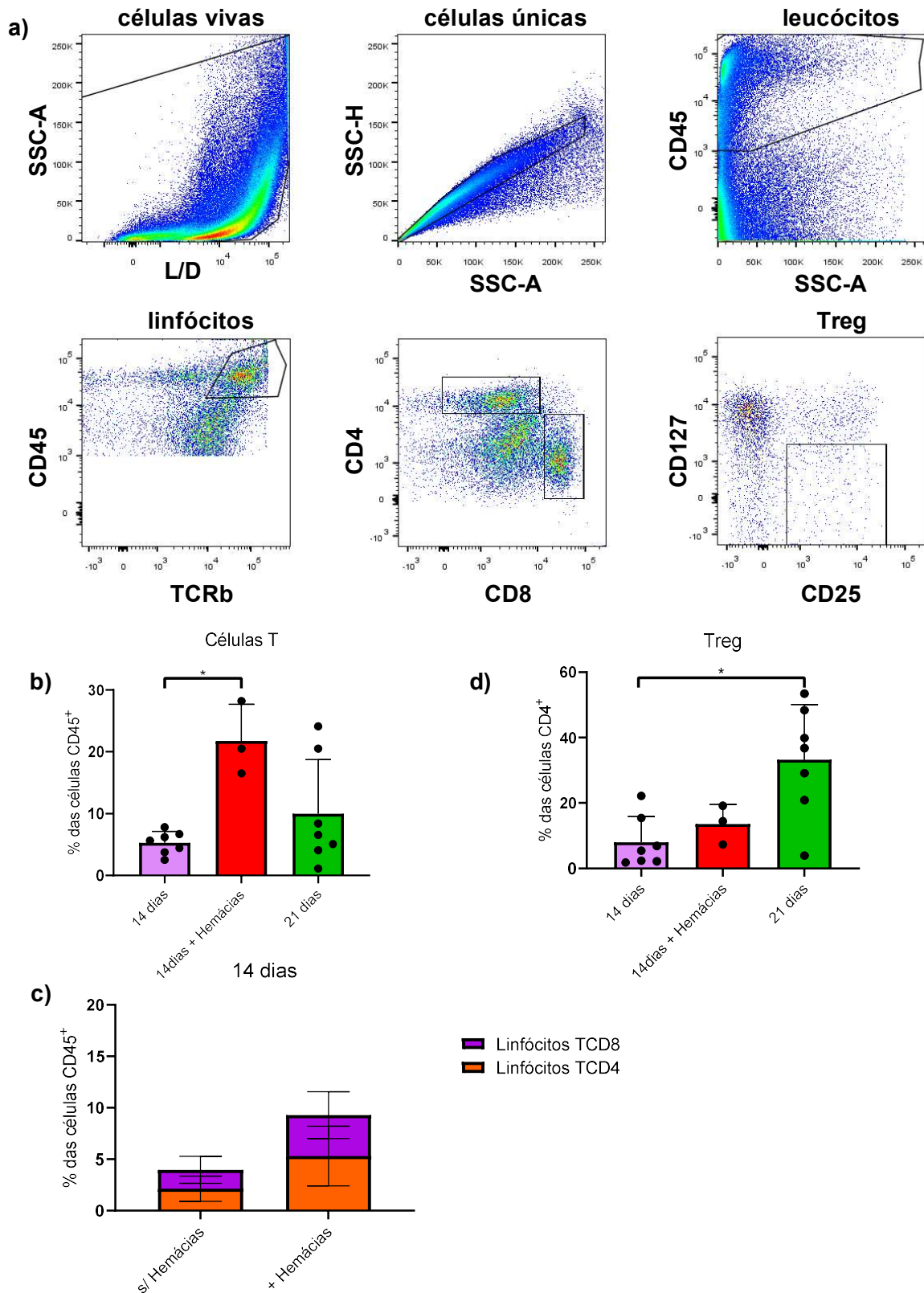


Figura 9 - A injeção de hemácias resulta em maior infiltração de linfócitos no tumor: Análise de populações de células linfoides na suspensão de tumores injetados com 10^8 hemácias no dia 12 e coletados no dia 14. (a) Estratégia de gate utilizada para isolar os linfócitos da suspensão de células do tumor. Primeiramente, separamos as células vivas pela marcação com live/dead e células únicas. Em seguida, separamos os leucócitos pela expressão de CD45 e depois linfócitos pela expressão do TCRb. Os linfócitos foram separados nos grupos

CD8⁺ ou CD4⁺ e dentro dos linfócitos CD4 as células CD25⁺/CD127⁻ foram consideradas linfócitos T regulatórios. (b) Representatividade do infiltrado total de linfócitos no dia 14 com ou sem injeção de hemácias e no dia 21 dentro do grupo de células CD45⁺ no tumor. (c) Quantidade de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no dia 14 com ou sem injeção de hemácias. (d) Porcentagem das células T CD4⁺ que são linfócitos T regulatórios (CD25⁺CD127⁻). Resultados obtidos por citometria de fluxo de suspensões de células de tumores. Para o grupo de 14 dias foram feitos 3 experimentos, totalizando 7 animais, para o grupo de 14 dias + hemácias foi realizado 1 experimento com 3 animais e para o grupo de 21 dias foram feitos 4 experimentos, totalizando 7 animais.

Nesses experimentos observamos que os eritrofagócitos têm um perfil hiperativado, expressando tanto marcadores do tipo M1 quanto M2. Contudo, enquanto a análise da expressão de marcadores fenotípicos por macrófagos é um método útil para a classificação e agrupamento destas células, ele também é limitado quando se pretende definir sua atividade imune. Desta forma, observamos que a injeção de hemácias leva à diminuição na quantidade de macrófagos infiltrantes no tumor, enquanto estimula o recrutamento de monócitos da corrente sanguínea e a migração de linfócitos para o microambiente tumoral, exercendo um efeito pró-inflamatório.

6 Discussão

Observamos que a maior parte dos eritrofagócitos se localizam em regiões de hipóxia do tumor, sendo razoável deduzir que a maior parte das hemorragias no tumor resultam na falta de vascularização daquele sítio, formando-se regiões hipóxicas onde as hemácias são fagocitadas. Esta observação é consistente com descrições de que a hipóxia afeta as células endoteliais, formando vasos deformes e propensos à ruptura (Weis e Cheresh 2011).

Nossos dados *in vivo* sugerem que a fagocitose de hemácias pelos macrófagos apresenta um efeito pró-inflamatório, induzindo a expressão de MHCII, CX3CR1, CD64, CD38 e CD11c. A maioria dos macrófagos TER-119⁺ são hipóxicos e expressam o CD206, assumindo um perfil superativado. A hipóxia celular se associou com a expressão de CD206 pelos macrófagos, porém o papel da eritrofagocitose nesta indução ficou ambíguo. O fato de que quase todas as células TER-119⁺ eram hipóxicas faz com que não seja possível se dissociar a expressão do CD206 nos macrófagos eritrofagocitários da hipóxia celular. No entanto, não se descarta que a eritrofagocitose possa ter algum papel nesse processo. Nossos resultados *in vitro* mostram que o estímulo de macrófagos com hemácias ou lactato não é capaz de induzir a expressão de CD206. Essa observação concorda com um trabalho (Colegio et al., 2014) em que se observa que tanto a hipóxia quanto o ácido láctico *in vitro* não são capazes de induzir o CD206 em macrófagos, enquanto observam que TAMs *in vivo* expressam o CD206 de forma independente de HIF-1. Logo, tanto a eritrofagocitose quanto a hipóxia não são capazes de induzir a expressão do CD206 sozinhos, provavelmente havendo outros sinais importantes no meio tumoral que se associam com as áreas de hipóxia e hemorragia.

O papel pró-inflamatório das hemácias sobre os macrófagos é reforçado pelos resultados *in vitro*. Regiões de hipóxia nos tumores, são ambientes ricos em estressores como ROS, causando danos oxidativos nas células, incluindo as hemácias. Esse fenômeno causa o envelhecimento destas células induzindo, por exemplo a exposição de fosfatidilserina e a hemólise. Por causa disso, escolhemos realizar o envelhecimento de hemácias *in vitro* a fim de simular o que ocorreria com estas células no ambiente tumoral. A co-cultura de macrófagos com hemácias frescas levou à redução na expressão dos marcadores utilizados com ou sem lactato. Essa redução geral na expressão dos receptores nos macrófagos é diferente do que se observou *in vivo*, em que os eritrofagócitos eram superativados expressando CD206, MHCII, CD11c, CD64 e CD38, mostrando que a fagocitose de hemácias na presença de lactato não é responsável pelo fenótipo dos eritrofagócitos tumorais. As hemácias envelhecidas polarizaram os macrófagos para um perfil inflamatório expressando CD86, CD38 e CD64, o que foi atenuado pela adição do lactato. No entanto, a falta da expressão de CD206 sugere que outros fatores são responsáveis pela expressão deste marcador nos eritrofagócitos do tumor, possivelmente a hipóxia.

Também observamos que tanto hemácias frescas como envelhecidas induziram a secreção de altas quantidades de IL-6 e TNF-alfa, mas não de IL-10, reforçando o papel pró-inflamatório destas células.

A expressão de marcadores inflamatórios nos macrófagos TER⁺ *in vivo* e das hemácias envelhecidas *in vitro* pode ser explicada pela atividade dos DAMPs associados à hemoglobina, como o heme (Bozza e Jeney, 2020). Além da fagocitose por macrófagos, as hemácias nesses meios também estão sujeitas à hemólise, evento no qual um grande conteúdo de hemoglobina é liberado do interior da célula. Fora das hemácias a hemoglobina é oxidada, formando metHemoglobina e ferrilHemoglobina, que atuam diretamente como DAMPs e liberaram heme. Assim, o heme no meio tumoral pode atuar como ativador de TLR4 e NLRP3 nos macrófagos, possuindo efeitos pró-inflamatórios, enquanto o heme internalizado é processado pela HO-1, melhorando a sobrevivência dessas células e produzindo moléculas imunossupressoras como o CO. Devido a esse papel dual do heme na atividade dos macrófagos, no futuro seria interessante realizar estudos com animais TLR4^{-/-} a fim de isolar sua influência na polarização dos TAMs.

Ao realizar a injeção de hemácias no tumor, simulando um grande evento hemorrágico, observamos uma diminuição dramática do infiltrado de macrófagos acompanhado de um aumento no número de monócitos. Uma possível explicação para este fenômeno é a migração em massa dos macrófagos para outros órgãos como o fígado e o baço a fim de reciclar as grandes quantidades de ferro (heme) fagocitadas, sendo então substituídos por monócitos da

circulação. No nosso conhecimento, não há outras descrições de um processo que leva à renovação dos macrófagos tumorais dessa forma. Futuramente, seria interessante avaliar a presença de macrófagos TER-119⁺HO-1⁺ no sangue, fígado e baço destes animais. É possível que estes eritrofagócitos tumorais, assim como os de outros órgãos, estejam migrando para o fígado e o baço onde irão reciclar as hemácias fagocitadas (Soares e Hamza, 2016).

Um trabalho recente (Consonni et al., 2021) descreveu uma população de macrófagos HO-1⁺ associados às margens de melanomas humanos que se assemelham com os macrófagos eritrofagocíticos do baço e fígado. Nos pacientes estes macrófagos se acumulam no sangue e no tumor estimulando a angiogênese, suprimindo a imunidade e favorecendo metástases, associando-se com a morte dos pacientes, sendo sugeridos tratamentos para inibir a HO-1 e o recrutamento de macrófagos pelo M-CSF. É possível que estes sejam os mesmos macrófagos observados nesta monografia, em que após fagocitarem hemácias nas bordas dos tumores estas células passariam a expressar a HO-1 e migrar para a corrente sanguínea, recrutando novos macrófagos para o tumor.

A infiltração de monócitos no tumor costuma ser acompanhada de um aumento na inflamação e imunossupressão, promovendo a progressão da doença e ocorrência de metástases e sendo um preditivo de óbito em câncer pancreático, de mama e glioblastomas (Qian et al., 2011; Sanford et al, 2013; Feng et al., 2015) e de forma geral, a infiltração de macrófagos e monócitos no tumor é visto como um mau marcador prognóstico. Um maior entendimento dos mecanismos por trás do êxodo dos eritrofagócitos do tumor somado com estudos que visam impedir o recrutamento de monócitos (Minopoli et al., 2020) pode resultar em novas estratégias terapêuticas que sejam capazes de reduzir a infiltração destas células no tumor e seus efeitos maléficos na progressão da doença.

A polarização dos macrófagos para um fenótipo inflamatório, não necessariamente significa que estas células irão desempenhar funções antitumorais. A dicotomia apresentada por citocinas pró-inflamatórias representa bem isso. A secreção de IL-6 no tumor é associada com a ativação do eixo JAK/STAT3 tanto nas células tumorais quanto nas células do infiltrado imune (Johnson, O'Keefe & Grandis, 2018). Nas células do tumor, o STAT3 auxilia fortemente na progressão tumoral, estimulando a proliferação celular e angiogênese, inibindo a apoptose e promovendo a resistência contra quimioterapia. Sobre as células imunes do tumor o STAT3 regula negativamente a atividade de neutrófilos, células NK e células dendríticas enquanto aumenta a atividade de células Treg e células mieloides supressoras (MDSCs), além de levar à secreção de IL-10 e TGF-beta. Desta forma, a sinalização do IL-6 em vários tipos de tumores, inclusive melanomas (Uemura et al, 2016), possui uma série de efeitos pró-tumorais.

O TNF-alfa, assim como o IL-6, têm sido descritos como citocinas que auxiliam o desenvolvimento do tumor. Experimentos com diversos tipos de tumores (Cruceriu, Baldasici e Balacescu, 2018) mostraram que a secreção de TNF-alfa no tumor estimula a proliferação, inibe a apoptose e induz a inflamação no tumor, auxiliando no seu desenvolvimento ao invés de causar a apoptose das células tumorais como se achava antigamente. Em trabalhos com câncer de mama (Tripsianis et al., 2014) e melanoma (Rossi et al., 2020), ainda foi sugerido que altas concentrações de TNF-alfa e IL-6 são sinais fundamentais para o estabelecimento de maior agressividade em tumores, analisado pelo grau de proliferação, migração celular e invasão de tecidos.

Conclusões

Nossos resultados indicam que a fagocitose de hemácias por macrófagos tumorais se associa com regiões de hipóxia, levando à um estado de superativação dos macrófagos em que expressam tanto marcadores M1 quanto M2 e cuja atividade biológica ainda é desconhecida. Nossos resultados *in vitro* sugerem que outros componentes do microambiente tumoral, que se associam com a hipóxia e hemorragias, são relevantes para esta polarização em melanomas. Por fim, foi visto que a injeção de grandes quantidades de hemácias no meio tumoral induz o recrutamento de monócitos e linfócitos para o tumor, apresentando papel inflamatório.

7 Bibliografia:

- Alaluf E. et al (2020) Heme oxygenase-1 orchestrates the immunosuppressive program of tumor-associated macrophages. *JCI Insight*. 2020;5(11):e133929.
- Akihiro N. et al. (1999) Macrophage Infiltration and Heme Oxygenase-1 Expression Correlate with Angiogenesis in Human Gliomas. *Clin. Cancer Research*; Volume 5, Issue 5, pp. 1107-1113
- Beasley NJ, Leek R, Alam M. et al. (2002) Hypoxia-inducible factors HIF-1 alpha and HIF-2 alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res.* ; 62: 2493–2497.
- Berberat P. O. . et al. (2005) Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. 10.1158/1078-0432.CCR-04-2159.
- Biswas C, et al. (2014) Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. *J Biol Chem.* ;289(39):26882–26894.
- Bögels, M. et al. (2012) Carcinoma origin dictates differential skewing of monocyte function. *Oncoimmunology* 1, 798–809.
- Bonnevier J. et al. (2017) Phenotypic Characterization of Human M1 and M2a Macrophages Cultured with Different Serums and in the Presence or Absence of Polarizing Cytokines. *J Immunol* Vol. 198, Issue 1 Supplement
- Bories, G. F., Yeudall, S., Serbulea, V., Fox, T. E., Isakson, B. E., & Leitinger, N. (2020). Macrophage metabolic adaptation to heme detoxification involves CO-dependent activation of the pentose phosphate pathway. *Blood*. doi:10.1182/blood.2020004964
- Bozza M.T. e Viktoria Jeney (2020) Pro-inflammatory Actions of Heme and Other Hemoglobin-Derived DAMPs. *Front. Immunol.*, | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01323>
- Cássia R. et al. (2018) Hemoglobin metabolism by-products are associated with an inflammatory response in patients with hemorrhagic stroke. *Scielo* doi.org/10.5935/0103-507x.20180003
- Chin BY et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104(12):5109–5114.
- Colegio, O. R. et al. (2014) Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 513, 559–563
- Consonni F. et al (2021) Heme catabolism by tumor-associated macrophages controls metastasis formation *Nature Immunology* volume 22, pages 595–606
- Costa da Silva M. et al. (2017) Iron Induces Anti-tumor Activity in Tumor-Associated Macrophages. *Front. Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01479>
- Cruceru, D., Baldasici, O., Balacescu, O., & Berindan-Neagoe, I. (2020). *The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches.* *Cellular Oncology*. doi:10.1007/s13402-019-00489-1
- Day C. et al. (2006) PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T cell exhaustion and disease progression. *Nature* 21;443(7109):350-4.
- DeNardo D. et al. (2009). CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 16, 91–102.
- Deininger M.H., Meyermann R., Trautmann K., et al. (2000) Heme oxygenase (HO)-1 expressing macrophages/ microglial cells accumulate during oligodendroglioma progression. *Brain Res*
- Dutra F. and Bozza M. (2014) Heme on innate immunity and inflammation. *Front. Pharmacol.* doi.org/10.3389/fphar.2014.00115
- Fang J, Sawa T, Akaike T, Greish K, Maeda H. (2004) Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int J Cancer* ; 109: 1-8.
- Feng X. et al. (2015) Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget*; 6(17): 15077–15094.

- Figueiredo et al. (2007) Characterization of Heme as Activator of Toll-like Receptor 4. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 20221-20229.
- Forsell J. et al. (2007) High Macrophage Infiltration along the Tumor Front Correlates with Improved Survival in Colon Cancer. *Clin. Can. Research*. 10.1158/1078-0432.CCR-06-2073
- Fortes B. et al. (2012) Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. *Blood* 8;119(10):2368-75. doi: 10.1182/blood-2011-08-375303
- Franco M. et al. (2016). Silencing of Foxp3 delays the growth of murine melanomas and modifies the tumor immunosuppressive environment. *OncoTargets and Therapy*, 243. doi:10.2147/ott.s90476
- Frank J., Lornejad-Schafer M.R., Schoffl H. et al. (2007) Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of melanoma cells to ALA-based photodynamic therapy. *Int J Oncol* ; 31: 1539-45.
- Furfaro A. L. et al (2015). The Nrf2/HO-1 Axis in Cancer Cell Growth and Chemoresistance.
- Gonzalez H., Hagerling C. & Werb Z. (2018). Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes & Development*, 32(19-20), 1267–1284. doi:10.1101/gad.314617.118
- Hamzah J., M. Jugold, F. Kiessling, P. Rigby, M. Manzur, H. H. Marti, T. Rabie, S. Kaden, H. J. Gröne, G. J. Hämmerling, et al. (2008). Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature* 453: 410–414.
- Heath W. & Boyle W. (1985). IN VIVO AND IN VITRO ANALYSES OF THE IMMUNOGENICITY OF B16 MELANOMA CELLS. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 63(2), 163–175. doi:10.1038/icb.1985.18
- Henze. A.T. and Mazzone M. (2016) The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. *J Clin Invest*. 126(10):3672–3679
- INCA <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>
- Jayakumar S., Kunwar A., Sandur S. K., Pandey B. N. and Chaubey R. C. (2014) “Differential response of DU145 and PC3 prostate cancer cells to ionizing radiation: role of reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in radiosensitivity,” *Biochimica et Biophysica Acta—General Subjects*, vol. 1840, no. 1, pp. 485–494.
- Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, de Dios Ruiz-Rosado J, Popovich PG, Partida-Sánchez S, et al. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PLoS One* (2015) 10:e0145342. doi:10.1371/journal.pone.0145342
- Johnson D., O’Keefe R. & Grandis J. (2018) Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* volume 15, pages 234–248
- Kachamakova N. et al. (2020) HIF-1 stabilization exerts anticancer effects in breast cancer cells in vitro and in vivo. *Science Direct Vol. 175* 113922
- Kaczanowska S. et al. (2021) Genetically engineered myeloid cells rebalance the core immune suppression program in metastasis. *Cell* Volume 184, Issue 8, 15 April 2021, Pages 2033-2052.e21
- Kim DS, Chae SW, Kim HR, Chae HJ. (2009) CO and bilirubin inhibit doxorubicin-induced cardiac cell death. *Immunopharmacol Immunotoxicol* ; 31: 64-70.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. (2002) Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* ; 53: 1192–1202.
- Kovtunovych G., Eckhaus M, Ghosh M., Wilson H., Rouault T. (2010) Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood* 116 (26): 6054–6062
- Knight K., Wade S., Balducci L. (2004) Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Amer. Journal of Medicine* Volume 116, Issue 7, Supplement 1, Pages 11-26
- Kuang, D.M. et al. (2009) Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J. Exp. Med.* 206, 1327–1337 .

- Kurokawa T., Miyamoto M., Kato K. et al. (2003) Overexpression of hypoxia-inducible-factor 1 alpha (HIF-1 alpha) in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Br J Cancer.* ; 89: 1042–1047.
- Laoui D. et al. (2014) Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Res.* 74, 24–30 . 154.
- Lin Q, et al. (2007) Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem.* ;282(28):20621–20633.
- Li JH., Luo JF., Jiang Y., Ma YJ., Ji YQ., Zhu GL., Zhou C., Chu HW. e Zhang H (2019) Red Blood Cell Lifespan Shortening in Patients with Early-Stage Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res* ;44:1158–1165
- Mantovani, A., Allavena, P., (2015). The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J. Exp. Med.*
- Marchesi M. et al. (2013). HLA-dependent tumour development: a role for tumour associated macrophages? *Journal of Translational Medicine*, 11(1), 247. doi:10.1186/1479-5876-11-247
- Miller R., McGregor D. (1980) Hemorrhage from carcinoma of the lung. *Cancer* Volume 46, Issue 1 Pages 200-205
- Minopoli M. et al. (2020) Inhibiting Monocyte Recruitment to Prevent the Pro-Tumoral Activity of Tumor-Associated Macrophages in Chondrosarcoma. *Cells* 2020, 9(4), 1062
- Mohanty J., Nagababu E. e Rifkind J. (2014) Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front. Physiol.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>
- Movahedi K. et al. (2010) Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res* 2010;70:572839.
- Naito Y., Takagi T., Higashimura Y. (2014). Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. Elsevier. 10.1016/j.abb.2014.09.005.
- Navarro J. et al. (1999) Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Science Direct* Volume 26, Issues 3–4, February 1999, Pages 410-418
- Noy, R., and Pollard J.W. . (2014) Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 41:49–61. doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010
- Papetti M., Herman I.M. (2002) Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C947–C970.
- Partida-Sánchez S, Cockayne DA, Monard S, Jacobson EL, Oppenheimer N, Garvy B, et al. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med.* 2001;7: 1209–1216. doi: 0.1038/nm1101-1209. pmid:11689885
- Petrova V., Annicchiarico-Petruzzelli M., Melino G. & Amelio I. (2018). The hypoxic tumour microenvironment. *Nature Oncogenesis* 7, Article number: 10
- Pfefferlé M. et al. (2020) Hemolysis transforms liver macrophages into antiinflammatory erythrophagocytes. *J Clin Invest.* 130(10):5576–5590.
- Pollard J.W. (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Review Cancer.* 4, Pages 71–78
- Prestes E. et al. (2020) Mitochondrial Reactive Oxygen Species Participate in Signaling Triggered by Heme in Macrophages and upon Hemolysis. *J Immunol*, j1900886; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900886>
- Ptilovanciv E. et al. (2013) Heme oxygenase 1 improves glucoses metabolism and kidney histological alterations in diabetic rats. *Diab. & Metab. Syndr.* 5, Article number: 3
- Pyonteck, S.M. et al. (2013). CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* 19:1264–1272. doi.org/10.1038/nm.3337

- Qian B. et al (2011) CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* volume 475, pages2 22–225
- Rasmus L., Gozzelino R, Jeney V, Tokaji L, Bozza FA, Japiassú AM, et al. (2010) A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med.* ;2(51):51-71.
- Regehly M., Greish K., Rancan F. et al. (2007) Water-soluble polymer conjugates of ZnPP for photodynamic tumor therapy. *Bioconjug Chem* ; 18: 494-9.
- Rossi S. et al. (2018) TNF-alpha and metalloproteases as key players in melanoma cells aggressiveness. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* volume 37, Article number: 326
- Ryschich, E., Schmidt, J., Hammerling, G. J., Klar, E. & Ganss, R. (2002) Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis. *Int. J. Cancer* 97, 719–725
- Sae-lo-oom L. et al. (2016) TGF- β and Hypoxia/Reoxygenation Promote Radioresistance of A549 Lung Cancer Cells through Activation of Nrf2 and EGFR. *Hindawi ID* 6823471
- Sanford, D. E., Belt, B. A., Panni, R. Z., Mayer, A., Deshpande, A. D., Carpenter, D., ... Linehan, D. C. (2013). Inflammatory Monocyte Mobilization Decreases Patient Survival in Pancreatic Cancer: A Role for Targeting the CCL2/CCR2 Axis. *Clinical Cancer Research*, 19(13), 3404–3415. doi:10.1158/1078-0432.ccr-13-0525
- Sica A, Mantovani A. (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*, 122:787–795.
- Soares, M. P., & Hamza, I. (2016). Macrophages and Iron Metabolism. *Immunity*, 44(3), 492–504. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.016
- Sowter HM, Raval R, Moore J, Ratcliffe PJ, Harris AL. (2003) Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1 alpha versus Hif-2 alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res.* ;63:6130–6134.
- Subhra B. , Mantovani A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010, 11:889–896
- Torisu-Itakura H, Furue M, Kuwano M, Ono M. (2000) Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn J Cancer Res* ; 91: 906-10.
- Tripsianis G., Papadopoulou E., Anagnostopoulos K., Botaitis S., Katotomichelakis M., Romanidis K., Kontomanolis E., Tentis I., Kortsaris A. (2014) Coexpression of IL-6 and TNF-alpha: Prognostic significance on breast cancer outcome. *Neoplasma* 61, 205–212
- Tzong-Shyuan L., Lee-Young C. (2002) Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nature* 8(3):240-6. doi: 10.1038/nm0302-240.
- Uemura, M. *et al.* (2016) Selective inhibition of autoimmune exacerbation while preserving the anti-tumor clinical benefit using IL-6 blockade in a patient with advanced melanoma and Crohn's disease: a case report. *J. Hematol. Oncol.* 9, 81 .
- Vinchi, F. et al. (2013). Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. *Circulation* 127, 1317–1329. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.130179
- Weis N, Weigert A, von Knethen A, Brune B. (2009) Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. *Mol Biol Cell* ; 20: 1280-8
- Weis S. e Cheresch D. (2011) Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine* 17, pages 1359–1370
- Was H, Cichon T, Smolareczyk R, et al. (2006) Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *Am J Pathol* ; 169: 2181-98.
- Was H., Dulak J., Jozkowicz A. (2010). Heme Oxygenase-1 in Tumor Biology and Therapy.
- Wen W.N. (2002). Methemoglobin contributes to the growth of human tumor cells. *Life Sci*; 70: 907-16

- Wherry E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12, 492–499.
- Winter S.C. et al (2006) The relation between hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression with anemia and outcome in surgically treated head and neck cancer. *Am. Can. Association* Volume107, Issue 4 757-766
- Workman C.J. et al. (2004) Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. *J Immunol* 172(9):5450–5. doi:10.4049/jimmunol.172.9.5450
- Yoshimi K., Kazuo K. and Yukihiro M. (2019) The Protective Role of Heme Oxygenase-1 in Atherosclerotic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3628. doi:10.3390/ijms20153628
- Yu Q., Stamenkovic I. (2000) Surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Dev.* 14: 163-176
- Yin T. (2015) Extravascular Red Blood Cells and Hemoglobin Promote Tumor Growth and Therapeutic Resistance as Endogenous Danger Signals. *J Immunol* January 1, 2015, 194 (1) 429-437
- Zhen Z. et al. (2020) T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.000171>