



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

NAJLA ADEL SALEH

**EXOSSOMOS DE MACRÓFAGOS CLASSICAMENTE
ATIVADOS COM ALTA EXPRESSÃO DE microRNA-29a-3p:
INVESTIGAÇÃO DE TERAPIA PARA O MELANOMA MALIGNO**

FLORIANÓPOLIS

2022

Najla Adel Saleh

**EXOSSOMOS DE MACRÓFAGOS CLASSICAMENTE ATIVADOS COM
ALTA EXPRESSÃO DE microRNA-29a-3p: INVESTIGAÇÃO DE TERAPIA PARA O
MELANOMA MALIGNO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de doutor em
Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski
Pasa

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Saleh, Najla Adel
EXOSSOMOS DE MACRÓFAGOS CLASSICAMENTE ATIVADOS COM ALTA
EXPRESSÃO DE microRNA-29a-3p: INVESTIGAÇÃO DE TERAPIA PARA
O MELANOMA MALIGNO / Najla Adel Saleh ; orientador, Tânia
Beatriz Creczynski-Pasa, 2022.
137 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, , Programa de Pós-Graduação em , Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. . 2. Melanoma. 3. Imunoterapia. 4. Exossomo. 5.
microRNA. I. Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em . III. Título.

Najla Adel Saleh

Exossomos de Macrófagos Classicamente Ativados com Alta Expressão de microRNA-29a-3p: Investigação de Terapia para o Melanoma Maligno

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Dra. Dirleise Colle
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer
Universidade Federal do Paraná

Profª. Dra. Talita da Silva Jeremias
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Profª. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenadora do Programa

Profª. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Orientadora

Florianópolis, 18 de março de 2022.

Este trabalho é dedicado à minha família, amigos e a todo o time do GEIMM.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Tânia Beatriz Creczynski Pasa por me ceder espaço (em seu laboratório e coração) para pesquisar e atuar na área que gosto, também por toda sua experiência e conhecimento, os quais foram repassados a mim na forma de ensinamentos e incentivos.

A todos os amigos e colegas de trabalho do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas (GEIMM). Tenho muito orgulho de fazer parte desse grupo que realmente sabe fazer um grande e belo trabalho em equipe.

A todos os professores e demais profissionais da área de educação e pesquisa (corpo técnico e afins) que passaram em minha vida e contribuíram para minha formação. Carrego comigo um pouco da sabedoria de cada um de vocês.

A Universidade Federal de Santa Catarina juntamente ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade da vaga e da bolsa concedida.

À minha base de tudo, família. Meus pais, Adel e Zarah que são minha grande inspiração. Sou o que sou por causa de vocês, muito obrigada! Minha irmã Halime, que sempre me apoiou, a melhor amiga da minha vida. Minha vó, tia, tios e primos que também contribuíram com muito amor e ensinamentos.

Ao grande amor da minha vida, meu marido Cleiton Oliveira que sempre teve muita calma, atenção e respeito comigo. Que em todas as horas esteve ao meu lado as palavras certas. Obrigada pelo imenso carinho.

Aos meus amigos de infância que cultivo até hoje, e aos que venho adquirindo ao passar. Obrigada por todo o apoio e por compartilharem comigo momentos prazerosos de muitas alegrias.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher” (Cora Coralina).

RESUMO

O melanoma é a forma mais agressiva e letal de câncer de pele, cujo microambiente é composto pelo estroma tumoral, o qual é responsável por grande parte da agressividade da doença. Diversas terapias têm sido desenvolvidas para que a sobrevida dos pacientes seja aumentada, porém após alguns meses de tratamento, os pacientes deixam de responder à terapia, pois a doença desenvolve resistência. No entanto, após a descoberta de que o melanoma é susceptível ao sistema imunológico, a imunoterapia vem revolucionando o tratamento do melanoma maligno, aumentando a sobrevida dos pacientes em comparação com as terapias alvo já desenvolvidas até hoje. Ao cruzar membranas e entregar material genético às células de forma eficiente e direcionada, exossomos celulares e respectivos conteúdos, especialmente microRNAs, estão sendo estudados e explorados como potenciais terapias contra o câncer. Nesse contexto, este estudo tratou de isolar e caracterizar exossomos secretados de macrófagos M1, bem como de analisar o perfil de expressão de microRNAs, evidenciando aqueles principais relacionados aos efeitos antitumorais, com o auxílio de plataformas de bioinformática. Utilizando um modelo *in vitro* tridimensional de microambiente de melanoma murino, foi observada a diminuição da proliferação e viabilidade celular, bem como a redução do volume tumoral quando em contato com os exossomos de macrófagos M1. Investigando o conteúdo de microRNAs dos exossomos, destacou-se a expressão de exomiR-29a-3p por associação aos alvos e vias relacionados aos efeitos antitumorais. Finalmente, o exomiR-29a-3p foi validado pela técnica de transfecção utilizando um mimético em uma linhagem celular de melanoma humano, na qual confirmou-se funcionalmente os efeitos antiproliferativos. Assim, este trabalho revelou, que exossomos derivados de macrófagos M1 e respectivo conteúdo, especialmente exomiRs, trazem novas perspectivas para a terapêutica do melanoma.

Palavras-chave: melanoma, imunoterapia, exossomo, microRNA.

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive and lethal form of skin cancer, whose microenvironment is composed of the tumor stroma, responsible for much of the disease's aggressiveness. Several therapies have been developed to increase patient survival, but after a few months of treatment, patients no longer respond to therapy, as melanoma develops resistance. However, after the discovery melanoma is susceptible to the immune system, immunotherapy has revolutionized the treatment of malignant melanoma, increasing patient survival over targeted therapies already developed to date. By crossing membranes and delivering genetic material to cells in an efficient and targeted manner, cellular exosomes and their contents, especially microRNAs, are being studied and explored as potential cancer therapies. In this context, this study aimed to isolate and characterize exosomes secreted from M1 macrophages, as well as analyze the expression profile of microRNAs, highlighting the main ones related to antitumor effects, with the aid of bioinformatics platforms. Using a three-dimensional in vitro model of a murine melanoma microenvironment, a decrease in cell proliferation and viability was observed, as well as a reduction in tumor volume when in contact with exosomes of M1 macrophages. Investigating exosome microRNA content, the expression of exomiR-29a-3p was highlighted by association with targets and pathways related to antitumor effects. Finally, exomiR-29a-3p was validated by the transfection technique using a mimetic in a human melanoma cell line, in which the antiproliferative effects were functionally confirmed. Thus, this work revealed that exosomes derived from M1 macrophages and their content, mainly exomiRs, bring new perspectives for the treatment of melanoma.

Keywords: melanoma, immunotherapy, exosome, microRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentração de citocinas nas diferentes condições de polarização de macrófagos.	52
Figura 2. Quantidade relativa da proteína ARG1 nas diferentes condições de polarização de macrófagos.	53
Figura 3. Tamanho e morfologia das vesículas secretadas por macrófagos.	54
Figura 4. Concentração e qualidade do RNA nos exossomos e respectivas células de macrófagos.	55
Figura 5. Variabilidade dos miRNAs expressos nos exossomos e respectivas células de macrófagos.	56
Figura 6. Número total de miRNAs detectados nos exossomos e respectivas células de macrófagos.	57
Figura 7. Perfil de expressão dos exomiRs de macrófagos diferentemente expressos.	58
Figura 8. Perfil de expressão dos exomiRs de macrófagos diferentemente expressos.	60
Figura 9. Genes e vias antitumorais regulados pelo hsa-miR-20a-5p.	62
Figura 10. Genes e vias antitumorais regulados pelo hsa-miR-22-3p.	62
Figura 11. Genes regulados pelo hsa-miR-24-3p.	63
Figura 12. Genes e vias antitumorais regulados pelo hsa-miR-29a-3p.	63
Figura 13. Viabilidade celular dos esferoides após incubação com os exossomos de macrófagos M1.	65
Figura 14. Volume dos esferoides após incubação com os exossomos de macrófagos M1.	67
Figura 15. Proliferação celular nos esferoides após incubação com os exossomos de macrófagos M1.	68
Figura 16. Expressão basal miR-29a-3p em linhagens celulares humanas de melanoma.	69
Figura 17. Citotoxicidade do reagente <i>LipofectamineTM</i> nas células de melanoma.	70
Figura 18. Expressão de hsa-miR-29a-3p após transfecção nas células de melanoma.	71
Figura 19. Efeito da transfecção com o mimético-miR-29a-3p no ciclo celular das células de melanoma.	72
Figura 20. Efeito da transfecção com o mimético-miR-29a-3p na morte celular e no tipo de morte celular das células de melanoma.	74
Figura 21. Proliferação em células de melanoma após transfecção com o mimético-miR-29a-3p.	75
Figura 22. Curvas analíticas: citocinas.	102
Figura 23. Separação das proteínas por eletroforese.	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Melanócito <i>versus</i> melanoma.....	20
Quadro 2. Macrófagos e fibroblastos associados ao melanoma.	21
Quadro 3. Terapias para o melanoma, linha do tempo.	23
Quadro 4. Polarização dos macrófagos.....	25
Quadro 5. Biogênese e liberação dos exossomos.	28
Quadro 6. Interação dos exossomos com a célula-alvo.	29
Quadro 7. Composição básica dos exossomos.....	30
Quadro 8. Biogênese dos miRNAs.	33
Quadro 9. Desenho experimental.....	37
Quadro 10. Lista de reagentes.....	38
Quadro 11. Lista dos genes em comum nas bases de dados utilizadas no estudo regulados pelos miRNAs validados.	105
Quadro 12. Lista das vias relacionadas aos genes regulados pelos miRNAs validados.	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores específicos utilizados na técnica de qPCR.	45
Tabela 2. Sequência dos miméticos utilizados na técnica de transfecção.	48
Tabela 3. Concentração de citocinas nas diferentes condições de polarização de macrófagos.	51
Tabela 4. Concentração de RNA nos exossomos e respectivas células de macrófagos.	55
Tabela 5. Perfil de expressão dos exomiRs de macrófagos diferentemente expressos.	59
Tabela 6. Perfil de expressão dos exomiRs de macrófagos diferentemente expressos.	61
Tabela 7. Viabilidade celular dos esferoides em porcentagem após incubação com os exossomos de macrófagos M1.	65
Tabela 8. Viabilidade celular dos esferoides em número de células após incubação com os exossomos de macrófagos M1.	66
Tabela 9. Expressão de hsa-miR-29a-3p após transfecção nas células de melanoma.	71
Tabela 10. Efeito da transfecção com o mimético-miR-29a-3p no ciclo celular das células de melanoma.	72
Tabela 11. Efeito da transfecção com o mimético-miR-29a-3p na morte celular e no tipo de morte celular das células de melanoma.	73
Tabela 12. Pureza e integridade do RNA dos exossomos e das células de macrófagos.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
ARG1	Arginase-1
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
cDNA	DNA complementar
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
DEX	Dexametasona
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco modified eagles's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EdU	5-etinil-2'-desoxiuridina
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACs	Fibroblastos associados ao câncer
FC	<i>Fold change</i>
HEPES	2-[4-(2- hidroxietil)piperazina-1-il]ácido etanosulfônico
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP	Iodeto de propídio
LPS	Lipopolissacarídeo
MATs	Macrófagos associados ao tumor
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
miRNA/miR	microRNA
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
M0	Macrófago não polarizado
M1	Macrófago classicamente ativado
M2	Macrófago alternativamente ativado
PBS	Tampão fosfato salino
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PD-1	<i>Programmed death 1 protein</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>

RIPA	Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SBF	Soro bovino fetal
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis fator-α</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 MELANOMA.....	19
2.2 MACRÓFAGOS CLASSICAMENTE ATIVADOS (M1).....	24
2.3 EXOSSOMOS.....	26
2.4 microRNAs (miRNAs)	32
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 METODOLOGIA.....	37
4.1 DESENHO GRÁFICO	37
4.2 REAGENTES.....	37
4.3 CULTURA CELULAR.....	38
4.4 POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	39
4.4.1 Análise da Concentração de Citocinas	40
4.4.2 Análise de Proteína Marcadora Específica	40
4.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	41
4.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES ...	41
4.6.1 Isolamento	41
4.6.2 Caracterização	42
4.6.2.1 Tamanho	42
4.6.2.2 Morfologia	42
4.7 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA.....	43
4.8 PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNAs	43
4.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR)	44
4.10 ANÁLISE DE ALVOS PREDITOS	45

4.11 VIABILIDADE CELULAR.....	45
4.11.1 Contagem do número de células	46
4.11.2 Volume.....	46
4.11.3 Proliferação Celular	46
4.12 TRANSFECCÃO DO MIMÉTICO DO hsa-miR-29a-3p	47
4.12.1 Viabilidade Celular.....	48
4.12.2 Ciclo Celular	48
4.12.3 Morte Celular.....	49
4.12.4 Proliferação Celular	49
4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
5 RESULTADOS	51
5.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS POLARIZADOS	51
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES	53
5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs.....	55
5.4 PREDIÇÃO DE VIAS E ALVOS.....	61
5.5 ENSAIOS FUNCIONAIS	64
5.1.1 Exossomos	64
5.5.2 hsa-miR-29a-3p.....	68
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÃO.....	87
8 PERSPECTIVAS.....	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE A – POLARIZAÇÃO MACRÓFAGOS.....	102
APÊNDICE B – EXTRAÇÃO RNA.....	104
APÊNDICE C – PREDIÇÃO DE ALVOS E VIAS	105
ANEXO A – ARTIGO	137

1 INTRODUÇÃO

No tumor, as comunicações entre as células e o microambiente podem regular a expressão de genes e como consequência a transformação celular em fenótipos malignos e metastáticos, incentivando vários processos fisiológicos, como a diferenciação, proliferação, migração e invasão celular. Essas micro condições ambientais são essenciais na regulação da iniciação e progressão tumoral, pois podem definir a malignidade de um tumor (TALUKDAR et al., 2011).

Os tumores sólidos são considerados estruturas heterogêneas e complexas, altamente organizadas, além de serem frequentemente citados como agressivos pela capacidade de gerar metástases, resistência e/ou recidiva ao tratamento antitumoral, capacidade esta que provém do microambiente tumoral (TREDAN et al., 2007). Além das células tumorais, o microambiente tumoral engloba a matriz extracelular e diversas células que compõe o estroma tumoral, como os fibroblastos e os macrófagos associados ao tumor. Essas células além de estimular a progressão do tumor também são capazes de desencadear respostas imunossupressoras para a proteção tumoral (PINTO et al., 2020).

Entre os tumores sólidos, destaca-se o melanoma metastático, que é um tipo de câncer de pele com mau prognóstico, pois é um dos mais agressivos entre as neoplasias metastáticas, sendo conhecido também pelo nome de melanoma maligno (CHIN et al., 2006). A taxa de sobrevivência em 10 anos de pacientes com melanoma maligno é de apenas 10% para estágios avançados da doença (BHATIA et al., 2009).

Tumores sólidos como o melanoma podem utilizar da resposta imune do microambiente em próprio favor, proporcionando um ambiente favorável ao crescimento e proliferação de células tumorais. Baseando-se nos elementos que formam e auxiliam o sistema imunológico e como atuam na biologia tumoral, estudos envolvendo o sistema imune em eventos precoces e tardios da tumorigênese têm adquirido importância na elucidação de novos alvos terapêuticos para os tumores sólidos (PEPPICELLI et al., 2014; ROTHERMEL et al., 2019).

Já foi descrito que exossomos, microvesículas extracelulares secretadas pelas células com a função de comunicação celular, estão envolvidos na resposta pró-inflamatória, sendo capazes de promover a imunidade. Os exossomos derivados de macrófagos classicamente

ativados (M1) *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado ação como imunomoduladores estimulando macrófagos e neutrófilos a segregar mediadores pró-inflamatórios e antitumorais, como as citocinas pró-inflamatórias. Ainda, o conteúdo dos exossomos M1, majoritariamente formado pelos microRNAs (miRNAs), tem revelado significativa regulação em genes específicos da progressão tumoral (GREENING et al., 2015).

Nesse contexto, a investigação de exossomos M1 como potenciais agentes antitumorais contra o melanoma maligno torna-se interessante, pois propiciará o entendimento da ação de uma substância de caráter pró-inflamatório frente a um forte e resistente microambiente tumoral. Além disso, o perfil de expressão de miRNAs dos exossomos poderá desvendar os respectivos efeitos antitumorais sobre o melanoma.

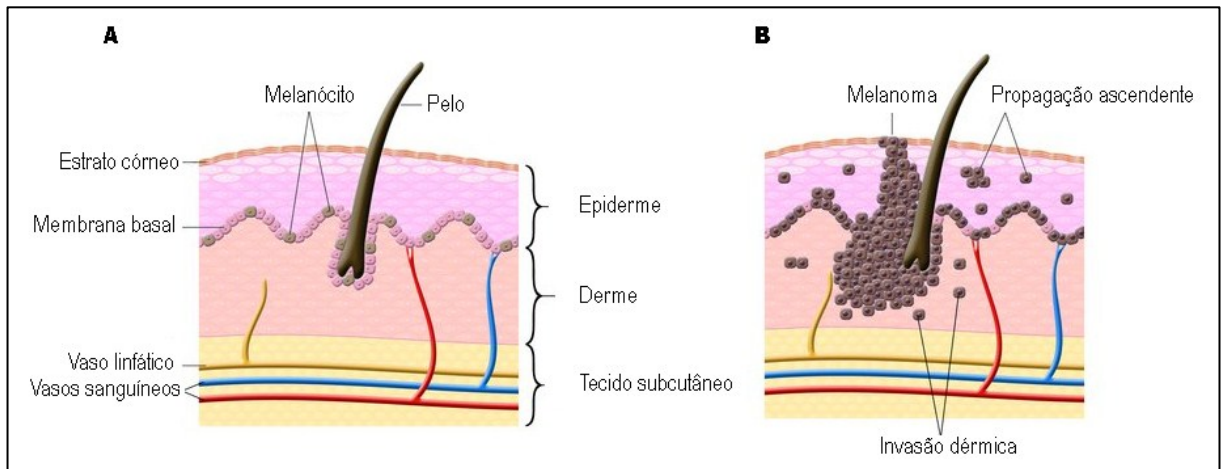
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MELANOMA

O melanoma é um tipo de câncer de pele que acomete os melanócitos, que são as células responsáveis pela produção de melanina, peptídeo que viabiliza a pigmentação da pele, olhos, pelos e cabelos (**Quadro 1**) (GRAY-SCHOPFER et al., 2007; SIMÕES et al., 2015). Embora represente frequência de 1% entre todos os tipos de câncer e 4% entre os tipos de câncer de pele, a incidência do melanoma no mundo continua crescendo (RIGEL; CARUCCI, 2000; GORDON, 2013). Anualmente, no mundo, ocorrem cerca de 300 mil novos casos e 50 mil mortes (WHO, 2022). No Brasil aproximadamente 8 mil novos casos ocorrem por ano, e embora esse valor não seja tão elevado a taxa de mortalidade é expressiva, cerca de 2 mil mortes/ano, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma incluem: sexo masculino, idade avançada, exposição solar, presença de sinais atípicos na pele, histórico familiar e mutações genéticas (BHATIA et al., 2009). Entre as mutações genéticas, são encontradas nos pacientes cerca de 70% no oncogene *BRAF*, 25-50% de alterações no gene supressor de tumor ciclina dependente de inibidor de cinase 2A (*CDKN2A*, do inglês *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*) e 20% no oncogene *NRAS* (CHIN, 2003; GRAY-SCHOPFER et al., 2007; BANDARCHI et al., 2013).

Quadro 1. Melanócito *versus* melanoma.



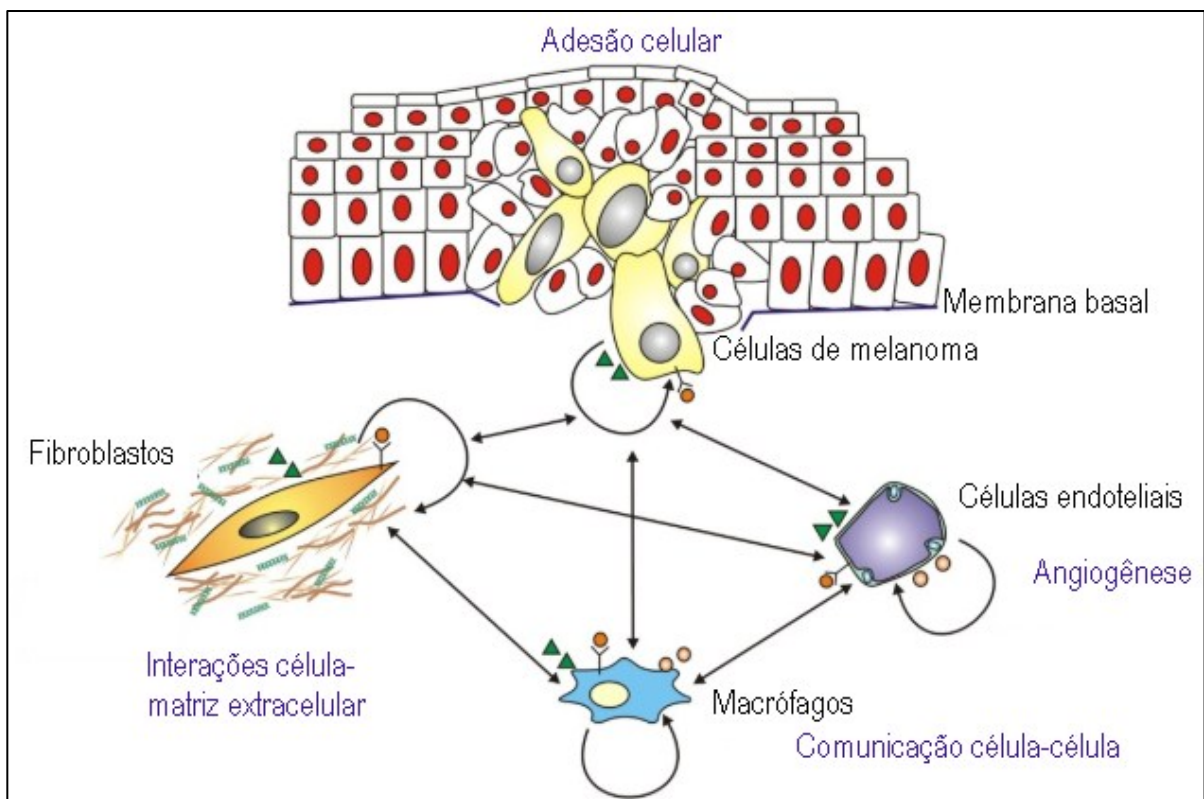
Transformação maligna do melanócito. (A) pele comum e (B) melanoma maligno. Adaptado de CHUDNOVSKY et al. (2005).

Doença conhecida também com o nome de melanoma maligno ou metastático, pela agressividade e capacidade de metastatizar, o melanoma é uma das formas mais letais de câncer, responsável por cerca de 60-80 % das mortes de câncer de pele. Quando em estágio inicial, grande parte dos casos é curável através de intervenções cirúrgicas, porém as taxas de sobrevivência são de apenas 5% a 19% para a doença quando em estágios avançados (GRAY-SCHOPFER et al., 2007; SANDRU et al., 2014). No microambiente do melanoma o estroma é responsável por grande parte da agressividade da doença, pois dá todo o suporte para que os melanócitos malignos proliferem-se rapidamente invadindo a derme (**Quadro 2**) (BOYCE, 2001).

Os macrófagos, um tipo de célula que faz parte do estroma do melanoma (cerca de 40%), geralmente são encontrados com um fenótipo semelhante ao dos macrófagos alternativamente ativados (M2), razão pela qual são chamados de macrófagos associados ao tumor (MATs) (MANTOVANI et al., 2002; HUSSEIN, 2006; LEWIS; POLLARD, 2006). Os MATs relacionam-se com o melanoma principalmente por estimular o crescimento tumoral, aumentar a capacidade invasiva, induzir a angiogênese e o potencial metastático, devido a expressão da proteína Arginase 1 e conseqüentemente a secreção de substâncias que tornam o microambiente do melanoma com um perfil anti-inflamatório e pró-tumoral, como a interleucina-10 (IL-10) e a IL-4 (MANTOVANI et al., 2002; CHEN et al., 2011; HAASE-KOHN et al., 2014; THAM et al., 2014).

Além dos macrófagos, os fibroblastos encontrados no estroma do melanoma, também chamados de fibroblastos associados ao câncer (FACs), desempenham importante função (KALLURI; ZEISBERG, 2006). Por serem grandes produtores de matriz extracelular (BALKWILL et al., 2012), FACs atuam formando uma barreira física composta principalmente de colágeno, a qual impede o efeito e protege o melanoma contra agentes citotóxicos (CORNIL et al., 1991; SMALLEY et al., 2006; TIAGO et al., 2014; JEONG et al., 2016).

Quadro 2. Macrófagos e fibroblastos associados ao melanoma.



O microambiente do melanoma. Interações entre as células de melanoma e o estroma propiciando a progressão tumoral. Adaptado de BRYCHTOVA et al. (2011).

Em 1975, após aprovação inicial pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, a dacarbazina (**Quadro 3A e B**) foi o primeiro fármaco a ser utilizado como terapia padrão para o tratamento do melanoma maligno (BHATIA et al., 2009). Apresentando muitos efeitos adversos, com menos de 5% de respostas completas e duração média de resposta de 5 a 6 meses, terapias melhores eram ainda necessárias (CARREAU; PAVLICK, 2019). Neste

sentido, os avanços da compreensão da biologia do melanoma, do desenvolvimento do tumor e da defesa inata do corpo contra a progressão do tumor, facilitaram o desenvolvimento e a subsequente aprovação de várias novas terapias contra o melanoma com a capacidade de melhorar substancialmente os resultados (MICHIELIN et al., 2020).

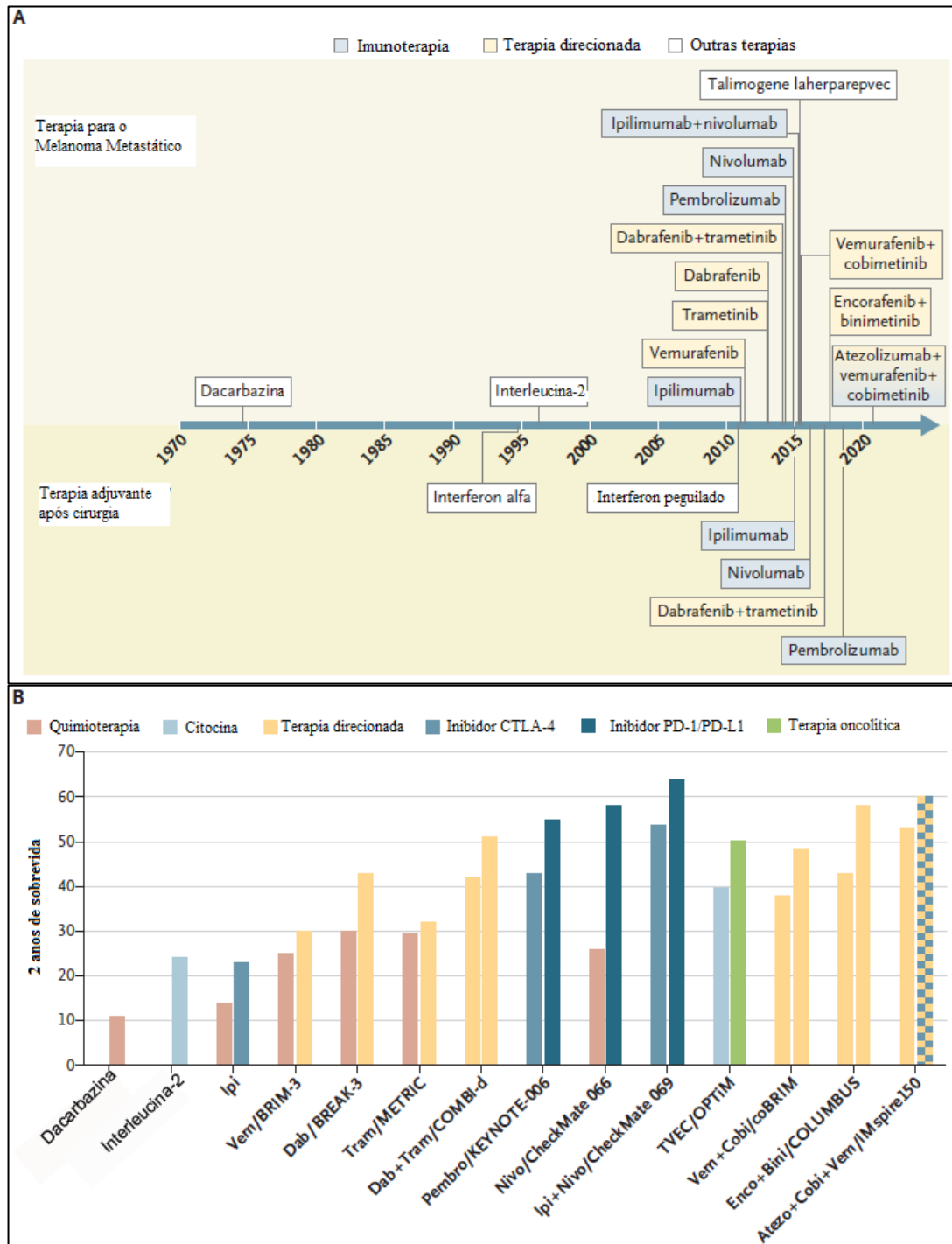
Por esses motivos, desde então vem-se tentando o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do melanoma maligno que driblem o microambiente tumoral, visem a diminuição de efeitos adversos e o aumento da taxa de sobrevida em relação a cada nova terapia que surge. As primeiras tentativas, após 1995 foram a utilização de altas doses de IL-2 (**Quadro 3A e B**) para estimular o sistema imunológico e neutralizar mecanismos de escape, porém os efeitos adversos também tornaram-se superiores à sobrevida dos pacientes e essa terapia logo passou a ser utilizada como adjuvante, assim como o interferon-alfa (INF- α) (RIGEL; CARUCCI, 2000; MAVERAKIS et al., 2015).

Posteriormente, a partir de 2011, foram desenvolvidos os inibidores de alvos moleculares, como os inibidores do gene *BRAF* mutado, incluindo vemurafenib, dabrafenib e trametinib (**Quadro 3A e B**), entretanto embora a resposta inicial tenha apresentado bons resultados, após 5-7 meses de tratamento a terapia não demonstrava mais efeitos devido ao aumento da resistência do melanoma ao efeito dos fármacos. Logo, a partir desse ponto a associação de fármacos demonstrou maior eficiência (SULLIVAN et al., 2013).

Paralelamente, após a descoberta de que o melanoma é susceptível ao sistema imune, a imunoterapia revolucionou o tratamento do melanoma maligno aumentando principalmente a sobrevida dos pacientes em comparação às terapias-alvo já desenvolvidas até hoje. A base da imunoterapia para o melanoma e também para os outros tipos de tumores envolvem os inibidores dos pontos de controle, incluindo o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4, do inglês *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) e a proteína de morte celular programada 1 (PD-1, do inglês *programmed death 1 protein*). O CTLA-4, é regulado positivamente nas células T como resultado da ligação do receptor de células T ao antígeno tumoral durante a interação entre uma célula T e uma célula apresentadora de antígeno, atuando como um regulador negativo da ativação de células T. O bloqueio de CTLA-4 com um anticorpo antagonista, como o ipilimumab (**Quadro 3A e B**), resulta em melhor função das células T e na erradicação das células tumorais. Após conexão do ligante (PD-L1) presente nas células apresentadoras de antígeno, a via PD-1 promove a supressão da ativação dos linfócitos T. O tratamento com anticorpos anti-PD-1 ou anti-PD-L1, nivolumab ou pembrolizumab (**Quadro**

3A e B), bloqueia esse mecanismo de inibição favorecendo a atividade antitumoral dos linfócitos T (MICHIELIN et al., 2020; SETH et al., 2020; CURTI; FARIES, 2021).

Quadro 3. Terapias para o melanoma, linha do tempo.



Adaptado de CURTI; FARIES (2021)

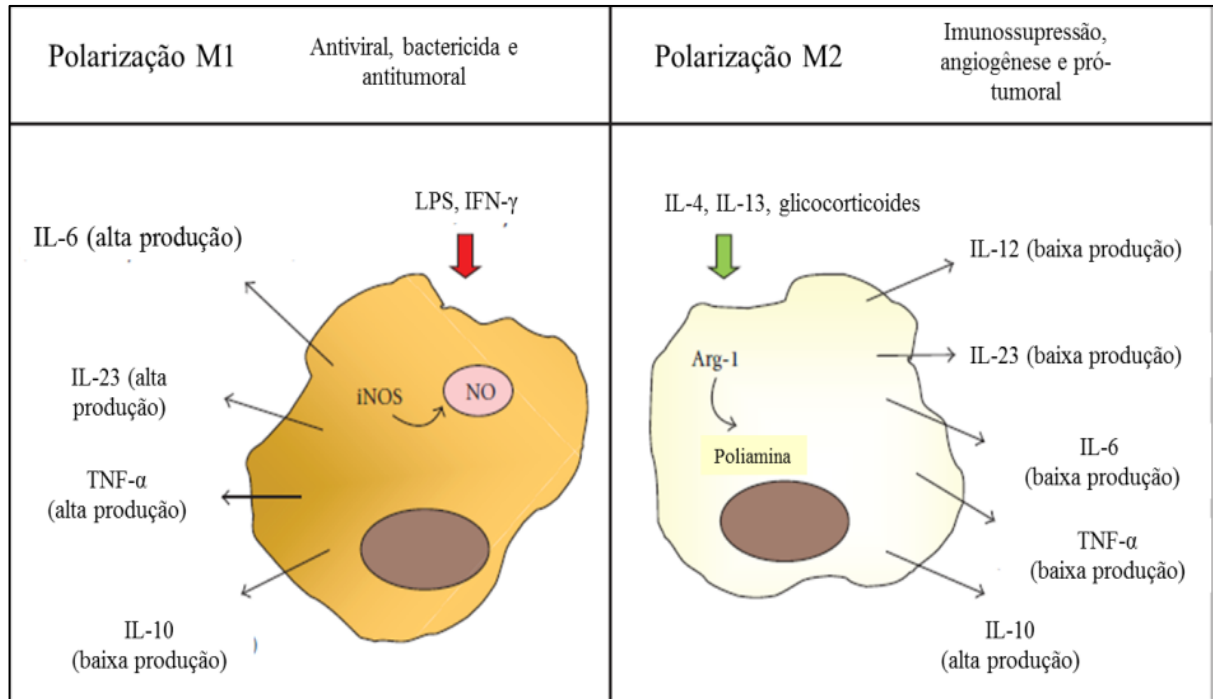
Em resumo, o tratamento e a sobrevida de pacientes com melanoma maligno melhorou dramaticamente nos últimos 10 anos. O tratamento cirúrgico inicial é mais preciso e menos invasivo, com menor morbidade, porém a terapia sistêmica passou por mudanças notáveis. Áreas particulares de interesse de pesquisa incluem melhorar a seleção e sequência de terapias com maior probabilidade de indução de resposta durável, definir o benefício da terapia neoadjuvante e desenvolver tratamentos com maior probabilidade de indução de remissão completa e durável. A integração de intervenções cirúrgicas e terapêuticas provavelmente será a chave para melhorar os resultados de longo prazo para pacientes com melanoma. Neste sentido, destaca-se o uso de combinações de opções terapêuticas existentes e novas para o melanoma maligno que possam trazer tratamentos mais eficazes (DOMINGUES et al., 2018; LEONARDI et al., 2020).

2.2 MACRÓFAGOS CLASSICAMENTE ATIVADOS (M1)

Os macrófagos, assim como outras células imunoefetoras, podem ter múltiplos subtipos e assumir diferentes fenótipos dependendo do microambiente. Por analogia com a classificação Th1/Th2 *in vivo*, dois estados distintos de ativação polarizada para macrófagos foram propostos *in vitro*: o macrófago classicamente ativado (M1) e o macrófago M2, como já citado anteriormente. Os macrófagos M1 surgem após estimulação com interferon- γ (IFN- γ), lipopolissacarídeo (LPS) ou algumas citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor- α*). Em contraste, os macrófagos M2 são polarizados pelas citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-13, IL-10, fator transformador de crescimento- β (TGF- β , do inglês *transforming growth factor- β*) e glicocorticoides. Os macrófagos M1 secretam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23 e aumentam a produção de ânions superóxido, radicais de oxigênio e radicais de nitrogênio (WEAGEL et al., 2015). A maioria desses agentes aumenta a atividade citotóxica das células, as quais podem também expressar altos níveis de antígenos MHC classe I e II e secretar fatores do complemento que facilitam a fagocitose. Os macrófagos M1 também podem secretar altos níveis da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*) (PANNI et al., 2013). Por outro lado, os macrófagos M2 geralmente expressam o receptor *scavenger*, o receptor de manose e de arginina, além de secretarem IL-10, o que os levam a participar principalmente da eliminação de parasitas,

remodelação tecidual, modulação imunológica e progressão tumoral (**Quadro 4**) (HAO et al., 2012; NOY; POLLARD, 2014).

Quadro 4. Polarização dos macrófagos.



Adaptado de TRAVÉS et al. (2012).

Os macrófagos M1 e as respectivas substâncias liberadas vem sendo estudados com o propósito do desenvolvimento de novas terapias antitumorais, devido ao fenótipo pró-inflamatório e antitumoral desse tipo celular (CHIN et al., 2006; MAVERAKIS et al., 2015; ROTHERMEL et al., 2019). Os monócitos, quando diferenciados em macrófagos, consistem no segundo tipo celular sanguíneo com maior produção de exossomos. Já foram encontradas moléculas de microRNAs (miRNAs) nos exossomos de macrófagos com alvo em monócitos, células endoteliais, epiteliais, fibroblastos e também na polarização de macrófagos (ISMAIL et al., 2013). Além disso, macrófagos ativados expressam miRNAs nos respectivos exossomos, característicos do fenótipo celular, sendo esta uma maneira de identificar as diferenças entre M1 e M2 (GARZETTI et al., 2014). Ainda, foi evidenciado que macrófagos reprogramados para M1 liberam exossomos que controlam a invasão e metástase tumorais (SU et al., 2016), e mais recentemente tem sido investigada a utilização de exossomos de

macrófagos M1 em uma terapia adjuvante, na forma de vacina contra células tumorais e também como carreadores para a entrega de fármacos antitumorais (CHENG et al., 2017; WANG et al., 2020; XIA et al., 2020; CENDROWICZ et al., 2021).

A terapia visando melhorar as atividades funcionais de macrófagos em um microambiente tumoral mostra-se igualmente promissora. Assim, a reprogramação de macrófagos para um fenótipo antitumoral tem potencial com uma estratégia terapêutica, uma vez que os macrófagos possuem uma característica plástica na expressão de citocinas e marcadores de superfície. Repolarizar macrófagos para o fenótipo M1 pode ajudar o sistema imunológico a rejeitar células tumorais, e com isso as influências geradas por macrófagos M1 como a ativação/inativação de genes e a produção de citocinas podem modular um microambiente pró-tumoral em uma nova condição (NOY; POLLARD, 2014; WEAGEL et al., 2015).

Os macrófagos desempenham um papel importante na progressão e metástase do tumor devido principalmente à plasticidade que expressam durante a ativação. A polarização dos macrófagos para uma resposta M1 com efeitos colaterais mínimos pode revelar-se uma terapia poderosa contra tumores sólidos. As abordagens atuais para a imunoterapia tumoral usando macrófagos envolvem citocinas, quimiocinas, interferons, biomateriais, moléculas inorgânicas, exossomos e miRNAs que podem desencadear respostas imunes. Essas abordagens demonstraram redução no tamanho do tumor e na angiogênese, recrutamento de células imunes para o local do tumor e prevenção da polarização de macrófagos para um fenótipo M2 (WEAGEL et al., 2015).

2.3 EXOSSOMOS

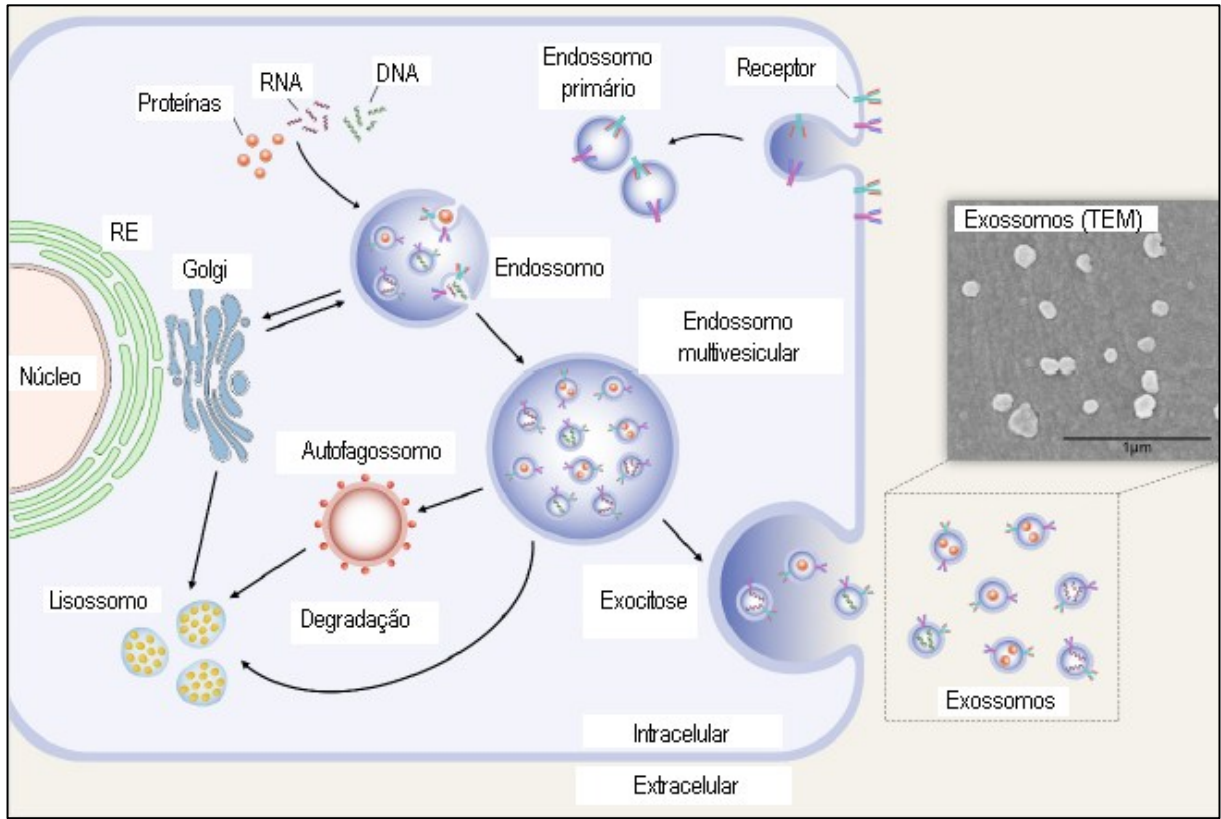
No microambiente tecidual, a comunicação intercelular é essencial para organismos multicelulares e pode ser mediada pelo contato direto célula-célula ou via substâncias secretadas (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). As vesículas extracelulares consistem em substâncias secretadas, sendo componentes importantes nessa comunicação. Foram primeiramente observadas por TRAMS et al. (1981) como partículas eliminadas de linhagens celulares neoplásicas. Os autores observaram que as vesículas extracelulares secretadas poderiam ser absorvidas pelas células receptoras representando um método fisiológico para transferência de informação entre células. Essas vesículas vieram a ser divididas após

descoberta em três principais grupos: corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Entre os grupos destaca-se os exossomos, que foram descobertos pela primeira vez por PAN; JOHNSTONE (1983), cujo relato descreve que a liberação de receptores de transferrina para o espaço extracelular durante a maturação de reticulócitos de ovinos estava associada a um tipo de vesícula pequena. Em 1989, JOHNSTONE et al. definiram essas vesículas funcionais como exossomos.

Os exossomos são originalmente formados por endocitose. Nesse processo, primeiramente a membrana celular é internalizada para produzir o endossomo e subsequentemente, muitas vesículas pequenas são formadas no interior do endossomo resultando o endossomo multivesicular (ZHANG et al., 2015). O endossomo multivesicular funde-se com a membrana celular para liberar os exossomos (**Quadro 5**), que interagem com a célula alvo de três maneiras (**Quadro 6**): *i*) ligam-se por proteínas de membrana, interagindo com receptores da célula alvo e ativam mecanismos intracelulares; *ii*) podem fundir-se diretamente na membrana da célula alvo; *iii*) sofrem endocitose pela célula alvo. Na primeira via (*i*), a célula de origem e as condições de secreção dos exossomos parecem determinar o conteúdo da superfície celular e, conseqüentemente, as moléculas de adesão específicas do tipo de célula, direcionando os exossomos para células específicas (ROMA-RODRIGUES et al., 2014). Ainda, ambas as vias *ii* e *iii* resultam na liberação de proteínas e RNA na célula alvo, influenciando no fenótipo e na função celular (VADER et al., 2014).

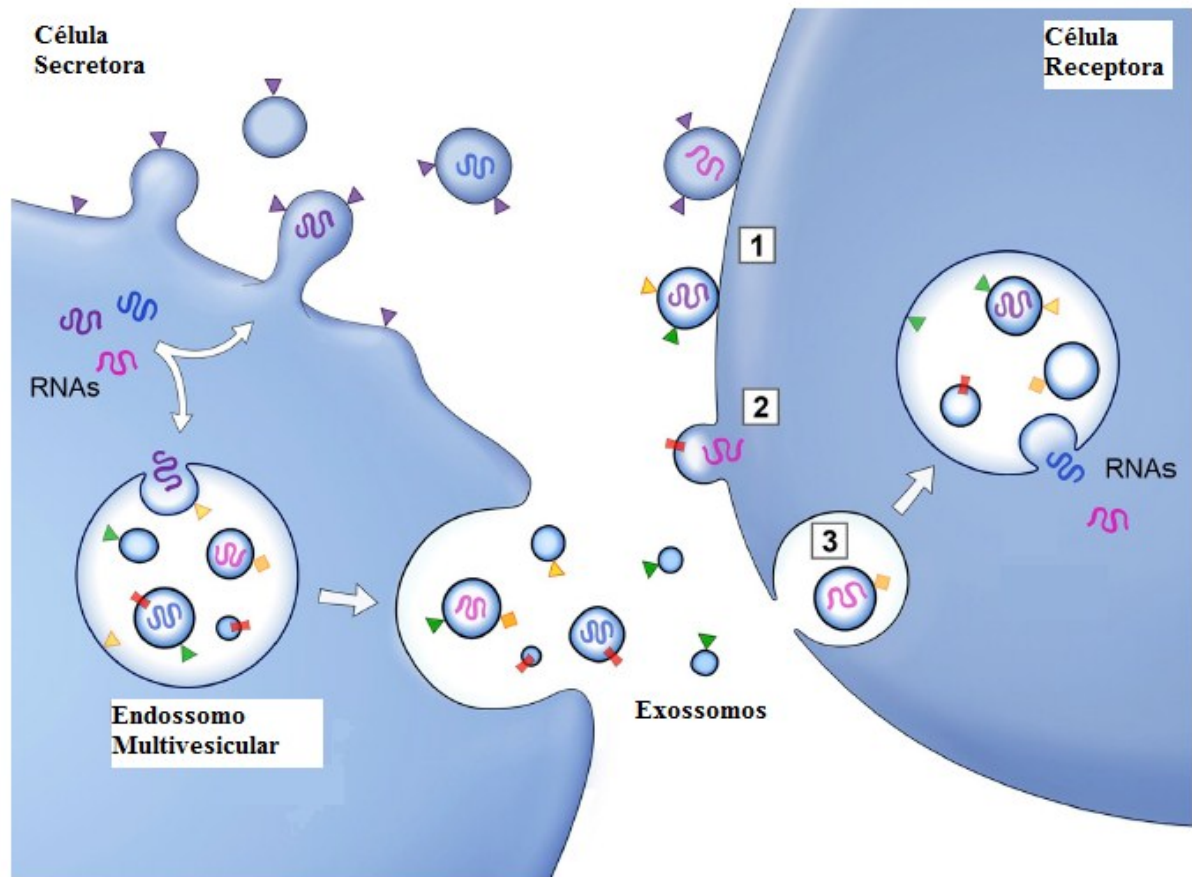
Quadro 5. Biogênese e liberação dos exossomos.



Esquema de uma célula produzindo e secretando os exossomos. RE: retículo endoplasmático. TEM: microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, *transmission electron microscopy*). Adaptado de GURUNATHAN et al. (2019).

Os exossomos já foram isolados de diversos fluidos corporais como sêmen, sangue, urina, saliva, leite materno e bile. São também isolados do sobrenadante de culturas celulares *in vitro* após processo de ultracentrifugação e possuem tamanho entre 40-100 nm de diâmetro (SIMONS; RAPOSO, 2009; RAPOSO; STOOORVOGEL, 2013). Geralmente podem ser identificados pela presença de proteínas comuns à maioria dessas vesículas, independentemente da fonte, como as proteínas CD63, CD9 e CD81 (COLOMBO et al., 2014; EDGAR, 2016). Proteínas e lipídeos são os maiores constituintes da membrana e a composição molecular dos exossomos conta com a presença de proteínas, RNAs mensageiros (mRNAs) e pequenos RNAs, como os microRNAs (miRNAs) (**Quadro 7**) (THÉRY et al., 2002; COLOMBO et al., 2014). Análises de sequenciamento de RNA evidenciaram que os miRNAs são pequenos RNAs, majoritários no conteúdo exossomal, constituindo cerca de 76% (ZHANG et al., 2019).

Quadro 6. Interação dos exossomos com a célula-alvo.

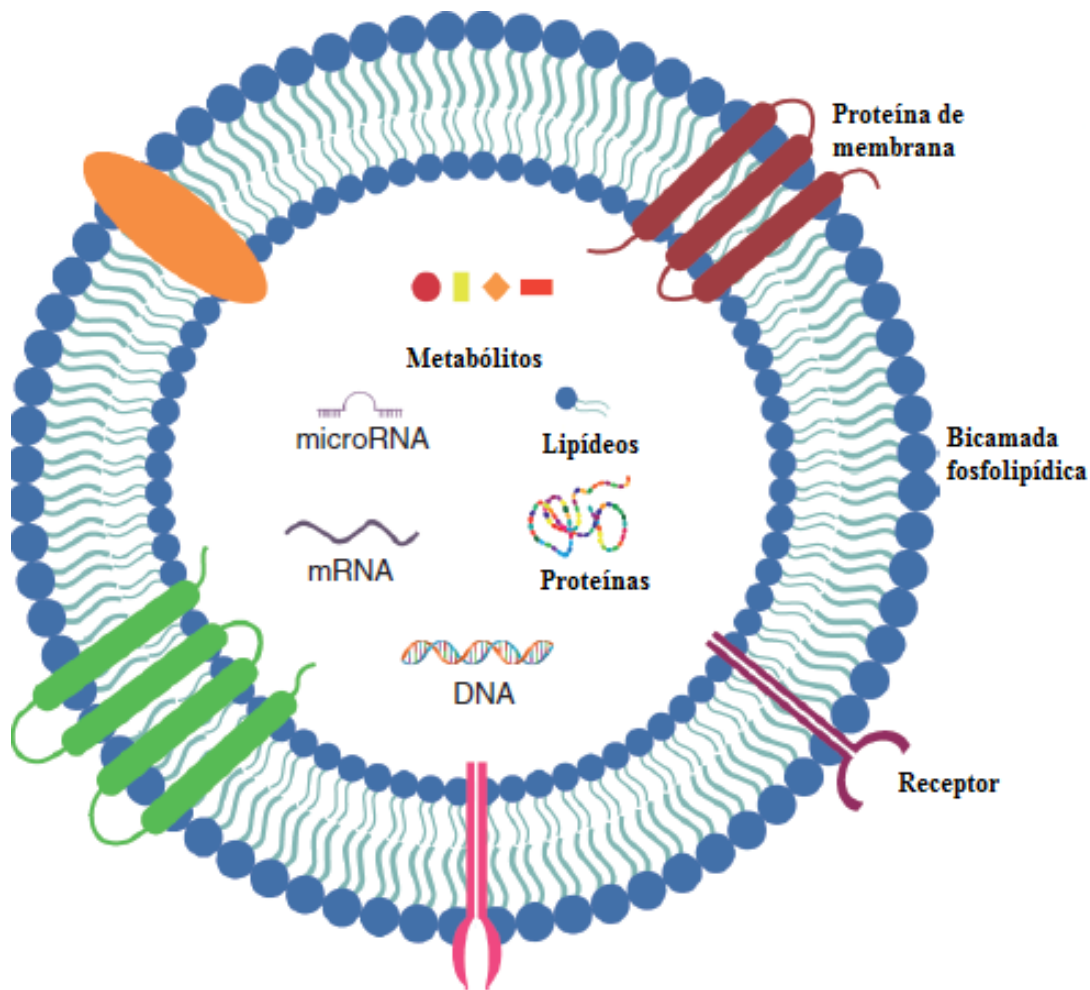


Tipos de interação dos exossomos com a célula-alvo. 1) ligação via proteínas de membrana; 2) fusão direta na membrana; 3) endocitose. Adaptado de RAPOSO; STOORVOGEL (2013).

Recentemente, os exossomos e respectivos conteúdos estão sendo estudados e explorados em busca de biomarcadores para o diagnóstico ou também como potencial terapêutico para doenças, incluindo o câncer (NATASHA G et al., 2014; VADER et al., 2014).

O conteúdo dos exossomos está intimamente relacionado à natureza das células das quais são derivados. Os exossomos derivados de tumores e células estromais carregam as assinaturas do desenvolvimento tumoral, sendo considerados como novas fontes de biomarcadores com valor diagnóstico ou prognóstico. Além disso, podem ser utilizados para prever ou monitorar a resposta de um paciente ao tratamento, pois oferecem acesso não invasivo e quase contínuo às informações circulantes sobre a evolução tumoral (VADER et al., 2014).

Quadro 7. Composição básica dos exossomos.



Adaptado de DILSIZ (2020).

Os exossomos também demonstram-se promissores em aplicações terapêuticas, devido à capacidade de comunicação intercelular e aos tipos de moléculas que podem transportar (GURUNATHAN et al., 2019). Por serem pequenos, podem evitar a fagocitose e atravessar a parede do vaso sanguíneo e a matriz extracelular, geralmente distribuem-se nos organismos de maneira estável e amplamente distribuída, possuindo biocompatibilidade e baixa imunogenicidade. O potencial direcionamento terapêutico dos exossomos pode assumir várias formas, algumas direcionando ou modulando o efeito intrínseco dos exossomos na prevenção da tumorigênese ou metástase, por meio de interações com células tumorais, tecido estromal e células imunes. Outras estratégias visam utilizar exossomos para gerar efeitos terapêuticos por

meio do uso como veículo para a entrega de agentes antitumorais, ou para a iniciação de respostas imunes. (TICKNER et al., 2014).

Os exossomos podem transportar uma ampla variedade de moléculas imunoestimulantes, como por exemplo, aqueles liberados por células dendríticas (dexosomas-Dex) que demonstraram transportar ligantes ativadores de células *natural killer* (NK) (GEHRMANN et al., 2014; NATASHA G et al., 2014), com os quais estudos de fase clínica I e II já foram realizados (MORSE et al., 2005; VIAUD et al., 2011). Além disso, exossomos também vem sendo investigados como veículos transportadores de fármacos, RNAs de interferência, miRNAs entre outras moléculas (TICKNER et al., 2014). Devido à heterogeneidade, os exossomos carregam várias proteínas na superfície, que facilitam a entrada na célula receptora via endocitose mediada por receptores. Essa interação pode otimizar o processo de endocitose dos exossomos e promover a internalização da substância encapsulada, com eficiência de entrega. Esta característica torna os exossomos candidatos ideais para a entrega de substâncias que de outra forma poderiam ser rapidamente degradadas (ZHANG et al., 2020).

Embora o estudo da aplicação de exossomos tenha tido grandes progressos, muitos desafios ainda permanecem. O principal desafio trata da dificuldade de isolamento e de pureza das vesículas, uma vez que a cultura celular necessita estar em condições padrões ideais. Além disso, durante o processamento e modificação de exossomos, as alterações nas células doadoras e nas vesículas também podem afetar o conteúdo exosomal. Como consequência os exossomos manipulados têm a bioatividade e a eficácia alterados. A citotoxicidade, interações e possíveis respostas biológicas indesejadas durante a modificação igualmente devem ser consideradas. Por fim, alcançar a produção em larga escala de exossomos para uso clínico é um grande desafio no uso de exossomos como terapia (LIU; SU, 2019). Portanto, é necessário selecionar o método de transformação com pouca influência na morfologia e composição exosomal.

A pesquisa envolvendo exossomos com potencial terapêutico principalmente na modulação de genes alvo via conteúdo exosomal de miRNAs particularmente trás alguns desafios, pois os mecanismos de funcionalidade dos exossomos e dos miRNAs não são totalmente compreendidos. Entretanto exossomos têm mostrado-se promissores para terapias de doenças como o câncer, uma vez que tanto os exossomos como os respectivos miRNAs

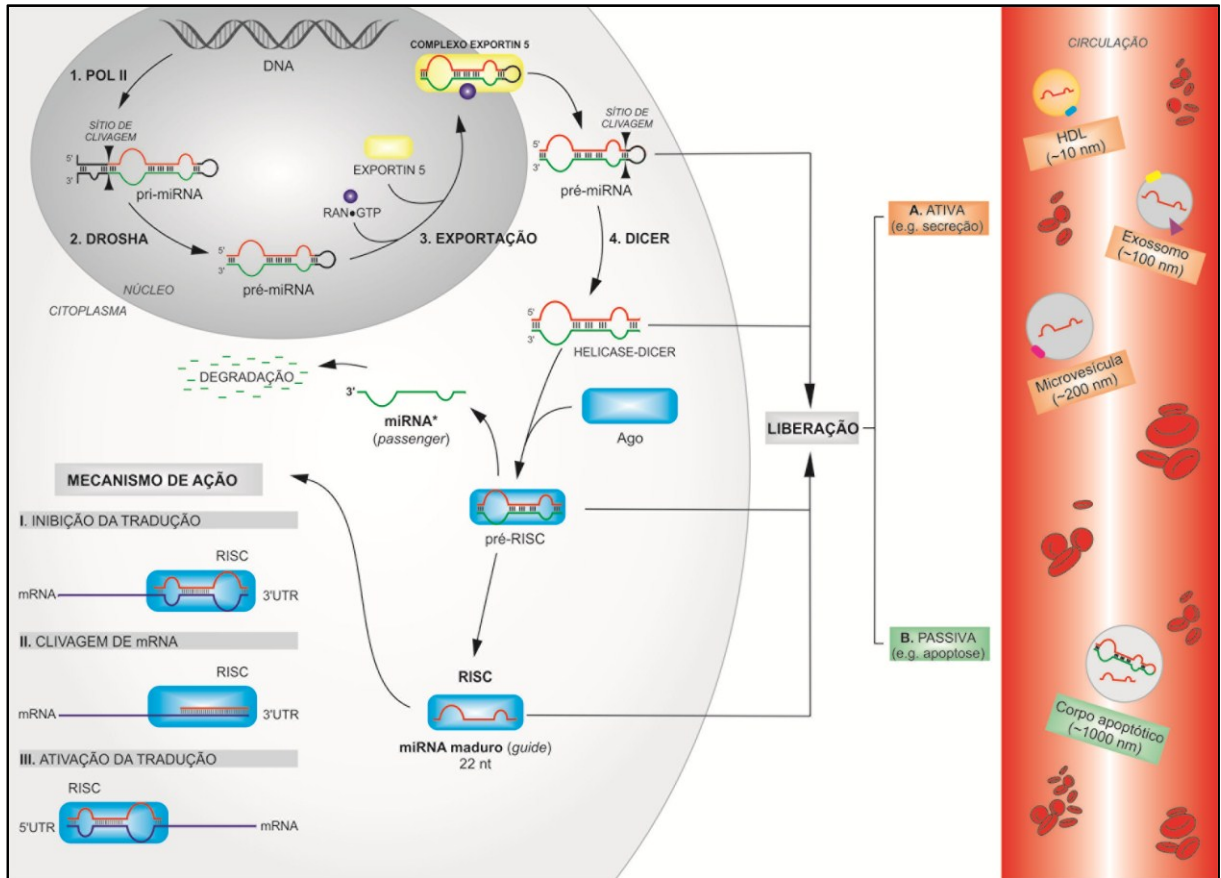
podem interferir de maneira conjunta na progressão tumoral (NATASHA G et al., 2014; GREENING et al., 2015).

2.4 microRNAs (miRNAs)

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA endógeno, com aproximadamente 22 nucleotídeos, não-codificantes que degradam ou reprimem a tradução direta do RNA mensageiro (mRNA) através do pareamento de bases com a região 3' não traduzida (3'-UTR) dos mRNAs, impedindo a expressão de proteínas (MATTICK; MAKUNIN, 2006; GEBERT; MACRAE, 2019).

Os miRNAs são formados a partir de transcritos derivados de íntrons e de éxons tanto de regiões codificadoras quanto de regiões não codificadoras de proteínas e são sintetizadas pela RNA Polimerase II (CAMMAERTS et al., 2015) formando os miRNAs primários (pri-miRNAs), os quais são clivados pela enzima DROSHA, formando os miRNAs precursores (pre-miRNAs). É importante ressaltar que nesse momento pode ocorrer a edição dos pri/pre-miRNAs por desaminação de adenosina (A) em inosina (I) pela adenosina desaminase 1 e 2 (ADAR1 e ADAR2), alterando o pareamento de bases e as propriedades estruturais do transcrito. Assim, a edição dos pri/pre-miRNAs pode afetar o processo de maturação, alterar a especificidade ou redirecioná-los para novos alvos de mRNAs (WINTER et al., 2009). Os pre-miRNAs, uma vez formados, são exportados para o citoplasma pelo fator nuclear exportador Exportin-5. No citoplasma os pre-miRNAs são clivados pela enzima DICER em miRNAs maduros, que são englobados no complexo RISC para então exercer a função de degradar ou reprimir mRNAs (**Quadro 8**) (MEDINA; SLACK, 2008; GEBERT; MACRAE, 2019). Uma vez ativado, o complexo RISC liga-se ao mRNA alvo através do emparelhamento de bases entre a fita guia e a região 3'-UTR do alvo pelo reconhecimento e pareamento de bases. O grau e a natureza dos sítios complementares entre a fita guia e o alvo parecem determinar o mecanismo de silenciamento do gene (MACFARLANE; R. MURPHY, 2010; DEXHEIMER; COCHELLA, 2020). Os miRNAs também podem ser liberados no ambiente extracelular de diferentes formas, podendo estar associados a proteínas, lipídios ou incorporados em pequenas vesículas como os exossomos (COLOMBO et al., 2014).

Quadro 8. Biogênese dos miRNAs.



A biogênese dos miRNAs inicia-se no núcleo da célula e termina no citoplasma. Adaptado de AMARAL, DO et al. (2018).

Até recentemente, mais de 2500 miRNAs foram identificados na espécie humana. Embora muitos ainda não tenham sido confirmados quanto a funcionalidade, os miRNAs estão envolvidos na regulação de aproximadamente 30% dos mRNA celulares, com papéis fundamentais na proliferação, diferenciação e apoptose celular (MACFARLANE; R. MURPHY, 2010; GEBERT; MACRAE, 2019), demonstrando portanto, que esses reguladores afetam direta ou indiretamente a maioria, senão todas as vias celulares. Porém, a predição precisa dos genes alvo é dificultada pela complementaridade imperfeita entre o miRNA e os mRNAs regulados. Ao mesmo tempo, alguns genes podem ter 3'-UTRs alternativos, que podem ser regulados por um conjunto diferente de miRNAs (estima-se que uma única família de miRNAs pode regular até 200 genes diferentes) e por isso, diversas abordagens de

bioinformática para a predição de miRNAs alvos foram desenvolvidas. (MEDINA; SLACK, 2008; HANNA et al., 2019).

Como os miRNAs podem alterar a expressão gênica, muitos podem estar envolvidos em processos para manter o equilíbrio na cinética de crescimento celular. Por isso, a detecção de miRNAs vem despertando interesse no meio científico tanto como biomarcadores de determinadas doenças, como possível nova estratégia terapêutica, pois podem exercer um papel importante na iniciação, desenvolvimento e progressão de neoplasias em diversos tecidos (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017). A literatura descreve o papel dos miRNAs na maioria dos cânceres incluindo o coloretal (OKUGAWA; TOIYAMA; GOEL, 2014), linfomas (JARDIN; FIGEAC, 2013), de pulmão (ZHANG; YANG; WANG, 2014; MACDONAGH et al., 2015; KANG; LEE, 2014) e de mama (TAVAZOIE et al., 2008; PARK et al., 2014; ZHONG et al., 2015). Doenças que são majoritariamente indiretamente alteradas pelas alterações genômicas, epigenômicas ou fisiológicas que surgem durante a carcinogênese, não sendo os agentes causadores. Os miRNAs que realmente estão envolvidos no progresso tumoral são chamados de oncomirs. Além dos oncomirs, os miRNAs supressores tumorais, associam-se à inibição da progressão tumoral. No entanto, como os efeitos dos miRNAs são intrinsecamente pleiotrópicos, essa classificação deve ser considerada flexível (MEDINA; SLACK, 2008; MACFARLANE; R. MURPHY, 2010; HANNA et al., 2019).

Para investigar se os miRNAs desempenham um papel na patogênese de uma doença e identificar quais seriam, a abordagem do perfil de expressão de miRNAs é uma estratégia. Nesse caso, o tecido afetado de um grupo de pacientes é submetido a avaliação do perfil de expressão de miRNAs e comparado com o perfil de expressão do mesmo tecido de indivíduos saudáveis. Os perfis de expressão de miRNAs são comparados entre o fenótipo da doença e os controles para determinar se existem miRNAs expressos diferencialmente e quais seriam. As assinaturas resultantes podem ser usadas como biomarcadores de diagnóstico ou de prognóstico, podendo fornecer pistas sobre o papel dos miRNAs no mecanismo da doença (CAMMAERTS et al., 2015).

Do ponto de vista terapêutico, as abordagens de terapia gênica para substituir miRNAs ausentes mostram eficácia em modelos *in vitro* e *in vivo*. Por outro lado, a descoberta de miRNAs atuando como oncogenes sugere que oligonucleotídeos anti-sense poderiam bloquear especificamente a atividade patogênica do gene. Esses anti-miRs são

oligonucleotídeos complementares aos miRNAs que possuem uma modificação química para melhorar a estabilidade e/ou a entrega (HANNA et al., 2019).

A área de pesquisa em miRNAs tem avançado rapidamente para um nível em que os miRNAs já estão sendo inseridos na clínica como importantes ferramentas diagnósticas e terapêuticas promissoras (SAINI et al., 2021).

Com base no exposto, esse estudo visa a investigação dos exossomos de macrófagos M1, cujos conteúdos em miRNAs apresentam potencial terapêutico para o melanoma maligno, via modulação pró-inflamatória e antitumoral do microambiente do melanoma.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos antiproliferativos causados por exossomos de macrófagos classicamente ativados (M1) com alta expressão de microRNA-29-3p (miR-29a-3p) em modelo *in vitro* tridimensional (3D) de microambiente de melanoma murino (esferoide).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

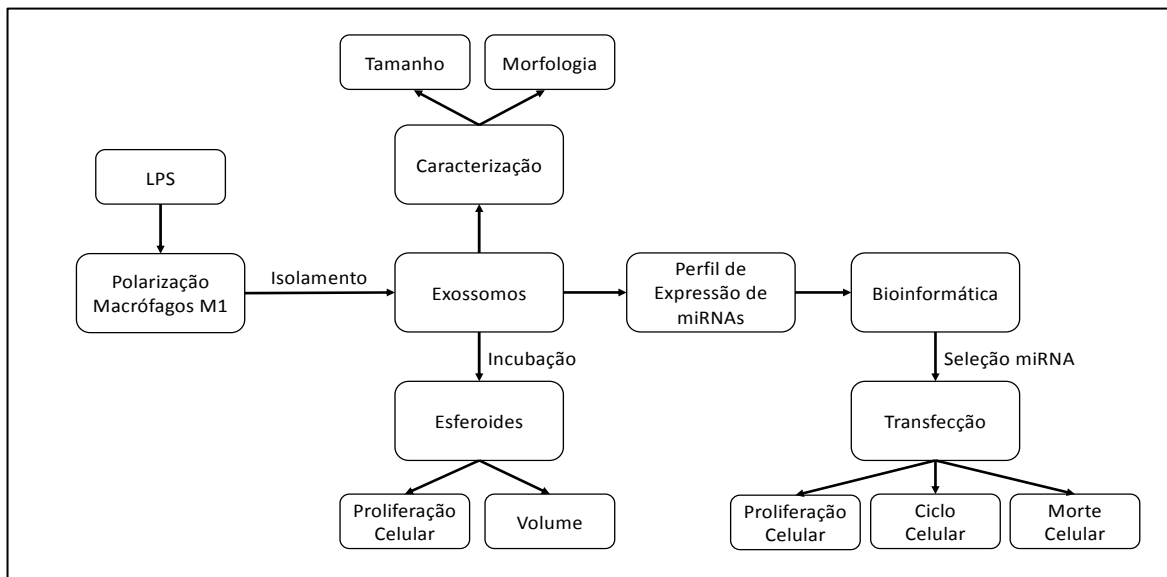
- Isolar exossomos de macrófagos M1 provenientes de cultura celular de macrófagos murino (J774A.1) pela técnica de centrifugações diferenciais;
- Caracterizar os exossomos de macrófagos M1, após isolamento, quanto ao tamanho e morfologia;
- Identificar o perfil de expressão de microRNAs (miRNAs) presente nos exossomos (exomiRNAs) de macrófagos M1 por técnicas de microarranjo e reação em cadeia da polimerase quantitativa;
- Avaliar a viabilidade celular, volume e proliferação celular nos esferoides após exposição aos exossomos de macrófagos M1;
- Correlacionar a expressão dos principais miRNAs alterados nos exossomos de macrófagos M1 com vias do melanoma, utilizando técnicas de bioinformática;
- Validar experimentalmente a expressão do exomiR-29-3p em célula humana de melanoma pela técnica de transfecção;
- Avaliar a viabilidade, ciclo e proliferação celular das células de melanoma humano pós-transfecção.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO GRÁFICO

Abaixo apresenta-se um esquema do desenho experimental deste trabalho, no intuito de esclarecer o leitor e facilitar a compreensão das análises realizadas (**Quadro 9**).

Quadro 9. Desenho experimental.



4.2 REAGENTES

Os principais reagentes utilizados nesse trabalho estão apresentados no **Quadro 10**.

Quadro 10. Lista de reagentes.

Reagente	Marca
Albumina de soro bovino	MERK, Darmstadt, HE, Alemanha
Anticorpos primários	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA
Anticorpo secundário	MERK, Darmstadt, HE, Alemanha
Dexametasona	MERK, Darmstadt, HE, Alemanha
<i>Dulbecco Modified Eagles's Medium</i>	MERK, Darmstadt, HE, Alemanha
<i>Kit Click-it Edu</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA
<i>Kits Cytokne ELISA</i>	BD Biosciences®, San Jose, CA, EUA
<i>Kit miRNA Complete Labeling and Hyb</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA
<i>kit miRNA qPCR Master Mix</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA
<i>Kit miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA
<i>Kit mirVana PARIS</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA
<i>LipofectamineTM RNAiMax</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA
Lipopolissacarídeo	MERK, Darmstadt, HE, Alemanha
Membrana de fluoreto de polivilideno	MERK, Darmstadt, HE, Alemanha
Miméticos	MERK, Darmstadt, HE, Alemanha
<i>SuperSignalTM Western Blot Enhancer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA
2-[4-(2-hidroxietil)piperazina-1-il]ácido etanosulfônico	GIBCO, Grand Island NY, EUA

4.3 CULTURA CELULAR

As linhagens celulares murinas de melanoma B16F10, fibroblasto NIH/3T3, macrófago J774A.1 e humanas de melanócito NGM e melanoma SK-MEL-28 foram obtidas

do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem celular humana de melanoma SK-MEL-147 foi gentilmente cedida pela professora Ana Campa da Universidade de São Paulo (USP). Exceto a linhagem celular NGM, que foi cultivada em meio de cultura celular *Dulbecco Modified Eagles's Medium* (DMEM)/Nutriente HAM F-12 (1:1) suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de tampão de ácido 2-[4-(2- hidroxietil)piperazina-1-il]ácido etanosulfônico (HEPES), 1,4 µM de hidrocortisona, 1 nM de triiodotironina, 10 µg/mL de insulina, 10 µg /mL de transferrina e 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*), todas as outras linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura celular DMEM suplementado com 10% de SBF, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina e 10 mM de tampão HEPES. O SBF foi previamente inativado a 55 °C antes do uso e as células foram mantidas em garrafas de 75 cm² em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, pH 7,4. O meio de cultura celular foi substituído a cada 24 ou 48 h e as células foram subcultivadas quando atingiram aproximadamente 80% de confluência utilizando solução tampão fosfato-salino (PBS) 1× para lavagem celular e tripsina para dissociação celular. Exclusivamente a linhagem de macrófagos J774A.1, que apresenta um mecanismo de adesão diferente, foi dissociada utilizando o *cell scraper* (rodo para células em cultura). Para cada experimento as células foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio do azul de Tripiano, esse corante é internalizado por células não viáveis, com a membrana rompida, corando-as de azul. O número de células utilizadas e o tempo de incubação foram adequados para cada experimento. Os estoques celulares foram mantidos em DMEM contendo 10% de SBF e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) a aproximadamente -180 °C, em reservatório de nitrogênio líquido.

4.4 POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS

Três diferentes condições foram selecionadas para a polarização fenotípica da linhagem celular de macrófagos J774A.1 da seguinte forma: M0, sem agente polarizador - utilizado apenas como controle nos experimentos de polarização de macrófagos; M1, 1000 ng/mL de lipopolissacarídeo, LPS (MOSSER; ZHANG, 2008); e M2, 10 µM dexametasona, DEX, utilizado como controle nos experimentos de caracterização dos exossomos e também para representar uma das células no modelo *in vitro* tridimensional [3D] de microambiente de

melanoma murino denominado de esferoide (MANTOVANI et al., 2004; VOGEL et al., 2014). As células foram incubadas com o agente polarizador *overnight*.

4.4.1 Análise da Concentração de Citocinas

Para analisar a concentração das citocinas interleucina-6 (IL-6) e IL-10, liberadas pelos macrófagos no sobrenadante celular após polarização, foi realizado o ensaio imunoenzimático de captura murino (ELISA, do inglês *enzyme linked immunosorbent assay*), o qual gera um sinal proporcional à quantidade de citocinas no sobrenadante celular que pode ser determinado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm. Para esse ensaio, foram utilizadas placas de poliestireno, as quais foram montadas e padronizadas conforme orientações do fabricante (*Kits Cytokne ELISA*). As concentrações das citocinas foram avaliadas por uma curva analítica específica dos *kits* ELISAs, utilizando concentrações padrões, nas devidas diluições quando necessário. O limite de detecção dos *kits* é de 1 pg/mL.

4.4.2 Análise de Proteína Marcadora Específica

Foi avaliado pelo ensaio de *western blot* a proteína marcadora específica Arginase 1 (ARG1). Todos os tampões e géis foram preparados no momento da execução do ensaio. O tampão de corrida foi adicionado em 50 µg de amostra de proteína total já extraída e quantificada, conforme descrito no item 4.5 desta metodologia, e a solução foi incubada por 5 min a 95 °C. As amostras foram separadas em gel de 12% de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio com tampão de corrida por eletroforese. As proteínas separadas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene fluoride*) utilizando um tampão de transferência. Após transferência, as membranas foram bloqueadas em solução salina tamponada com Tris contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumine*) (TBS). As membranas bloqueadas foram incubadas com os anticorpos primários ARG1 (1:100) e β-actina (1:1000) *overnight*, seguido da incubação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:20000). Os dados de imagem foram adquiridos no equipamento *L-Pix Chemi Express* e processados no *software L-Pix Image* (LOCCUS, Cotia, SP, Brasil) no Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal (LAFRA) da UFSC, Campus Curitibanos. O *SuperSignal™ Western Blot Enhancer* foi utilizado para revelar as proteínas e o *software ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, EUA) foi utilizado para escanear o valor de cinza

das bandas de *western blot* e calcular a quantidade relativa de proteína. Os dados foram normalizados pela quantidade de β -actina encontrada em cada amostra.

4.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Cerca de 1×10^6 células de cada condição a ser analisada foram semeadas em placas de 6 poços. Após 24h o sobrenadante celular foi retirado e as células foram lizadas com tampão de ensaio de radioimunoprecipitação gelado (RIPA - 10 mM de Tris HCl, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100®, 0,1% de SDS, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 5 μ g/mL de aprotinina, 1 μ g/mL leupeptina e 1 μ g/mL de pepstatina), incubadas a 4 °C durante 30 min e a cada 5 min submetidas a agitação em vortex. Após, a solução foi centrifugada a $800 \times g$ durante 20 min a 4 °C, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante contendo as proteínas foi aliquotado e armazenado em ultra freezer.

A determinação das proteínas totais, tanto para a quantificação nos exossomos quanto para as células, foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, L.A.; RANDALL, 1951). O princípio do método baseia-se em uma reação entre o CuSO_4 e grupos amino, em meio alcalino, ocorrendo a formação de íons Cu^+ . Esses íons formados, em seguida, reduzem uma mistura de ácidos fosfotúngico e fosfomolibdico (reagente Folin – Ciocalteu) formando tungstato e molibdato com absorção no comprimento de onda de 750 nm. Para isso, uma curva padrão (0 – 20 μ g/mL) de BSA foi utilizada para calcular a concentração de proteínas totais por regressão linear.

4.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

4.6.1 Isolamento

Para o isolamento dos exossomos, os macrófagos M1 e M2 foram cultivados em garrafas de 175 cm^2 contendo meio de cultura DMEM + 2% de SBF depletado de exossomos (centrifugado a $100000 \times g$, 4 °C, *overnight*) durante 72 h e, a cada 24 h o sobrenadante foi recolhido e armazenado para obtenção dos exossomos pelo método de centrifugações diferenciais (THÉRY et al., 2006), que consiste na centrifugação dos sobrenadantes celulares em 4 diferentes etapas: Etapa 1. Centrifugação dos sobrenadantes a $300 \times g$ por 10 min a 4 °C para remoção das células, o sobrenadante foi recolhido e o *pellet* descartado. Etapa 2.

Centrifugação do sobrenadante resultante da Etapa 1 a $2000\times$ g por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para remoção de restos celulares, o sobrenadante foi recolhido e o *pellet* descartado. Etapa 3. Centrifugação do sobrenadante resultante da Etapa 2 a $10000\times$ g por 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para remoção de corpos apoptóticos, o sobrenadante foi recolhido e o *pellet* descartado. Etapa 4. Os exossomos foram então coletados pela ultracentrifugação do sobrenadante resultante da Etapa 3 a $100000\times$ g por 70 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após essa centrifugação, o sobrenadante foi coletado (para posterior utilização como controle livre de exossomos) e o *pellet* de exossomos foi ressuspensionado em solução tampão PBS $1\times$, aliquotados em microtubos e congelados em ultra freezer. O isolamento dos exossomos foi realizado utilizando a centrífuga *Universal 32 R* e o rotor *1620A* (Hettich Zentrifugen) disponível no Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) da UFSC e a *Ultracentrífuga Optima XE-100* com o rotor *SW41Ti* (Beckman Coulter) disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB I) da UFSC. No último dia de coleta dos sobrenadantes, as respectivas células também foram coletadas e armazenadas em solução tampão PBS $1\times$ em ultra freezer (para posterior comparação quanto ao conteúdo de miRNAs em exossomos).

4.6.2 Caracterização

4.6.2.1 Tamanho

O tamanho e o índice de polidispersão dos exossomos foram analisados no aparelho *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Panalytical Ltda), por espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *dynamic light scattering*). Para isso, uma alíquota da solução de exossomos em solução tampão PBS $1\times$ foi avaliada utilizando uma cubeta de quartzo. Os dados foram analisados no *software Zetasizer 7.12*.

4.6.2.2 Morfologia

Os exossomos foram analisados quanto a morfologia em microscópio eletrônico de transmissão (MET) após serem fixados em 2% de paraformaldeído e 1% de glutaraldeído, e contrastados com acetato de uranila. As amostras foram preparadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC (Bio-LCME-2022) e visualizadas no microscópio JEM-1011 TEM (TEM 100 kV).

4.7 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA

O RNA presente nos exossomos e nas células foi extraído utilizando o *kit mirVana PARIS* seguindo as instruções do fabricante. Assim, a solução de lise foi adicionada à solução tampão PBS 1× de exossomos ou a 1×10^5 células e agitada em vortex. A essa solução foi adicionada a solução desnaturante seguido de incubação em gelo por 5 min. Após, o ácido-fenol:clorofórmio foi adicionado à solução, para separação da fase orgânica e aquosa, seguido de agitação em vortex por 1 min e centrifugação por 5 min a $12000 \times g$. Posteriormente a essa etapa, a fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para um novo microtubo na qual adicionou-se etanol absoluto, para a precipitação dos ácidos nucleicos. Essa solução foi aplicada em uma coluna com filtro de sílica, a qual retém o RNA, e centrifugada a $9000 \times g$ por 1 min. Na sequência, foram realizadas três etapas de lavagem, seguidas da eluição do RNA com água livre de RNase pré-aquecida a $95 \text{ }^\circ\text{C}$. O RNA total obtido foi armazenado em ultra freezer.

A pureza do RNA obtido foi verificada no espectrofotômetro *NanoVue Plus™* (Biochrom). Tanto a qualidade quanto a concentração de RNA presente nas amostras de RNA extraído dos exossomos e respectivas células, foram verificadas por eletroforese microfluídica utilizando o *RNA 6000 pico kit* e o aparelho *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies).

4.8 PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNAS

O perfil de expressão de miRNAs foi analisado pela técnica de microarranjo utilizando o *kit miRNA Complete Labeling and Hyb*. Para isso, 50 ng do RNA total das amostras de exossomos em solução tampão PBS 1× de macrófagos M1 e M2 e suas respectivas células foram concentrados em *SpeedVac*. Ao RNA de cada amostra foi adicionado um *mix* contendo enzima fosfatase, tampão e controles internos, essa mistura foi incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. Após a desfosforilação do RNA, a amostra foi desnaturada em DMSO por 7 min a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ e em seguida mantida em gelo. Foi então adicionado a essa mistura um *mix* contendo o fluoróforo cianina-3, molécula que se liga a posição 3' do RNA, enzima ligase para, ligar-se à cianina-3 e tampão, incubados durante 2 h a $16 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o tempo de incubação, as amostras foram secas em *SpeedVac*, e então solubilizadas em água livre de RNase, na qual adicionou-se o controle interno, o agente de bloqueio e o tampão de hibridização. As amostras foram incubadas a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, e imediatamente transferidas

para banho de água e gelo por 5 min. O RNA marcado com a cianina-3 foi hibridizado na lâmina de microarranjo, contendo sondas para detectar 1136 miRNAs murinos – miRBase versão 17.0, e para detectar 21 controles internos, em forno de hibridização durante 20 h a 55 °C. Após esse período a intensidade de fluorescência foi lida no *scanner SureScan* (Agilent Technologies). Os dados obtidos foram extraídos pelo *software Feature Extraction* 12.0 e os arquivos gerados foram analisados no *software GeneSpring*.

4.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR)

O RNA total isolado foi transcrito utilizando o *kit miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis*, de acordo com o protocolo do fabricante. Primeiramente 10 ng de RNA foram poliadeniladas e para isso, juntamente a cada amostra foi adicionado um *mix* contendo tampão, rATP e enzima poliA polimerase. Após, as amostras foram incubadas a 37 °C durante 30 min e 95 °C por 5 min. Em seguida para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi adicionado às amostras poliadeniladas um *mix* contendo tampão, dNTP, iniciador adaptador, enzima *AffinityScript RT/RNase* e água livre de RNase. Em seguida, a mistura foi incubada a 55 °C por 5 min, 25 °C por 15 min, 42 °C por 30 min e 95 °C por 5 min. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer à -20 °C.

O ensaio de qPCR baseado em *Eva Green* foi realizado utilizando o *kit miRNA qPCR Master Mix* de acordo com o protocolo do fabricante. Assim, juntamente às amostras de cDNA (diluídas 1:8 em água livre de RNase) foi adicionado um *mix* contendo *master mix*, corante de referência, iniciador universal antisense iniciador específico senso e água livre de RNase. As reações foram executadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 1 ciclo de 95 °C por 10 min seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 s, hibridização por 15 s na temperatura de anelamento e extensão a 72 °C por 20 s. Por fim, foi realizada uma curva de dissociação a 95 °C por 1 min; temperatura de anelamento por 30 s e 95 °C por 1 min. Os dados de expressão de miRNAs foram normalizados pela expressão do miR-106b-5p, identificado pelo *software NormFinder* como endógeno, ou U6 para a expressão do mimético. A análise estatística foi realizada nos dados de expressão relativa calculada utilizando o método $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As sequências dos iniciadores estão listadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores específicos utilizados na técnica de qPCR.

miRNA	Sequência dos iniciadores (5'-3')
hsa-miR-20a-5p	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG
hsa-miR-22-3p	AAGCTGCCAGTTGAAGAAGTGT
hsa-miR-24-3p	GCTCAGTTCAGCAGGAACAG
hsa-miR-29a-3p	GTAGCACCATCTGAAATCGGTTA
hsa-miR-106b-5p	GTAAAGTGCTGACAGTGCAGAT
hsa-miR-146a-5p	GTGAGAACTGAATTCCATGGGTT
U6 senso	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6 antisenso	AACGCTTCACGAATTTGCGT

4.10 ANÁLISE DE ALVOS PREDITOS

Os miRNAs selecionados foram investigados quanto a relação com genes e vias por bioinformática. Para analisar os alvos preditos, foram utilizados os bancos de dados *miRDB* (CHEN; WANG, 2020) e *TargetScan* (versão 7.2) (AGARWAL et al., 2015), para analisar os alvos validados o banco de dados de alvos *MirTarBase* (versão 7.0) (HUANG et al., 2020) foi utilizado e para analisar a correlação de dados com o melanoma foi utilizado o banco de dados *LinkedOmics* (VASAIKAR et al., 2018). O banco de dados *Gene Ontology Resource* (MI et al., 2019) foi utilizado para identificar o enriquecimento dos processos biológicos. Apenas miRNAs e genes humanos foram considerados nessa análise.

4.11 VIABILIDADE CELULAR

Uma suspensão de concentrações crescentes (5 - 100 µg/mL) de exossomos em solução tampão PBS 1× (calculados em concentração de proteínas totais) derivados de macrófagos M1 foi incubada no modelo esferoide, previamente desenvolvido por nosso grupo com algumas modificações (SALEH et al., 2021). Resumidamente, as linhagens celulares murinas de melanoma B16F10, macrófagos J774A.1 polarizado M2 e fibroblastos NIH/3T3 foram misturadas na proporção de 2:1:1 respectivamente, e cultivadas em gel de agarose (na concentração 1,5% e volume de 40 µl/poço) em uma placa de 96 poços (3×10² células totais/poço) para formar os esferoides. A formação dos esferoides ocorreu em quatro dias. No último dia os exossomos M1 foram incubados com os esferoides por mais três dias e a

viabilidade foi avaliada pelo ensaio de fosfatase ácida (YANG et al., 1996; FRIEDRICH et al., 2007). Esse método baseia-se na atividade da enzima fosfatase ácida citosólica, a qual hidroliza o p-nitrofenol fosfato em p-nitrofenol. A absorção em 405 nm é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Após o tempo de incubação, os esferoides foram recolhidos e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, os esferoides foram lavados com solução tampão PBS 1× e centrifugados a 800× g por 10 min e transferidos para placa de 96 poços sem o gel de agarose. Uma solução tampão contendo 0,1 M de acetato de sódio; 0,1% de triton-X-100 e 5 mM de p-nitrofenol fosfato em pH 4,8 foi preparada e adicionada em cada poço. A solução foi incubada por 90 min a 37 °C e ao fim da incubação adicionou-se NaOH 1N, q.s.p. 0,1 N em cada poço. A densidade óptica do controle foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis. Como controle, foi utilizado o sobrenadante da última etapa de centrifugação de isolamento dos exossomos (controle livre de exossomos).

4.11.1 Contagem do número de células

O número total de células, de células viáveis e não viáveis foi contabilizado pelo corante azul de Tripano. Após incubação com os exossomos M1, os esferoides foram lavados com solução tampão PBS 1×, tripsinizados e contados em câmara de Neubauer com o corante.

4.11.2 Volume

Após três dias de incubação com os exossomos M1, as imagens dos esferoides foram capturadas pelo microscópio de campo claro Nikon Eclipse TS100 (Melville, NY, EUA). O diâmetro dos esferoides foi calculado utilizando o *software ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, EUA), e então o volume médio de esferoides foi calculado pela equação:

$$V = \frac{4}{3} \pi R^3$$

R = média do raio vertical + horizontal.

4.11.3 Proliferação Celular

A proliferação celular dos esferoides após incubação com os exossomos M1 foi avaliada pelo 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) (SALIC; MITCHISON, 2008), um análogo de nucleosídeo da timidina o qual é incorporado ao DNA durante a síntese ativa de DNA,

utilizando o *kit Click-it EdU*. Após três dias de incubação com os exossomos M1, os esferoides foram recolhidos e o sobrenadante foi descartado. Os esferoides foram lavados com solução tampão PBS 1×, tripsinizados e incubados por 2 h com solução de 10 µM de EdU a 37 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1500× g por 2 min e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente as células foram lavadas com solução tampão PBS 1× contendo BSA 1%, centrifugadas a 1500× g por 2 min e fixadas com solução fixativa contendo paraformaldeído 4% durante 15 min, protegidas da luz em temperatura ambiente. Após fixação as células foram centrifugadas, lavadas e novamente centrifugadas para a etapa de permeabilização. Nessa etapa foi adicionada às células a solução permeabilizante contendo saponina em que permanecerem por 15 min, sob proteção da luz em temperatura ambiente. A solução permeabilizante foi retirada, descartando-se o sobrenadante após centrifugação de 1500× g por 2 min. As células foram lavadas com solução tampão PBS 1× contendo BSA 1% e novamente centrifugadas para a retirada do tampão. Foi adicionado às células um *mix* contendo solução tampão PBS 1×, tampão aditivo, corante fluorescente Alexa Fluor 647 e a solução catalisadora. As células foram incubadas com o *mix* durante 30 min, protegidas da luz em temperatura ambiente. Em seguida o *mix* foi removido, as células foram lavadas e a solução de saponina foi adicionada. A análise foi realizada por citometria de fluxo (BD FACS CANTO II, 10.000 eventos), técnica disponível no LAMEB III da UFSC. Os dados obtidos de proliferação celular foram analisados pelo *software Flowing 2.5*.

4.12 TRANSFECCÃO DO MIMÉTICO DO hsa-miR-29a-3p

As linhagens celulares humanas de melanoma SK-MEL-28 e SK-MEL-147 foram utilizadas na técnica de transfecção do mimético do hsa-miR-29a-3p. Assim, 4×10^4 células por poço foram semeadas em placa de 24 poços e após 70-90% de confluência foi realizada a transfecção. Primeiramente as concentrações de 50 nM e 100 nM do mimético do hsa-miR-29a-3p maduro foram misturadas ao reagente *LipofectamineTM RNAiMax* (1:1). A *LipofectamineTM* é um lipídeo catiônico que permite a interação com os grupos fosfatos do DNA facilitando a transfecção do ácido nucleico para o interior das células. O complexo lipídico contendo o mimético (MM) foi adicionado sobre as células em meio Opti-MEM e após 6 h de incubação foi adicionado um novo meio de cultura. Após 24, 48 e 72 h o RNA total das células foi extraído e o ensaio de qPCR foi realizado, conforme descrito nos itens 4.7

e 4.9 desta metodologia. Nessa etapa foi utilizada a linhagem celular humana de melanócitos NGM como controle para a expressão basal do miR-29a-3p. Como controle da transfecção foram utilizados: *i*) As células incubadas somente com o meio Opti-MEM (CC); *ii*) As células incubadas com a *Lipofectamine*TM (CL); *iii*) As células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético controle negativo (CN). As sequências de bases nitrogenadas dos miméticos estão listadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Sequência dos miméticos utilizados na técnica de transfecção.

Mimético	Sequência dos mimético (5'-3')
hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
CN	GGUUCGUACGUACACUGUUA

CN: controle negativo

4.12.1 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), conforme descrito por MOSMANN (1983), 24, 48 e 72 h após a transfecção para verificar a citotoxicidade da *Lipofectamine*TM *RNAiMAX*. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em formazan púrpura insolúvel após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais quando as células estão viáveis. A linhagem celular SK-MEL-28 (5×10^3 / poço) foi semeada em placa de 96 poços e após confluência de 70-90%, as células foram expostas às concentrações de *Lipofectamine*TM *RNAiMAX* utilizadas na transfecção. Após período de incubação o meio foi substituído por uma solução de MTT (0,25 µg/µL) por 2 h a 37°C. Em seguida, a solução de MTT foi substituída por DMSO para solubilização dos cristais de formazan e leitura da absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A densidade ótica obtida no controle CC foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis e a viabilidade celular nos demais tratamentos foi calculada por regressão linear.

4.12.2 Ciclo Celular

Para a análise do ciclo celular foi utilizado iodeto de propídeo (IP), um intercalante de DNA que pode ser quantificado por citometria de fluxo. Após a transfecção de 24 h, as células da linhagem celular SK-MEL-28 foram tripsinizadas, centrifugadas e lavadas com

solução tampão PBS 1× para remoção total do meio de cultura. Em seguida as células foram fixadas com etanol 70% gelado seguido de incubação a -4 °C por 30 min. Posteriormente, adicionou-se a solução tampão PBS 1× + BSA 2 % seguido de centrifugação para inibir possíveis ligações inespecíficas com o IP. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em solução tampão PBS 1× contendo 0,1% Triton X-100® + 100 µg/mL RNase para permeabilização da membrana celular e degradação do RNA, afim de evitar que o IP se intercale ao ácido nucleico. Em seguida, as células foram marcadas com IP (1 mg/mL) e a análise do conteúdo de DNA foi realizada por citometria de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences, 10.000 eventos). A população de células em cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando o *software Flowing 2.5*.

4.12.3 Morte Celular

O tipo de morte celular, por apoptose ou necrose ou até mesmo o dano na membrana celular podem ser analisados por citometria de fluxo após coloração das células com anexina V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) e IP. Nesse sentido, após transfecção, as células SK-MEL-28 foram tripsinizadas, centrifugadas e lavadas com solução tampão PBS 1× gelado. O PBS foi removido, as células foram ressuspensas em solução tampão de ligação 1×, marcadas por 15 min a 4° C com anexina V-FITC e em seguida com IP. A avaliação do tipo de morte celular foi em citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences, 10.000 eventos). A população de células viáveis (anexina negativa e IP negativo), em apoptose (anexina positiva e IP negativo), em necrose (anexina negativa e IP positivo) e/ou apoptose tardia (anexina positiva e IP negativo) foi analisada utilizando o *software Flowing 2.5*.

4.12.4 Proliferação Celular

Após 24h de realizada a transfecção na linhagem celular SK-MEL-28 utilizando 50 nM de mimético, a proliferação celular foi analisada conforme descrito no item 4.11.3 desta metodologia.

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios foram realizados em duplicatas ou triplicatas biológicas em dias alternados (n=2 ou 3). Os resultados foram analisados no *software GraphPad Prism* versão 6

e expressos como média \pm desvio padrão (DP). $p \leq 0,05$ e *fold change* (FC) >2 foram considerados estatisticamente significantes. Os testes estatísticos específicos foram realizados conforme descrito nas legendas das figuras.

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS POLARIZADOS

Para iniciar a etapa de isolamento e caracterização das vesículas, os macrófagos foram previamente polarizados.

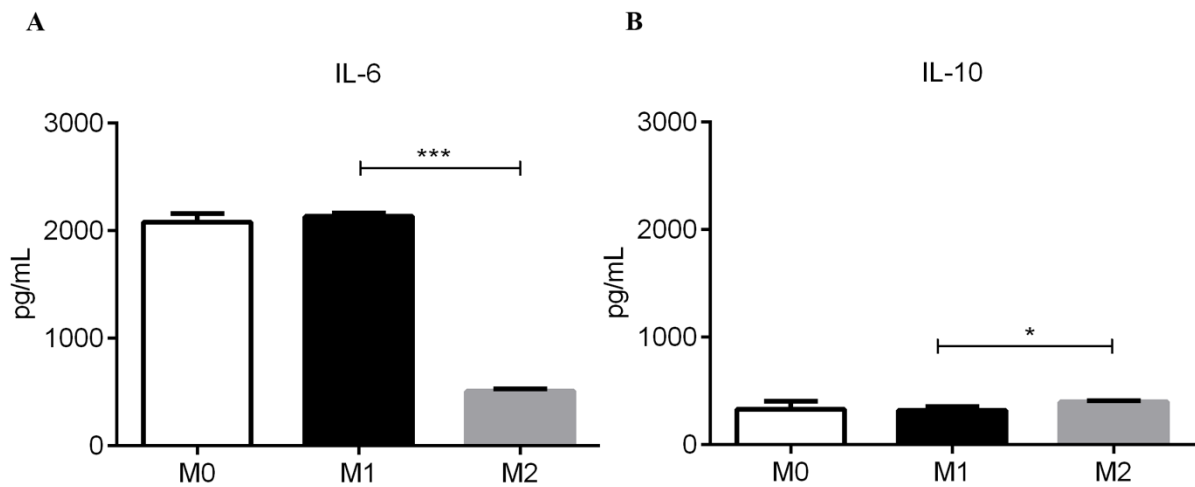
Após incubação *overnight* com os agentes polarizadores, pela análise das citocinas no sobrenadante celular dos macrófagos, foi possível observar o aumento da concentração da IL-6 secretada pelos macrófagos M1, polarizado com LPS, em comparação aos M2 (**Tabela 3** e **Figura 1A**). Em contrapartida, foi também observado o aumento da secreção de IL-10 pelos macrófagos M2, polarizados com DEX, em comparação aos M1 (**Tabela 3** e **Figura 1B**). Os macrófagos M0 apresentam concentrações basais destas citocinas. As curvas analíticas contendo as equações da reta encontram-se no **Apêndice A Figura 22**.

Tabela 3. Concentração de citocinas nas diferentes condições de polarização de macrófagos.

	IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
M0	2081 ± 80	332 ± 73
M1	2134 ± 30	320 ± 34
M2	509 ± 19	400 ± 9

n=3. Média ± desvio padrão.

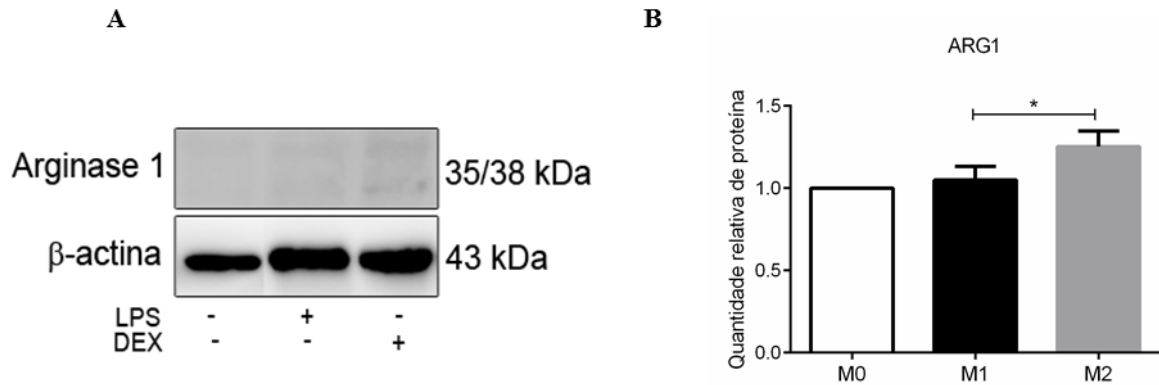
Figura 1. Concentração de citocinas nas diferentes condições de polarização de macrófagos.



Análise da concentração de citocinas secretadas pelos macrófagos pelo método ELISA após polarização M1 com LPS e M2 com DEX. **(A)** concentração de IL-6 e **(B)** concentração de IL-10, secretadas por macrófagos tipo M0, M1 e M2. n=3. Média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via seguido de pós teste Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Em seguida, a polarização dos macrófagos foi validada pela avaliação da quantidade relativa da proteína marcadora específica para M2 ARG1. Como notado na **Figura 2A e B** abaixo, observa-se o aumento da quantidade relativa de ARG1 em M2 ($1,25 \pm 0,09$) quando comparada a M1 ($1,05 \pm 0,08$). M0 representa a quantidade basal. A imagem da membrana, anterior a etapa de imunodeteccção, contendo todas as proteínas separadas encontra-se no **Apêndice A Figura 23**.

Figura 2. Quantidade relativa da proteína ARG1 nas diferentes condições de polarização de macrófagos.



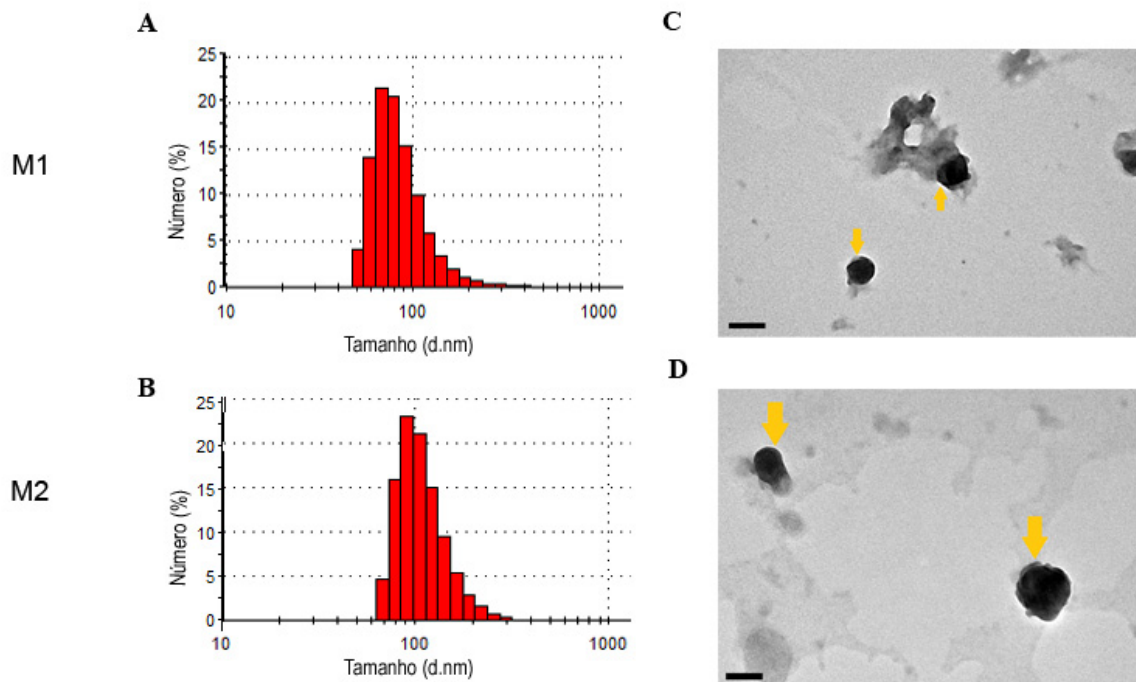
Análise da quantidade relativa da proteína ARG1 produzida pelos macrófagos do estudo pela técnica de *western blot* após polarização M1 com LPS e M2 com DEX. **(A)** Imagem da proteína em membrana PVDF após marcação com anticorpo específico e **(B)** quantificação relativa. n=3. Média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via seguido de pós teste Tukey. * $p < 0,05$.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Após a confirmação da polarização dos macrófagos, as vesículas foram isoladas dos respectivos sobrenadantes, pelo método de centrifugações diferenciais, e caracterizadas para posterior avaliação do perfil de miRNAs. Nesta etapa de caracterização foram consideradas apenas as vesículas de macrófagos M1 e M2.

A caracterização das vesículas foi iniciada para confirmação dos exossomos pela avaliação do tamanho e da morfologia segundo a literatura (COLOMBO et al., 2014). O índice de polidispersão foi de 0,326 para as vesículas de M1 e 0,152 para as vesículas de M2. As vesículas apresentaram tamanhos variando entre 50 e 300 nm de diâmetro, sendo o diâmetro médio majoritário das vesículas de macrófagos M1 de 70 nm (**Figura 3A**) e M2 de 100 nm (**Figura 3B**). As imagens mostram as vesículas em uma morfologia esferoidal chamada formato em copo (*cup-shaped*) (**Figura 3C e D**). A partir dessas análises confirmou-se a identidade e a presença majoritária de exossomos na população de vesículas isoladas dos macrófagos M1 e M2.

Figura 3. Tamanho e morfologia das vesículas secretadas por macrófagos.



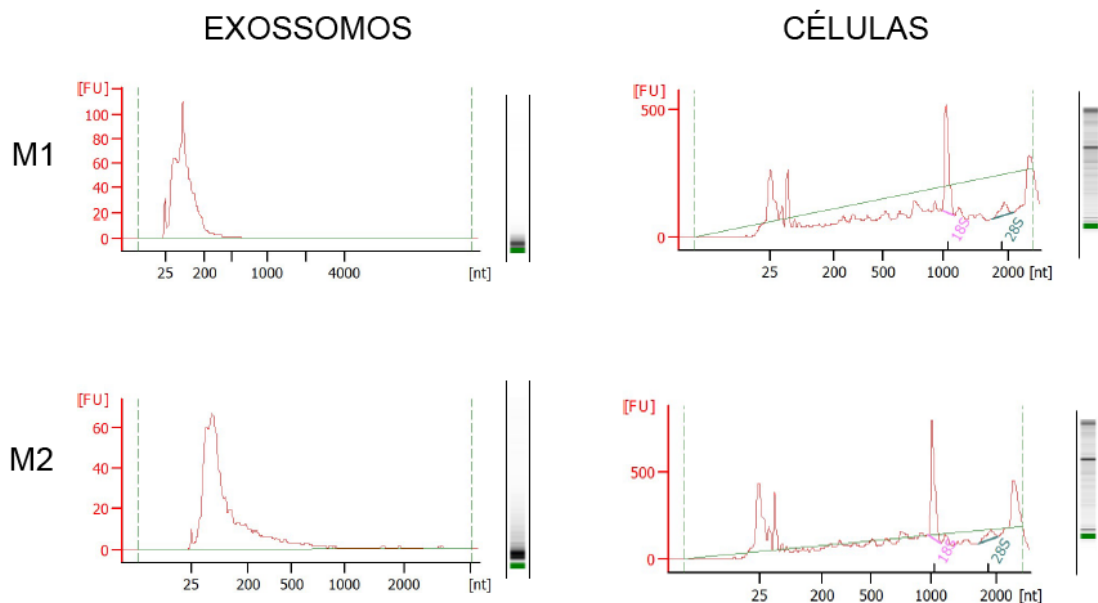
Análise do tamanho por DLS (**A e B**) e morfologia por MET (**C e D**) das vesículas coletadas e isoladas dos sobrenadantes dos macrófagos M1 e M2 pelo método de centrifugações diferenciais. As setas amarelas indicam as vesículas. Barra de escala: 100 nm. n=3.

Em seguida, para a análise do perfil de expressão de (miRNAs) nos exossomos, o RNA total, tanto dos exossomos quanto de suas células de origem, foi primeiramente extraído. Após extração do RNA, avaliou-se a concentração, qualidade e pureza do ácido nucleico. Nessa avaliação, todas as amostras apresentaram-se suficientemente puras e íntegras, ou seja, sem presença de degradação, e a quantificação do RNA apresentou diferenças nas concentrações entre exossomos e células, sendo de aproximadamente 3 a 10 vezes menor nos exossomos (**Tabela 4 e Figura 4**). Além disso, os eletroferogramas permitiram identificar a presença de pequenos RNAs nas amostras de exossomos, bem como a ausência de RNA ribossômico 18S e 28S, em comparação com as amostras de RNA das respectivas células (**Figura 4**). A análise de pureza do RNA das amostras está apresentada no **Apêndice B Tabela 12**.

Tabela 4. Concentração de RNA nos exossomos e respectivas células de macrófagos.

	Exossomos ($\mu\text{g/mL}$)	Células ($\mu\text{g/mL}$)
M1	6 ± 1	20 ± 5
M2	$3 \pm 0,5$	30 ± 7

n=3. Média \pm desvio padrão.

Figura 4. Concentração e qualidade do RNA nos exossomos e respectivas células de macrófagos.

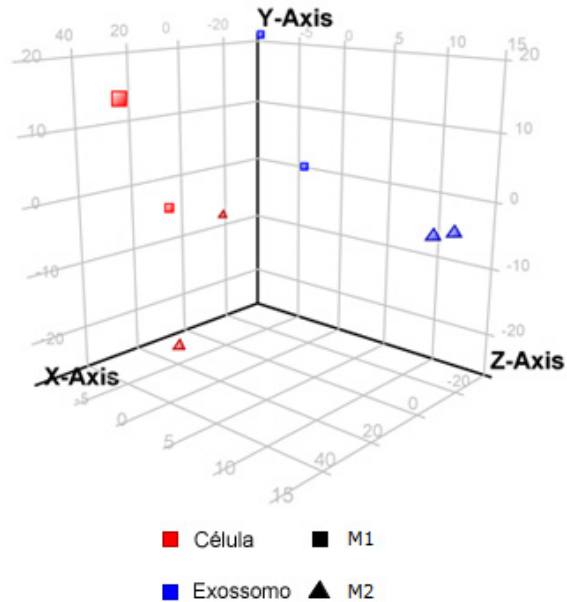
Análise da concentração e qualidade do RNA pela técnica de eletroforese microfluídica. As imagens ilustram os eletroferogramas e géis virtuais do RNA extraído dos exossomos e respectivas células de macrófagos M1 e M2.

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs

Concluída a etapa de caracterização e extração de RNA dos exossomos, o conteúdo de miRNAs desses (exomiRs) foi analisado para a investigação de possíveis diferenças entre exomiRs expressos em M1 e M2 e também com relação as respectivas células de origem.

Os resultados obtidos evidenciaram maior variabilidade entre a expressão de miRNAs provenientes dos exossomos quando comparados às respectivas células. Do mesmo modo, é possível notar menor variabilidade entre os perfis de expressão das replicatas de exossomos de macrófagos M2, e algumas diferenças entre as replicatas de células M2, como também dos exossomos e células e dos macrófagos M1 (**Figura 5**).

Figura 5. Variabilidade dos miRNAs expressos nos exossomos e respectivas células de macrófagos.



Análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal components analysis*) dos dados de intensidade normalizada. Os eixos representam os três principais componentes da análise de microarranjo em relação à variabilidade dos dados obtidos dos miRNAs de exossomos e respectivas células de macrófagos M1 e M2. $n=2$.

Além disso, a análise de microarranjo também demonstrou diferenças e semelhanças em números entre o total de miRNAs detectados. Dos 1136 miRNAs detectáveis na lâmina de microarranjo, foram detectados ao todo 323 miRNAs entre células e exossomos. A **Figura 6A** ilustra os miRNAs detectados nas células (258 miRNAs) e os expressos nos exossomos (159 miRNAs), sendo encontrados 95 miRNAs em comum entre células e exossomos. A **Figura 6B** ilustra as semelhanças e diferenças entre os miRNAs detectados nas diferentes condições de células (M1 e M2) e a **Figura 6C** nas diferentes condições de exossomos (M1 e M2). A **Figura 6D** e **E** ilustra as semelhanças e diferenças entre células e exossomos de M1 e M2 respectivamente.

Figura 6. Número total de miRNAs detectados nos exossomos e respectivas células de macrófagos.

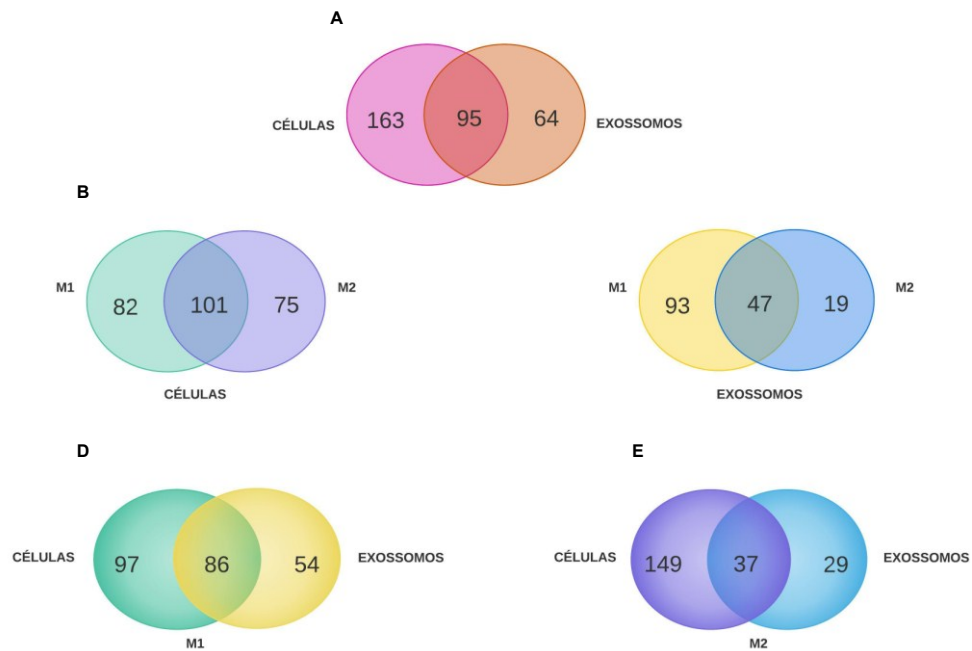
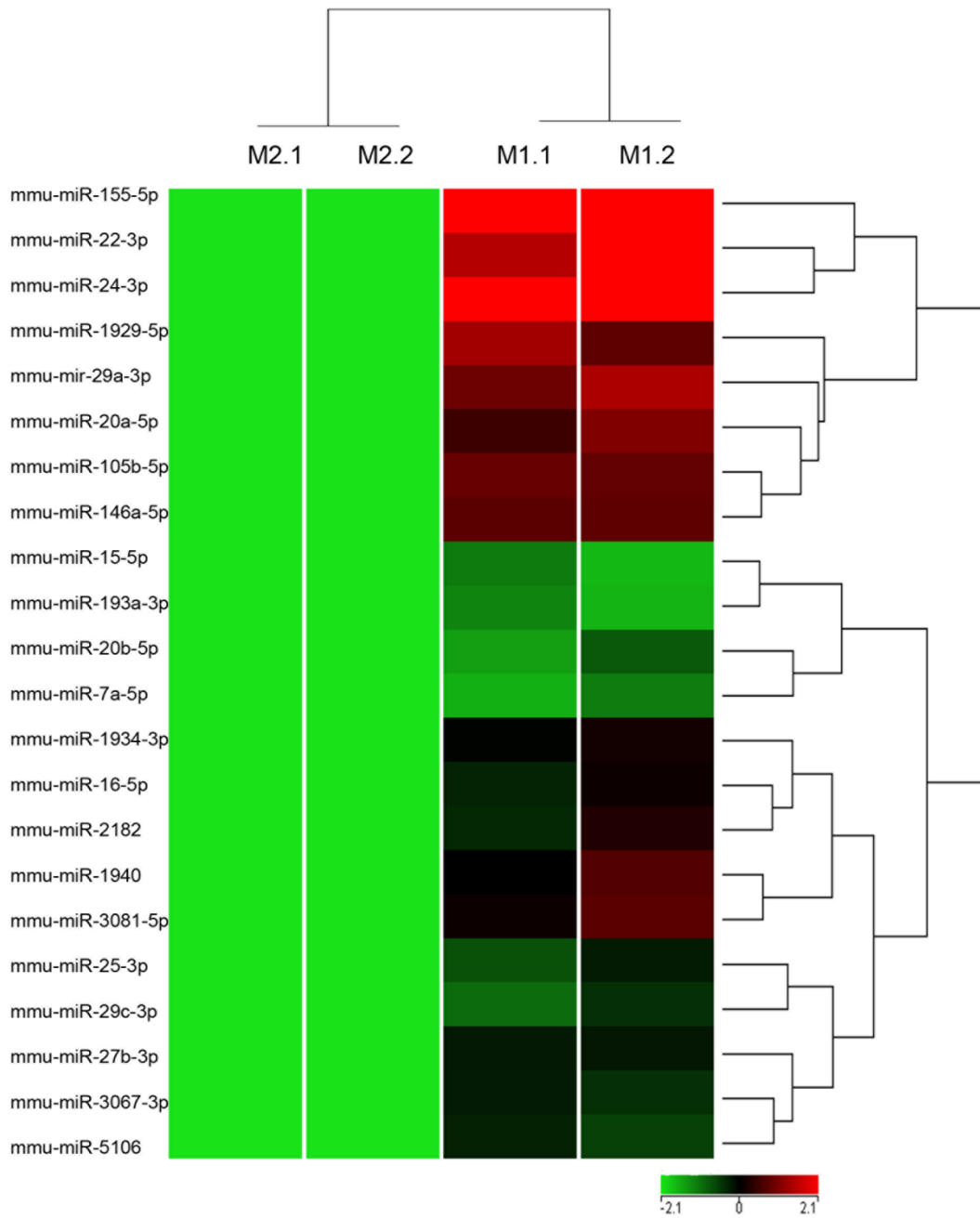


Diagrama de Venn ilustrando em números semelhanças e diferenças em todos os miRNAs detectados entre células e exossomos (**A**), entre as células M1 e M2 (**B**), entre os exossomos M1 e M2 (**C**), entre as células e os exossomos M1 (**D**) e entre as células e exossomos M2 (**E**), pela técnica de microarranjo. n=2.

Após uma análise estatística dos dados de exossomos mostrados acima (**Figura 6C**), foram reveladas as principais diferenças entre os perfis de expressão dos exomiRs de macrófagos M1 e M2. Dos 159 exomiRs detectados na lâmina de microarranjo, 47 foram detectados nos exossomos M1 e M2, desses 22 apresentaram-se diferentemente expressos, sendo os 22 *up-regulated* em M1 quando comparado aos M2 (**Figura 7** e **Tabela 5**).

Figura 7. Perfil de expressão dos exomiRs de macrófagos diferentemente expressos.



Mapa de calor e agrupamentos hierárquicos ilustrando a intensidade de expressão dos exomiRs diferencialmente expressos nos macrófagos M1 e M2 pela técnica de microarranjo. $n=2$. Teste-t moderado. $p<0,001$ e *fold change* (FC) >2 . Na escala de cor, a verde indica ausência de expressão, a preta indica baixa expressão e a vermelha indica alta expressão.

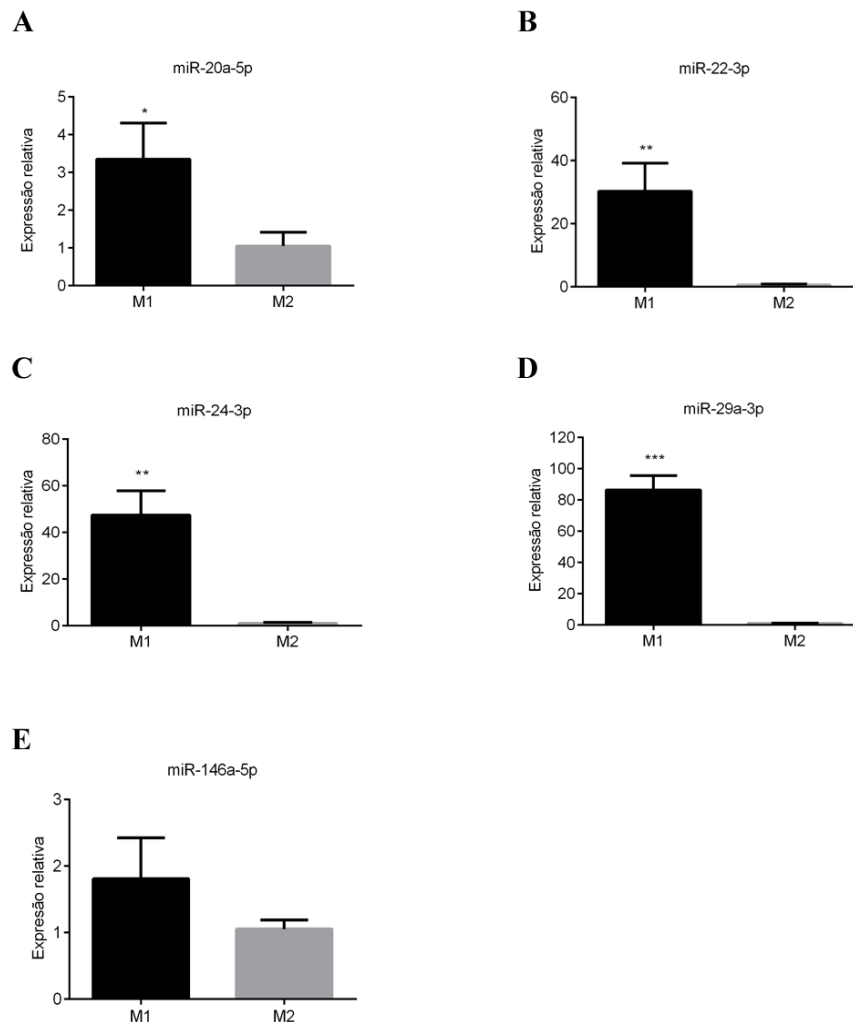
Tabela 5. Perfil de expressão dos exomiRs de macrófagos diferentemente expressos.

M1 versus M2			
miRNA	Regulação	FC	Valor de p
mmu-miR-7a-5p	<i>up</i>	17,175	5,14E ⁻⁵
mmu-miR-15-5p	<i>up</i>	16,779	7,24E ⁻⁰²
mmu-miR-16-5p	<i>up</i>	41,093	2,25E ⁻⁵
mmu-miR-20a-5p	<i>up</i>	755,382	3,10E ⁻⁵
mmu-miR-20b-5p	<i>up</i>	20,286	9,40E ⁻⁵
mmu-miR-22-3p	<i>up</i>	1546,118	4,22E ⁻⁵
mmu-miR-24-3p	<i>up</i>	1887,385	2,05E ⁻⁶
mmu-miR-25-3p	<i>up</i>	31,571	3,73E ⁻⁵
mmu-miR-27b-3p	<i>up</i>	38,084	4,23E ⁻⁶
mmu-miR-29a-3p	<i>up</i>	975,366	2,30E ⁻⁵
mmu-miR-29c-3p	<i>up</i>	27,274	5,30E ⁻⁵
mmu-miR-105b-5p	<i>up</i>	780,028	3,01E ⁻⁶
mmu-miR-146a-5p	<i>up</i>	744,411	3,04E ⁻⁶
mmu-miR-155-5p	<i>up</i>	2742,011	2,86E ⁻⁵
mmu-miR-193a-3p	<i>up</i>	16,454	4,21E ⁻⁵
mmu-miR-1929-5p	<i>up</i>	906,959	3,00E ⁻⁵
mmu-miR-1934-3p	<i>up</i>	46,300	6,67E ⁻⁶
mmu-miR-1940	<i>up</i>	55,825	6,10E ⁻⁵
mmu-miR-2182	<i>up</i>	42,896	5,73E ⁻⁵
mmu-miR-3067-3p	<i>up</i>	35,281	7,71E ⁻⁶
mmu-miR-3081-5p	<i>up</i>	58,838	5,00E ⁻⁵
mmu-miR-5106	<i>up</i>	32,488	1,38E ⁻⁵

mmu-miR = miRNA murino; FC = *fold change*; *up* = *up-regulated*.

A partir dos resultados obtidos pela análise estatística, cinco exomiRs foram selecionados para validação pela técnica de qPCR, seguindo dois critérios: *i)* Apresentar os maiores valores de FC e *ii)* Possuir uma sequência homóloga à humana. Assim, os exomiRs selecionados foram: miR-20a-5p, miR-22-3p, miR-24-3p, miR-29a-3p e miR-146a-5p. Os dados obtidos concordam, e assim validam a expressão aumentada dos exomiRs selecionados em M1 quando comparada aos M2 (**Figura 8A-D e Tabela 6**), com exceção ao miR-146a-5p em que a expressão não foi significativamente diferente entre M1 e M2 (**Figura 8E e Tabela 6**).

Figura 8. Perfil de expressão dos exomiRs de macrófagos diferentemente expressos.



Perfil de expressão dos miRNAs miR-20a-5p (A), miR-22-3p (B), miR-24-3p (C), miR-29a-3p (D) e miR-146a-5p (E), validados pela técnica de qPCR. Os gráficos representam os valores de expressão relativa. n=3. Média \pm desvio padrão. Teste-t não pareado. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Tabela 6. Perfil de expressão dos exomiRs de macrófagos diferentemente expressos.

	miR-20a-5p	miR-22-3p	miR-24-3p	miR-29a-3p	miR-146a-5p
M1	3,35 ± 0,9	30,32 ± 8,9	47,53 ± 10,4	86,4 ± 9,1	1,81 ± 0,6
M2	1,05 ± 0,4	0,62 ± 0,3	1,06 ± 0,4	1,00 ± 0,06	1,05 ± 0,13

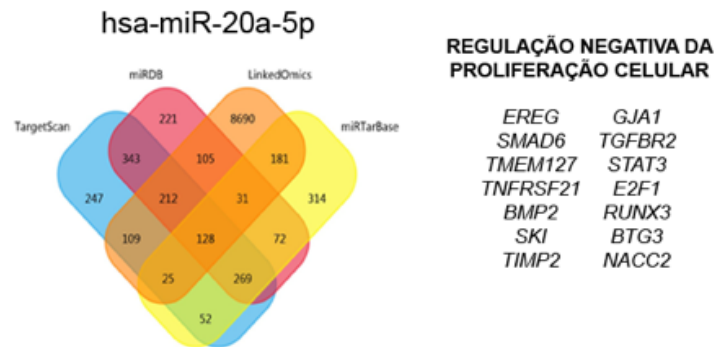
Valores expressos em expressão relativa. n=3. Média ± desvio.

5.4 PREDIÇÃO DE VIAS E ALVOS

Com o intuito de investigar possíveis vias e alvos relacionados à inibição da progressão tumoral, os quatro exomiRs (validados na análise de qPCR como diferentemente expressos entre M1 e M2) foram submetidos a análises em quatro bases de dados selecionadas. Duas bases de dados, a TargetScan e a miRDB, avaliam alvos preditos de miRNAs não validados experimentalmente. Já a base de dados miRTarBase avalia alvos validados experimentalmente, e a base de dados LinkedOmics avalia a correlação dos dados, utilizando esta última, dados obtidos de amostras de pacientes. Portanto, foram realizadas somente análises utilizando as sequências humanas dos miRNAs (hsa-miR), genes e vias. Além disso somente genes regulados negativamente foram considerados (miRNAs que diminuem a expressão do gene).

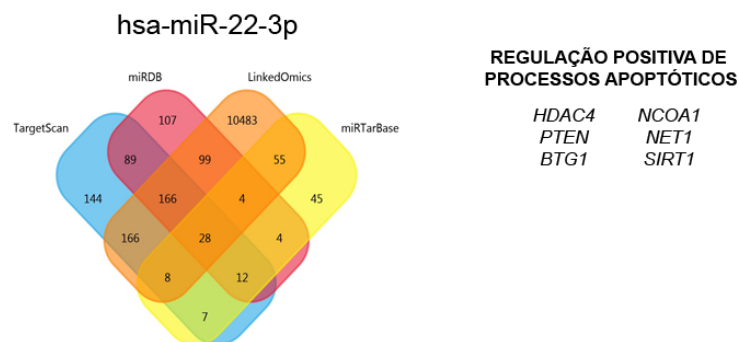
Para o miR-20a-5p foram encontrados 1385 alvos na plataforma TargetScan, 1380 na base de dados miRDB, 1665 genes no banco de dados miRTarBase e 9481 alvos no LinkedOmics. Os resultados foram intersectados utilizando o *software FunRich 3.1.4*, e o total de 128 genes em comum entre as bases foram obtidos (**Apêndice C Quadro 11**). A análise desses 128 genes na plataforma *Gene Ontology* resultou na relação de 70 processos biológicos (**Apêndice C Quadro 12**), um deles relacionado a regulação negativa da proliferação celular no qual o miR-20a-5p regula 14 genes (**Figura 9**).

Figura 9. Genes e vias antitumorais regulados pelo hsa-miR-20a-5p.



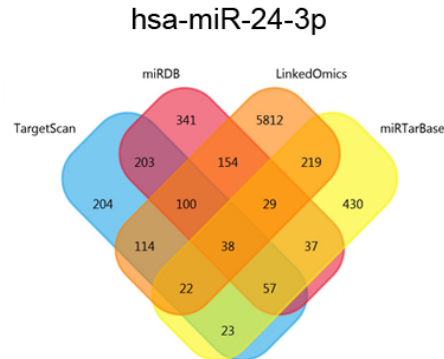
Através da plataforma TargetScan encontrou-se 620 alvos para o miR-22-3p, e da base de dados miRDB 509, e do banco de dados miRTarbase 203 genes e da base de dados LinkedOmics identificou-se 11009 alvos. A intersecção de genes entre as plataformas resultou em 28 alvos em comum (**Apêndice C Quadro 11**). Após análise no banco de dados Gene Ontology, 50 vias biológicas foram identificadas (**Apêndice C Quadro 12**), uma delas com 6 genes regulados pelo miR-22-3p relacionada à regulação positiva de processos apoptóticos (**Figura 10**).

Figura 10. Genes e vias antitumorais regulados pelo hsa-miR-22-3p.



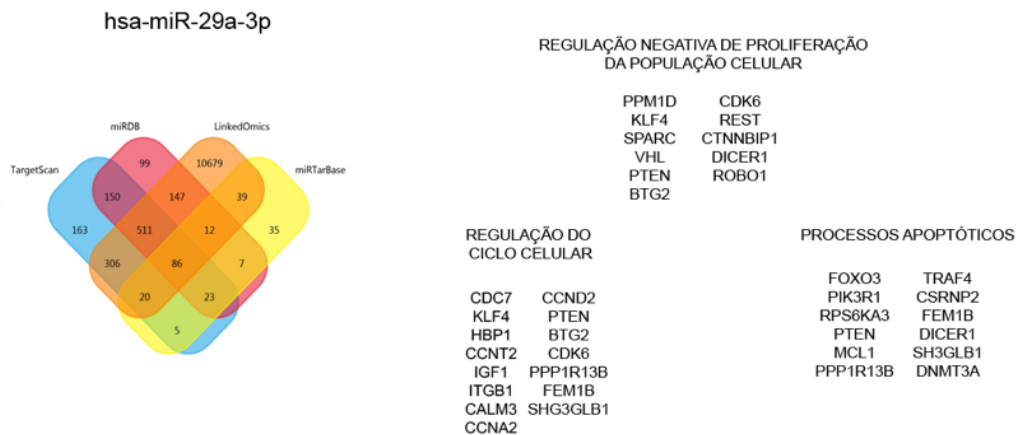
Para o miR-24-3p foram encontrados 761 alvos na plataforma TargetScan, 959 na base de dados miRDB, 990 genes no banco de dados miRTarBase e 6488 alvos no LinkedOmics. Os resultados foram intersectados e o total de 38 genes em comum entre as bases foi obtido (**Figura 11 e Apêndice C Quadro 11**). Após análise no banco de dados Gene Ontology, nenhuma via biológica foi estatisticamente significativa.

Figura 11. Genes regulados pelo hsa-miR-24-3p.



Através da plataforma TargetScan encontrou-se 1265 alvos para o miR-29a-3p, da base de dados miRDB 1035, do banco de dados miRTarbase 228 genes e da base de dados LinkedOmics identificou-se 11800 alvos. A intersecção de genes entre as plataformas resultou em 86 alvos em comum (**Apêndice C Quadro 11**). A análise desses 86 genes na plataforma *Gene Ontology* resultou na relação de 264 processos biológicos (**Apêndice C Quadro 12**), três deles relacionados a inibição da progressão tumoral, como ilustrado na **Figura 12**.

Figura 12. Genes e vias antitumorais regulados pelo hsa-miR-29a-3p.



Após a análise de bioinformática, por regular a maior quantidade de genes envolvidos em vias de processos antitumorais e também pela maior expressão relativa validada no ensaio de qPCR nos exossomos de macrófagos M1, o hsa-miR-29a-3p foi o

miRNA selecionado para a validação experimental ou melhor, para a realização de ensaios funcionais em células de melanoma.

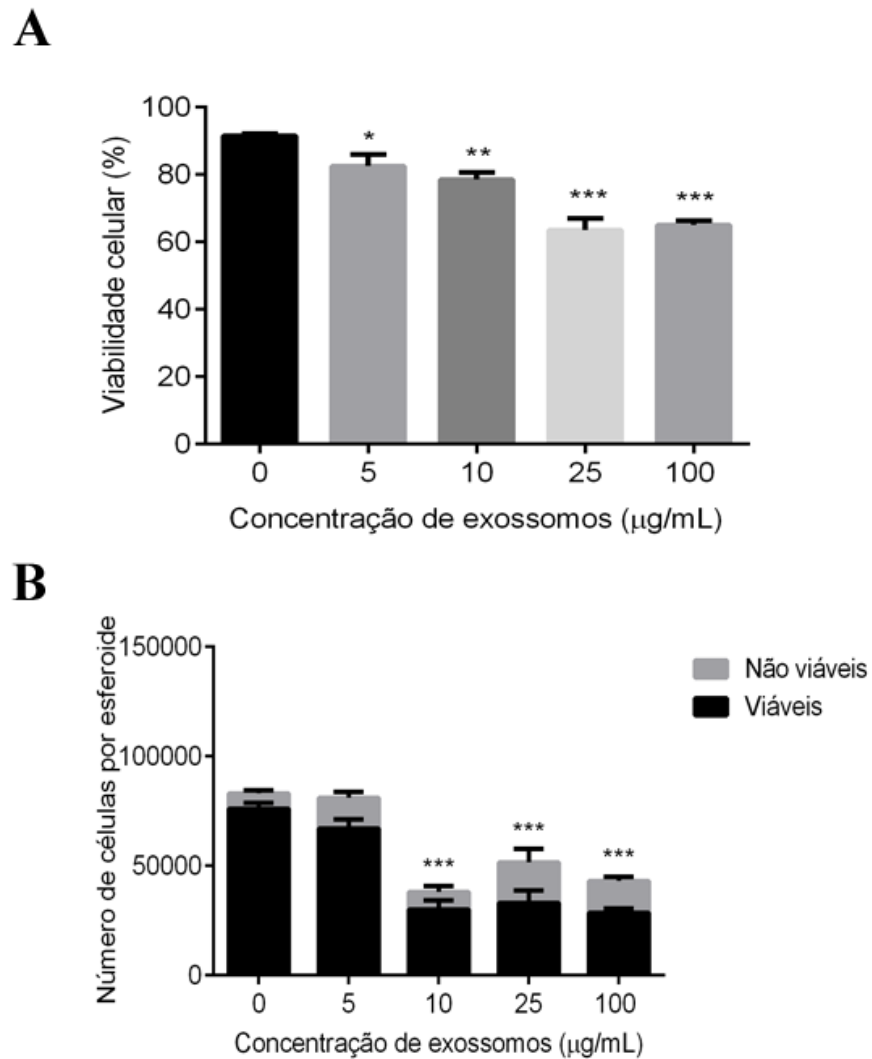
5.5 ENSAIOS FUNCIONAIS

Concluídas as etapas de isolamento, caracterização, análise do perfil de expressão dos exomiRs e a predição de alvos e vias, tanto os exossomos de macrófagos M1 quanto o hsa-miR-29a-3p foram avaliados funcionalmente em experimentos *in vitro* para a investigação de efeitos antitumorais no melanoma.

5.1.1 Exossomos

Os esferoides foram incubados com os exossomos de macrófagos M1 para análise da viabilidade celular, volume do esferoide e proliferação celular.

Para determinar a menor concentração de exossomos que interfira significativamente na viabilidade dos esferoides, porém sem causar morte celular desnecessária para a continuidade aos experimentos, uma curva crescente de concentração foi testada como ensaio de triagem. Após três dias de incubação, a viabilidade das células tratadas com exossomos foi aproximadamente reduzida em 15% com 5 $\mu\text{g/mL}$ de exossomos e em 35% com 25 $\mu\text{g/mL}$ de exossomos. Entretanto, a viabilidade celular não continuou a diminuir com o aumento da concentração até 100 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 13A e Tabela 7**). Ainda, houve significativa diminuição do número total de células por esferoide a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de exossomos de macrófagos M1 (**Figura 13B e Tabela 8**).

Figura 13. Viabilidade celular dos esferoides após incubação com os exossomos de macrófagos M1.

Ensaio de triagem. **(A)** Viabilidade celular dos esferoides em porcentagem pelo ensaio da fosfatase ácida. n=3. Média ± desvio padrão. ANOVA de uma via seguido de pós teste Dunnet. **(B)** Número total de células por esferoide contadas por azul de Tripano. n=3. Média ± desvio padrão. ANOVA de duas vias seguido de pós teste Sidak. Análises estatísticas em comparação ao controle livre de exossomos (0 µg/mL) * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Tabela 7. Viabilidade celular dos esferoides em porcentagem após incubação com os exossomos de macrófagos M1.

Concentração (µg/mL)	0	5	10	25	100
Viabilidade (%)	91,5 ± 0,7	82,5 ± 3,5	78,5 ± 2,1	63,5 ± 3,5	65 ± 1,4

n=3. Média ± desvio padrão.

Tabela 8. Viabilidade celular dos esferoides em número de células após incubação com os exossomos de macrófagos M1.

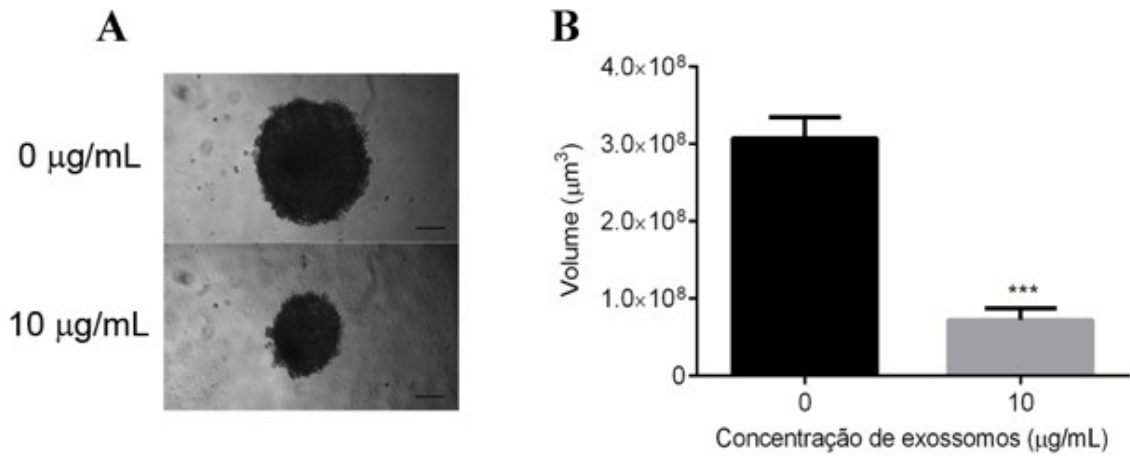
Concentração (µg/mL)	0	5	10	25	100
Viáveis (número de células por esferoide)	76000 ± 2828	67000 ± 4243	30000 ± 4243	33000 ± 5657	28500 ± 2121
Não-viáveis (número de células por esferoide)	7000 ± 1414	14000 ± 2828	8000 ± 2828	18500 ± 6364	14500 ± 2121

n=3. Média ± desvio padrão.

Com base nesses resultados, optou-se em investigar a possibilidade de um bloqueio na proliferação celular com a concentração de 10 µg/mL, que reduziu a viabilidade celular em cerca de 20% e o número total de células em aproximadamente 50%.

Primeiramente, analisando ao microscópio, o volume dos esferoides foi avaliado para monitorar o crescimento em resposta à incubação dos exossomos. Observou-se uma diminuição no volume dos esferoides em quase 3 vezes quando incubados com exossomos M1 ($3,08 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8 \mu\text{m}^3$) em comparação ao controle livre de exossomos (0 µg/mL - $0,7 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8 \mu\text{m}^3$) (**Figura 14A e B**).

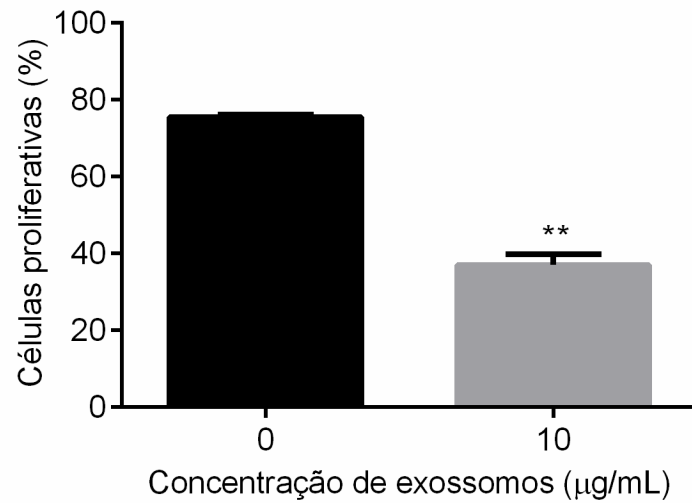
Figura 14. Volume dos esferoides após incubação com os exossomos de macrófagos M1.



Análise do volume dos esferoides por microscopia de luz. **(A)** Fotomicrografia dos esferoides após três dias de incubação com os exossomos. Barra de escala: 100 µm. **(B)** Representação gráfica do volume dos esferoides. n=3. Média ± desvio padrão. Teste-t não pareado. *** p < 0,001.

Posteriormente, para complementar a análise funcional dos exossomos, a atividade de proliferação celular foi analisada, sendo observado que a proliferação celular foi reduzida em aproximadamente 50% quando os esferoides foram incubados com exossomos M1 (10 µg/mL - 37 ± 2,8%) em comparação ao controle, livre de exossomos (0 µg/mL - 75,5 ± 0,7%) **(Figura 15)**.

Figura 15. Proliferação celular nos esferoides após incubação com os exossomos de macrófagos M1.



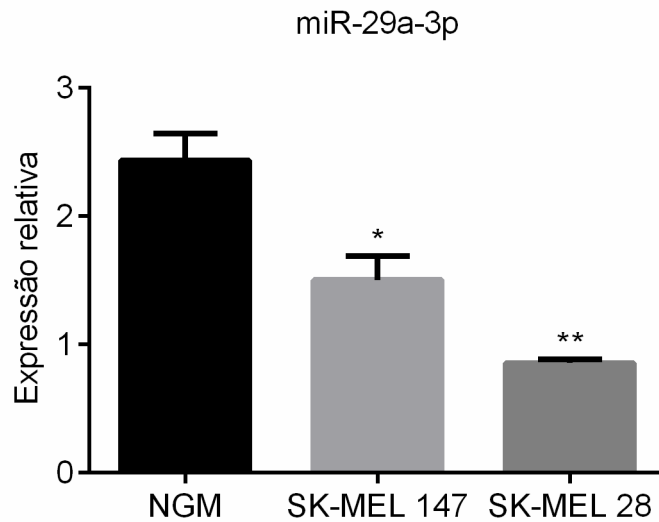
Análise de proliferação celular pelo método intercalante de DNA *Click-it EdU*. n=3. Média \pm desvio padrão. Teste-t não pareado. ** p < 0,01.

5.5.2 hsa-miR-29a-3p

Após concluir que os exossomos de macrófagos M1 apresentaram efeitos antiproliferativos nos esferoides de melanoma, e a análise de predição de alvos e vias indicar o exomiR-29a-3p como um dos responsáveis por esses efeitos, decidiu-se por validar funcionalmente o respectivo miRNA em células de melanoma humano.

Inicialmente, para a seleção da linhagem celular de melanoma a ser utilizada nos experimentos de transfecção, a expressão basal do miR-29a-3p foi avaliada em duas linhagens humanas de melanoma (SK-MEL-28 e SK-MEL-147) em comparação com a expressão na linhagem humana de melanócito (NGM). Pelo resultado, mostrado na **Figura 16**, a linhagem celular SK-MEL-28 foi a que expressou o miR-29a-3p em menor quantidade (quantidade basal) ($0,86 \pm 0,03$) quando comparada com a linhagem NGM ($2,44 \pm 0,2$) e a linhagem SK-MEL-147 ($1,5 \pm 0,2$), sendo então selecionada para os seguintes experimentos.

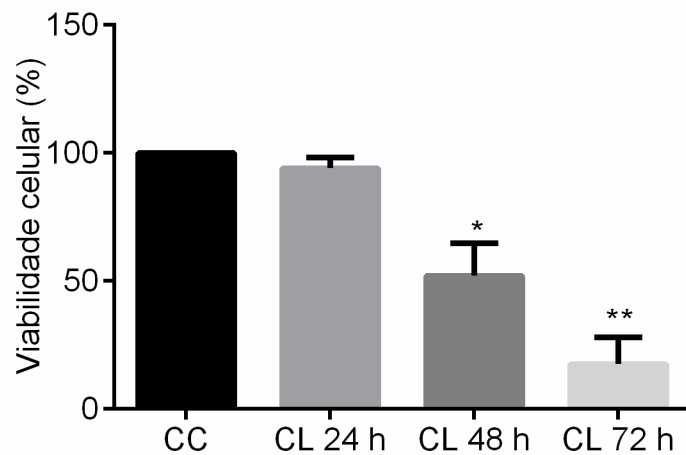
Figura 16. Expressão basal miR-29a-3p em linhagens celulares humanas de melanoma.



Análise da expressão basal das linhagens celulares humanas de melanoma SK-MEL-147 e SK-MEL-28 em relação a linhagem celular humana de melanócito NGM pela técnica de qPCR. Os gráficos representam os valores de expressão relativa. n=2. Média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via seguido de pós teste Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

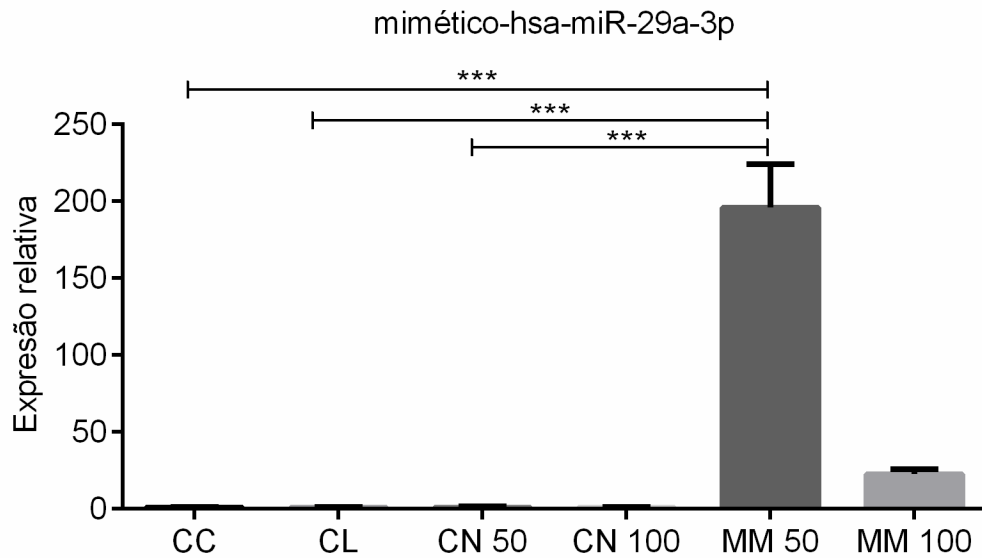
Para determinar o tempo limite de transfecção, baseado na citotoxicidade do reagente *LipofectamineTM*, as células foram previamente incubadas com o reagente em um período de 6 h e a citotoxicidade foi verificada pela viabilidade celular após 24, 48 e 72 h. O resultado obtido mostrou aparente sensibilidade das células ao agente a partir de 48 h de incubação, com uma redução da viabilidade celular em $52 \pm 12,7\%$ (**Figura 17**). Em 72 h, do total de células, apenas $17,5 \pm 10,6\%$ estavam viáveis. Assim, determinou-se o tempo total de transfecção de 24 h para a análise dos resultados em cada experimento, pois a viabilidade celular nesse período de tempo foi de $94 \pm 4,2\%$.

Figura 17. Citotoxicidade do reagente *LipofectamineTM* nas células de melanoma.



Avaliação da citotoxicidade da *LipofectamineTM* na linhagem celular humana SK-MEL-28 pelo método de MTT. CC: células incubadas somente com o meio Opti-MEM. CL: células incubadas com *LipofectamineTM*. n=2. Média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via seguido de pós teste Tukey. * p< 0,05; ** p< 0,01.

Após definido o tempo, e para finalizar as condições apropriadas de transfecção, a concentração mais adequada do mimético também foi determinada. Foram testadas duas concentrações de mimético, 50 e 100 nM, a fim de selecionar a condição que, após transfecção, proporcionasse maior expressão do miR-29a-3p nas células em comparação aos controles utilizados. Observa-se na **Figura 18** e **Tabela 9** que a concentração de 50 nM do mimético aumentou a expressão do miRNA em aproximadamente 200 \times em comparação aos controles. Do contrário, embora aumentada em relação aos controles em cerca de 20 \times , aumentando-se a concentração do mimético para 100 nM, a expressão foi reduzida em comparação a expressão produzida pelo mimético na concentração de 50 nM. Portanto, a concentração de 50 nM foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

Figura 18. Expressão de hsa-miR-29a-3p após transfecção nas células de melanoma.

Análise da expressão pela técnica de qPCR na linhagem celular humana SK-MEL-28 após transfecção com o mimético. CC: células incubadas somente com o meio Opti-MEM. CL: células incubadas com *Lipofectamine*TM. CN: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético controle negativo MM: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético-hsa-miR-29a-3p. n=2. Média ± desvio padrão. ANOVA de uma via seguido de pós teste Tukey. *** p< 0,001.

Tabela 9. Expressão de hsa-miR-29a-3p após transfecção nas células de melanoma.

	CC	CL	CN 50	CN 100	MM 50	MM 100
Expressão Relativa	1,02 ± 0,3	1,02 ± 0,3	1,03 ± 0,4	1,00 ± 0,2	196 ± 28	22,6 ± 3,2

CC: células incubadas somente com o meio Opti-MEM. CL: células incubadas com *Lipofectamine*TM. CN: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético controle negativo MM: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético-hsa-miR-29a-3p. n=2. Média ± desvio padrão.

Concluída a análise das condições de transfecção (linhagem celular - SK-MEL-28, tempo de 24 h e concentração do mimético de 50 nM), foram iniciadas as análises funcionais do miR-29a-3p sobre as células humanas de melanoma, de acordo com os dados referentes à bioinformática: regulação de ciclo celular, apoptose e proliferação celular.

O ciclo celular foi avaliado para a investigação de um possível bloqueio de ciclo após a superexpressão do miR-29a-3p. Embora a diferença não tenha sido significativa entre os

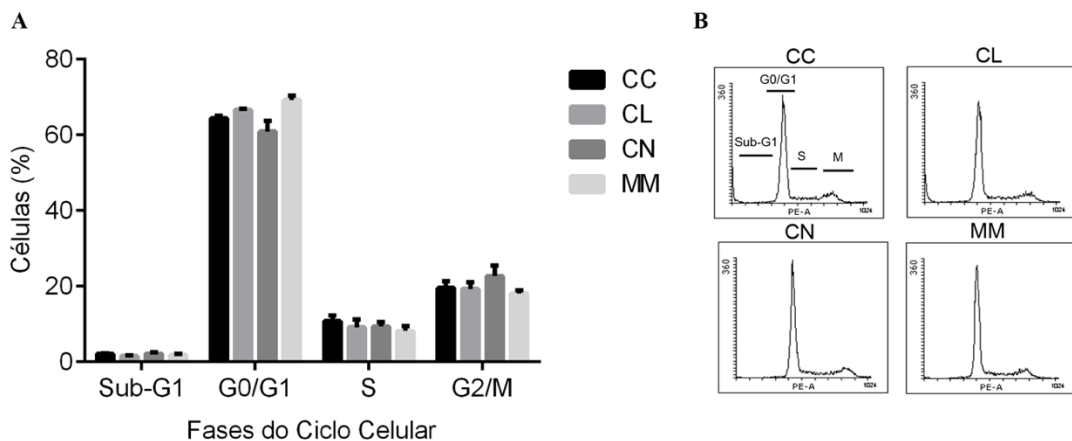
controles e o mimético de miR-29a-3p, foi possível observar uma tendência de aumento da fase do ciclo celular G0/G1 quando a célula SK-MEL-28 superexpressa o miR-29a-3p, bem como uma tendência de diminuição da fase de síntese (S) e de replicação (G2/M) (Tabela 10 e Figura 19A e B).

Tabela 10. Efeito da transfecção com o mimético-miR-29a-3p no ciclo celular das células de melanoma.

Ciclo Celular (%)				
	CC	CL	CN	MM
Sub-G1	2,09 ± 0,1	1,59 ± 0,2	2,17 ± 0,4	1,85 ± 0,3
G0/G1	64,4 ± 0,6	66,6 ± 0,3	60,9 ± 2,8	69,3 ± 1,2
S	10,8 ± 1,6	9,14 ± 2,1	9,38 ± 1,2	8,17 ± 1,3
G2/M	19,6 ± 1,8	19,3 ± 1,8	22,3 ± 2,8	18,1 ± 0,9

CC: células incubadas somente com o meio Opti-MEM. CL: células incubadas com *Lipofectamine*TM. CN: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético controle negativo MM: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético-hsa-miR-29a-3p. n=2. Média ± desvio padrão.

Figura 19. Efeito da transfecção com o mimético-miR-29a-3p no ciclo celular das células de melanoma.



Análise do ciclo celular pela marcação por IP em citometria de fluxo na linhagem celular humana SK-MEL-28 após transfecção com o mimético. CC: células incubadas somente com o meio Opti-MEM. CL: células incubadas com *Lipofectamine*TM. CN: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético controle negativo MM: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético-hsa-miR-29a-3p. n=2. Média ± desvio padrão.

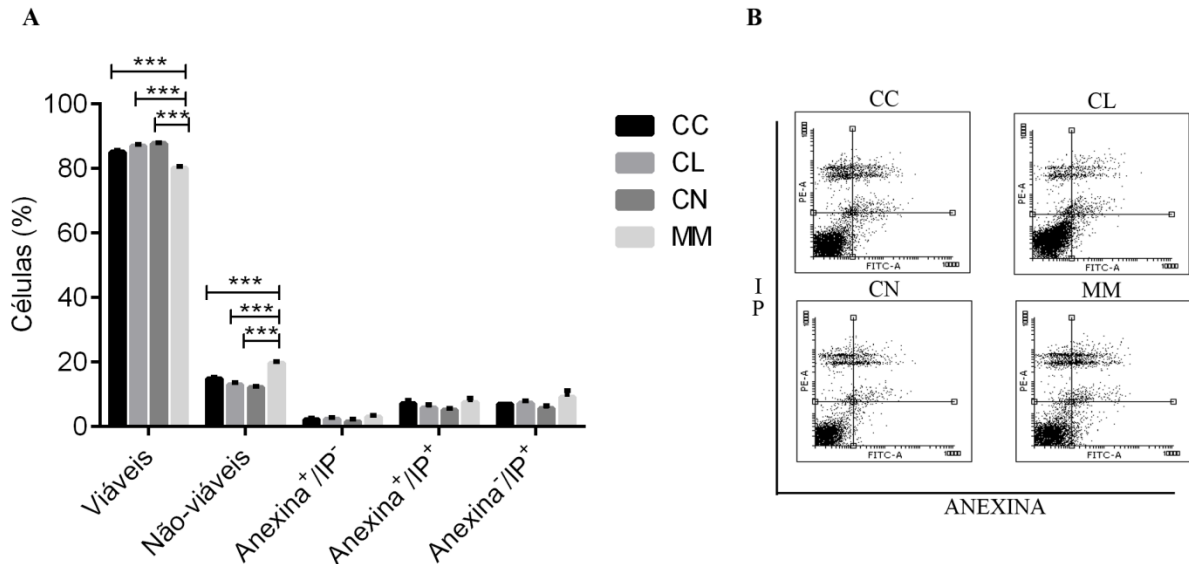
Posteriormente, a morte celular e o tipo de morte foram avaliados após a transfecção do miR-29a-3p. De acordo com o resultado houve diminuição da viabilidade celular e como consequência óbvia o aumento das células não viáveis. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada nos processos específicos de morte celular programada (**Tabela 11** e **Figura 20 A e B**).

Tabela 11. Efeito da transfecção com o mimético-miR-29a-3p na morte celular e no tipo de morte celular das células de melanoma.

	Morte Celular (%)			
	CC	CL	CN	MM
Viáveis	85,2 ± 0,5	87,8 ± 0,3	87,0 ± 0,6	80,2 ± 0,5
Não-viáveis	14,9 ± 0,5	12,2 ± 0,3	13,1 ± 0,6	19,7 ± 0,5
Anexina⁺/IP⁻	2,20 ± 0,5	1,53 ± 0,8	2,40 ± 0,4	3,02 ± 0,4
Anexina⁺/IP⁺	7,19 ± 1,1	5,11 ± 0,5	5,88 ± 1,0	7,55 ± 1,2
Anexina⁻/IP⁺	6,97 ± 0,1	5,60 ± 1,0	7,28 ± 0,7	9,17 ± 2,1

CC: células incubadas somente com o meio Opti-MEM. CL: células incubadas com *Lipofectamine*TM. CN: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético controle negativo MM: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético-hsa-miR-29a-3p. n=2. Média ± desvio padrão.

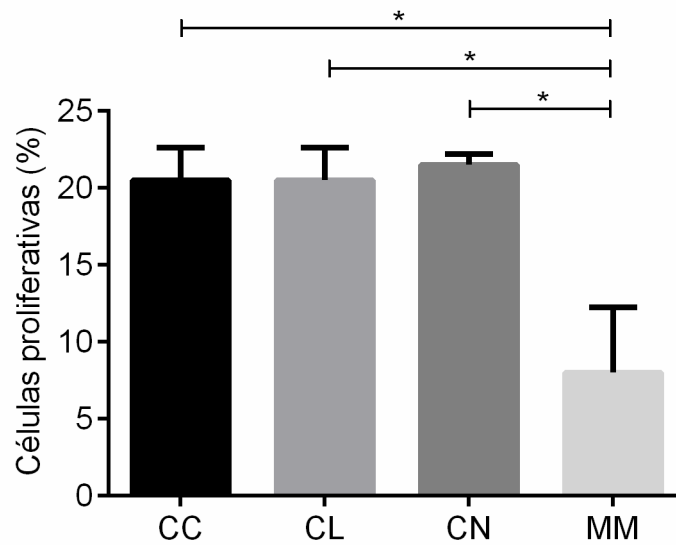
Figura 20. Efeito da transfecção com o mimético-miR-29a-3p na morte celular e no tipo de morte celular das células de melanoma.



Avaliação da morte e tipo de morte celular por IP e anexina V-FITC em citometria de fluxo na linhagem celular humana SK-MEL-28 após transfecção com o mimético. CC: células incubadas somente com o meio Opti-MEM. CL: células incubadas com *Lipofectamine*TM. CN: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético controle negativo MM: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético-hsa-miR-29a-3p. n=2. Média \pm desvio padrão. ANOVA de duas vias seguido de pós teste Sidak. *** $p < 0,001$.

Por fim, a avaliação da proliferação celular demonstrou que houve uma diminuição em aproximadamente 60% nas células proliferativas, que após transfecção passaram a superexpressar o miR-29a-3p, em comparação aos controles. A taxa de proliferação em CC (células incubadas somente com o meio Opti-MEM) foi de $20,5 \pm 2,1\%$, em CL (células incubadas com *Lipofectamine*TM) foi de $20,5 \pm 2,1\%$, em CN (células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético controle negativo) foi de $21,5 \pm 0,5\%$ e em MM (células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético-hsa-miR-29a-3p) foi de $8,0 \pm 4,2\%$ (**Figura 21**).

Figura 21. Proliferação em células de melanoma após transfecção com o mimético-miR-29a-3p.



Análise de proliferação celular pelo método intercalante de DNA *Click-it EdU* na linhagem celular humana SK-MEL-28 após transfecção com o mimético. CC: células incubadas somente com o meio Opti-MEM. CL: células incubadas com *Lipofectamine*TM. CN: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético controle negativo MM: células incubadas com a *Lipofectamine*TM e o mimético-hsa-miR-29a-3p. n=2. Média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via seguido de pós teste Tukey. * $p < 0,05$.

Em resumo, após polarização dos macrófagos as vesículas extracelulares foram isoladas e caracterizadas em exossomos, para posterior investigação do perfil de expressão de miRNAs. Com os resultados obtidos, uma análise de bioinformática foi realizada com os miRNAs superexpressos nos macrófagos M1, os quais foram validados pelo ensaio de qPCR. A análise evidenciou os efeitos antitumorais do miR-29a-3p. Para validação dos achados, tanto os exossomos quanto o miR-29a-3p foram avaliados em ensaios funcionais antiproliferativos. Os esferoides, quando incubados com os exossomos, demonstraram redução da viabilidade celular, do número total de células do volume do esferoide e da proliferação celular. E a transfecção do mimético-miR-29a-3p nas células humanas de melanoma resultou na diminuição significativa da proliferação celular e na tendência a uma parada de ciclo celular na fase G0/G1 e no aumento da morte celular.

6 DISCUSSÃO

A necessidade de terapias efetivas que aumentem a sobrevivência dos pacientes com melanoma maligno desafiam e ao mesmo tempo encorajam o pesquisador na busca de algo inovador. Sabendo da natureza biológica do melanoma em sensibilidade ao sistema imune, este trabalho demonstrou que os exossomos e o exomiR-29a-3p derivados de macrófagos M1, apresentaram efeitos antiproliferativos sobre o melanoma, evidenciando uma possível nova estratégia terapêutica.

Os macrófagos M1 geralmente produzem uma resposta pró-inflamatória para proteger o corpo de lesões. Este comportamento pode ser aproveitado para a aplicação em novas terapias (HAO et al., 2012; CENDROWICZ et al., 2021). Além da liberação de citocinas e quimiocinas para comunicação celular, os macrófagos M1 também podem interagir com outras células via exossomos, transmitindo sinais pró-inflamatórios que originam a ativação do sistema imunológico (ISMAIL et al., 2013; MCDONALD et al., 2014; WANG et al., 2020). Neste estudo, para explorar o potencial dos exossomos M1, os macrófagos murinos (linhagem celular J774A.1) foram previamente polarizados e a polarização foi validada por métodos bem estabelecidos (MANTOVANI et al., 2002; WEAGEL et al., 2015; ORECCHIONI et al., 2019).

Naturalmente nos seres humanos, em uma resposta inflamatória, os macrófagos modulam o próprio fenótipo produzindo substâncias dependendo do tipo de polarização (TRAVÉS et al., 2012). *In vitro*, para que os macrófagos sejam polarizados, é necessária a adição de substâncias ativadoras de macrófagos, para que haja uma simulação do *in vivo* (BISWAS; MANTOVANI, 2014). Neste trabalho, foram selecionadas como substâncias polarizadoras de macrófagos o LPS, para polarização M1 (MOSSER; ZHANG, 2008) e a DEX, para polarização M2 (VOGEL et al., 2014). Tanto o LPS quanto a DEX demonstraram eficácia na polarização dos macrófagos, o que foi confirmado pela análise da quantidade relativa da proteína ARG1 e das citocinas no sobrenadante celular pois de maneira geral, macrófagos M1 possuem um perfil pró-inflamatório, secretam citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e macrófagos M2 possuem um perfil anti-inflamatório pelo aumento da expressão de ARG1 e pela secreção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (TRAVÉS et al., 2012). Desse modo, também foi possível utilizar os exossomos obtidos dos macrófagos M2 como controle para fins comparativos aos exossomos M1.

Por definição exossomos são vesículas extracelulares liberadas pelas células via fusão com a membrana plasmática com a principal função de comunicação celular. Porém, os exossomos podem ser confundidos com outros tipos de vesículas liberadas pelas células que possuem tamanhos na mesma faixa, razão da importância da caracterização, assegurando a pureza das amostras alcançável com as metodologias disponíveis (EDGAR, 2016). Anteriormente à etapa de caracterização, garantiu-se o enriquecimento em exossomos no conteúdo de vesículas para a obtenção de sucesso no processo de isolamento. Já estão descritos na literatura diferentes métodos para o isolamento de vesículas celulares como centrifugação diferencial (THÉRY et al., 2006), filtração sequencial (HEINEMANN et al., 2014), imunoafinidade (HE et al., 2014), entre outros. Embora todas as técnicas apresentem prós e contras (LI et al., 2017), no presente trabalho optou-se em isolar as vesículas por ultracentrifugação, principalmente pelas facilidades laboratoriais e pela técnica já ter sido padronizada no laboratório (PRIGOL et al., 2021; RODE et al., 2021).

Posteriormente, as vesículas foram caracterizadas quanto ao tamanho, morfologia e a concentração de RNA. A Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares descreve que ao menos dois experimentos sejam realizados para a caracterização das vesículas extracelulares, incluindo imagens de MET para as análises de vesículas únicas e DLS para um grande número de vesículas. De acordo com COLOMBO et al. (2014) existem alguns critérios para a definição das vesículas extracelulares em exossomos, incluindo a morfologia em formato de copo, uma faixa de tamanho de 80 a 120 nm e o conteúdo principal em pequenos RNAs, com níveis baixos ou indetectáveis de RNA ribossômico 18S e 28S. Neste trabalho, as vesículas de macrófagos M1 e M2 apresentaram majoritariamente tamanho dentro da faixa indicativa de exossomos. O formato das vesículas observado nas imagens de MET muito se assemelha às imagens da literatura, nas quais os exossomos apresentam o chamado formato de copo, devido ao processo de desidratação das vesículas na preparação das amostras para a técnica, levando-as ao colapso. Imagens capturadas por crio-TEM, em que as amostras de exossomos não passam pelo processo de desidratação, os exossomos apresentam-se com o formato arredondado (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; GURUNATHAN et al., 2019). Além disso, o índice de distribuição demonstrou que as vesículas apresentaram tamanho homogêneo, uma vez que esse índice varia de 0,0 a 1,0, sendo que quanto mais homogênea a distribuição do tamanho das partículas, mais perto de 0,0 é o respectivo índice

(DANAIEI et al., 2018). Assim, após as análises de caracterização e baseando-se nos dados disponíveis na literatura, confirmou-se a composição majoritária das vesículas obtidas em exossomos.

A análise da concentração de RNA demonstrou valores inferiores de RNA total nos exossomos quando comparados com as respectivas células de origem, o que já era esperado, devido ao tamanho e complexidade das células em relação aos exossomos (DAVIDSON et al., 2017). Ainda, foi possível observar a presença majoritária de pequenos RNAs (< 250 nt) nos exossomos como também a ausência de RNA ribossômico 18S e 28S. Tanto a presença de pequenos RNAs, principalmente pelo conteúdo quase que absoluto de mRNA e miRNAs, quanto a ausência ou não-detecção de RNA ribossômico nos exossomos já foram descritos por COLOMBO et al. (2014). Resultados semelhantes foram descritos em outro trabalho que se utilizou da mesma metodologia aqui empregada, eletroforese capilar, para quantificar e avaliar a pureza do RNA dos exossomos derivados de soro/plasma de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer (ENDERLE et al., 2015).

Entre os pequenos RNAs presentes nos exossomos, os exomiRs são os mais interessantes para a pesquisa devido às funções reguladoras destes ácidos nucleicos na expressão gênica (ZHANG et al., 2015). Com o principal objetivo de encontrar e selecionar miRNAs expressos somente nos exossomos de macrófagos M1, o perfil de expressão de miRNAs dos exossomos de macrófagos M2 foi analisado para a comparação. Segundo TANG et al. (2018), o conteúdo molecular dos exossomos pode ser completamente diferente das respectivas células, o que acarreta diferenças significativas no papel biológico dos exossomos e das células de origem, embora ainda não estejam claros os mecanismos que norteiam essas diferenças. Entretanto, conforme mostrado anteriormente por GARZETTI et al. (2014), exossomos derivados de macrófagos polarizados apresentaram conteúdo em miRNAs semelhante ao fenótipo da célula de origem, distinguindo M1 de M2. Essas diferenças podem ser produzidas intracelularmente por proteínas e marcadores de superfície (LIU; SU, 2019) ou extracelularmente por estímulos ambientais (LINDENBERGH et al., 2019). Neste estudo, evidenciou-se que os exossomos continham aproximadamente 40% do conteúdo total de miRNAs diferentes dos miRNAs totais encontrados nas células. Além disso, a análise do perfil de miRNA revelou as principais diferenças entre os fenótipos M1 e M2. CHOO et al. (2018) confirmaram a repolarização de MATs em macrófagos M1 após tratamento com nanovesículas M1 para potencializar os efeitos de um anticorpo anti PD-1 em carcinoma

colorretal. Segundo os autores do trabalho, o perfil de miRNAs dos exossomos M1 propiciou a repolarização celular induzindo respostas imunes antitumorais em um microambiente tumoral. Para investigar os exomiRs de macrófagos M1 relacionados a efeitos antitumorais, no presente estudo, após validação dos miRNAs por qPCR, foi realizada a análise de possíveis alvos por bioinformática destacando-se três exomiRs, sobretudo o exomiR-29a-3p.

Sabendo que possuem atividade em centenas ou mesmo milhares de genes, e alguns funcionam de uma maneira específica em uma célula ou até mesmo em um órgão, os miRNAs estão provando ser candidatos terapeuticamente vantajosos pela capacidade de regular vias biológicas inteiras que são patologicamente interrompidas nos pacientes (HANNA et al., 2019). Entretanto, entender os mecanismos regulatórios dos miRNAs é um pré-requisito para o desenvolvimento e aplicação bem-sucedida de todas as terapias baseadas em RNA de interferência (RNAi) (WINTER et al., 2009). Segundo a literatura o aumento ou a diminuição da expressão do miR-20a-5p, miR-22-3p e miR-29a-3p podem estar relacionados com a progressão ou inibição tumoral, dependendo dos genes alvos e o tipo de tumor.

Entre os genes regulados, destacados no presente trabalho, foi encontrada a associação da alta expressão do miR-20 na inibição da proteína transmembrana 127 (*TMEM127*, do inglês *transmembrane protein 127*), ativando a proliferação celular e a produção de metástases em células de câncer de estômago. Já a diminuição da expressão do membro 21 da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (*TNFRSF21*, do inglês *tumor necrosis factor receptor superfamily member 21*), pelo aumento da expressão do miRNA, causou a migração e invasão em células humanas de carcinoma de células escamosas de cabeça pescoço (WU et al., 2018). A expressão do miR-20 também foi inversamente correlacionada ao inibidor 2 de melatopeptidase (*TIMP2*, do inglês *metallopeptidase inhibitor 2*) aumentando a invasividade das células-tronco de glioma (WANG et al., 2015). SYLVESTRE et al. (2007) categoriza o miR-20 como anti-apoptótico uma vez que regula o fator de transcrição *E2F1-3* em células humanas de câncer de próstata inibindo a apoptose. Esse miRNA também promoveu a proliferação celular em células de câncer de pulmão de células não pequenas via fator 3 anti-proliferação BTG (*BTG3*, do inglês *BTG anti-proliferation factor 3*) (PENG et al., 2019). Ao contrário, a alta expressão do miR-20a causou a diminuição da expressão do receptor 2 do fator de crescimento transformador beta (*TGFBR2*, do inglês *transforming growth factor beta receptor 2*) em células de câncer de

mama ocasionando a diminuição da invasão celular (DE et al., 2017). A alta expressão do miRNA também diminuiu a expressão do gene da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (*STAT3*, do inglês *signal transducer and activator of transcription 3*) em células de tumor de endométrio, suprimindo a invasão celular (HUANG; YANG, 2018).

Já para o miR-22, ambos, aumento ou diminuição da expressão do miRNA causam respectivamente a diminuição ou o aumento da expressão do gene histona desacetilase 4 (*HDAC4*, do inglês *histone deacetylase 4*). Consequentemente, as células de câncer de mama resistentes ao tratamento com fulvestrant, de qualquer maneira, são levadas a sensibilizar-se novamente ao fármaco (WANG, B. et al., 2018). Ainda sobre ressensibilizar células resistentes ao tratamento quimioterápico, o aumento da expressão do miR-22 aumenta a expressão de fosfatase homóloga à tensina (*PTEN*, do inglês *phosphatase and tensin homolog*) causando a ressensibilização das células de câncer de colorretal ao paclitaxel (LI et al., 2011). Da mesma maneira, aumenta a radiosensibilidade em células de câncer de mama por diminuir a expressão de sirtuina 1 (*SIRT1*) (ZHANG et al., 2017). Entretanto, no câncer de bexiga, o miR-22 promoveu quimiorresistência ao diminuir a expressão do gene transformador de célula neuroepitelial 1 (*NET1*, do inglês *neuroepithelial cell-transforming gene 1*) (XIAO et al., 2018).

Entre os miRNAs aqui selecionados, o miR-29a-3p apresentou mais associações com efeitos antitumorais do que os demais, sendo encontrados genes relacionados à regulação da proliferação celular, ciclo celular e apoptose. Adicionalmente, foram encontradas associações com alvos do microambiente tumoral que regulam a adesão da matriz extracelular e a resposta ao estímulo de citocinas, uma vez que a família miR-29 é descrita principalmente como uma família reguladora da expressão gênica (das células tumorais e também do estroma) relacionada à inibição da tumorigênese e da progressão tumoral (KWON et al., 2019). Assim, a literatura descreve diversas associações do miR-29 entre os principais genes encontrados no estudo, como no câncer de mama, a expressão diminuída do miRNA aumentou a expressão do gene fator 4 tipo kruppel (*KLF4*, do inglês *kruppel like factor 4*), ocasionando o crescimento do tumor em ensaios *in vivo* (CITTELLY et al., 2013). A inibição do gene da proteína secretada ácida e rica em cisteína (*SPARC*, do inglês *secreted protein acidic and cysteine rich*) pelo aumento da expressão de miR-29, em células humanas de carcinoma nasofaríngeo, causou a diminuição da invasão e migração celular (QIU et al., 2015). No câncer de estômago a expressão desse miRNA foi relacionada aos genes da família das ciclinas dependentes de

cinases (*CDK*, do inglês *cyclin dependent kinases*), causando a inibição da proliferação celular, migração e bloqueio de ciclo celular (ZHAO et al., 2015). O aumento da expressão do miR-29 causou a diminuição da expressão do receptor do fator de crescimento tipo insulina 1 (*IGFR1*, do inglês *insulin like growth factor 1 receptor*), em células de carcinoma hepatocelular, suprimindo a proliferação e a migração celular (WANG et al., 2017). O aumento da expressão do miRNA causou diminuição no gene *subunidade de integrina beta 1* (*ITGB1*, do inglês *integrin subunit beta 1*) no carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, diminuindo a agressividade celular (KOSHIZUKA et al., 2018). GONG et al. (2014) relatam a diminuição da expressão do gene ciclina D2 (*CCND2*), ocasionando uma parada no ciclo celular e como consequência o aumento da morte e a diminuição da proliferação celular em células de câncer gástrico. O miR-29 demonstrou também diminuir a proteína reguladora de apoptose MCL1 (*MCL1*), porém não o gene *MCL1* no estudo de MOTT et al. (2007), mesmo assim, a diminuição da proteína causou o aumento da apoptose em células de colangiocarcinoma. LIU et al. (2018) validaram a inibição da proliferação, migração e invasão celular pela regulação negativa do miR-29 no gene fator 4 associado ao receptor TNF (*TRAF4*, do inglês *TNF receptor associated factor 4*) em células de humanas de glioma.

A literatura ainda cita uma vasta lista de genes, não apontados no presente estudo, que também inibem a proliferação de células tumorais pelo aumento da expressão do miR-29, como exemplo da expressão do miRNA que foi negativamente relacionada ao gene proeminina 1 (*PROM1*) em células de laringocarcinoma, diminuindo a proliferação celular (SU et al., 2017). A expressão elevada do miR-29 também foi relacionada à inibição da proliferação, ativação da parada de ciclo celular na fase G0/G1 e apoptose no carcinoma colorretal, pela diminuição da expressão da proteína ribossomal S15A (*RPS15A*, do inglês *ribosomal protein S15A*) e no câncer de mama pela diminuição do proto-oncogene MYB tipo 2 (*MYBL2*, do inglês *MYB proto-oncogene like 2*) (WU et al., 2013; ZHENG et al., 2019).

Além da supressão tumoral relacionada diretamente aos genes das células tumorais, o miR-29 também regula genes envolvidos no sistema imunológico e na produção de matriz extracelular, podendo afetar o estroma do microambiente tumoral. A exemplo disso, TANG et al. (2017) observaram que macrófagos estimularam respostas pró-inflamatórias através da via serina/treonina cinase alfa e fator nuclear kappa B (*AKT1/NF- κ B*, do inglês *alpha serine/threonine-protein kinase e nuclear factor kappa B*) após a expressão aumentada do

miR-29 induzida por LPS. Ainda, CIECHOMSKA et al. (2014) demonstraram que a produção de colágeno foi suprimida, prevenindo a deposição de matriz extracelular quando a expressão do miR-29 foi aumentada em fibroblastos, pela inibição do gene colágeno tipo 1 alfa 1 (*COL1A1*) e do gene inibidor de metaloproteinases TIMP 1 (*TIMP-1*), via regulação positiva do gene metalopeptidase de matriz 1 (*MMP-1*). Diante dos resultados obtidos e das evidências encontradas na literatura aqui discutidas, fomos instigados a realizar a investigação dos efeitos antitumorais dos exossomos de macrófagos M1 no microambiente do melanoma.

Devido à capacidade de comunicação intracelular em entregar o conteúdo a alvos próximos ou a longas distâncias, os exossomos de células do sistema imune estão sendo estudados como agentes terapêuticos para o tratamento de câncer como carreadores do seu próprio conteúdo (principalmente miRNAs) ou de fármacos (BESSE et al., 2016; WANG, P. et al., 2019; WANG et al., 2020). A primeira imunoterapia dessa forma já testada em humanos, com um ensaio clínico fase II, utiliza exossomos derivados de células dendríticas (Dex). Segundo os pesquisadores que a desenvolveram, a terapia foi fabricada com o objetivo de aumentar as respostas imunes das células *natural killers* (NK) e dos linfócitos T em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas, como uma imunoterapia de manutenção após a quimioterapia de indução. Dos vinte e dois pacientes que receberam a terapia, sete apresentaram estabilização da doença sem progressão por mais de quatro meses (32%) e um paciente apresentou hepatotoxicidade. Sobretudo, os pesquisadores destacaram um aumento nas funções das células NK dependentes de proteína 30 (NKp30, do inglês *natural killer protein 30*) na grande maioria dos pacientes que apresentaram estabilização. Os autores concluíram que essa terapia pode representar uma imunoterapia baseada em células NK em pacientes com defeitos funcionais específicos da proteína NKp30 que ocorrem em alguns outros tipos de câncer, como tumores gastrointestinais, neuroblastoma e leucemia linfocítica crônica (BESSE et al., 2016).

No tratamento do melanoma maligno existem dois relatos na literatura utilizando Dex autólogos em ensaio clínico de fase I em 15 pacientes, sendo que um trabalho é complementado pelo outro (ESCUДИER et al., 2005; VIAUD et al., 2009). Ambas pesquisas demonstraram a estabilização da doença após quatro semanas de tratamento, em cerca de 50% dos pacientes (quinze ao total), em cujas amostras de sangue periférico foi observado que as funções efectoras das células NK estavam aumentadas.

Essa nova estratégia de imunoterapia contra o câncer parece ser mais vantajosa do que o uso de células imunes pois devido à composição lipídica, os exossomos são mais estáveis e resistentes, podem não responder à moléculas imunossupressoras e ainda a composição dos exossomos pode ser estritamente definida para cada paciente (PITT et al., 2016; SANTOS; ALMEIDA, 2021). Além disso, exossomos de células imunes exercem a atividade biológica das respectivas células originais, matando as células cancerígenas, sem causar graves efeitos adversos (HANEY et al., 2020). No entanto, há na literatura poucos estudos utilizando exossomos de macrófagos M1 como imunoterapia para o tratamento de câncer e por essa razão, decidiu-se investigar os possíveis efeitos antitumorais deste material no microambiente de melanoma relacionando-o ao perfil de expressão de miRNAs (CHENG et al., 2017; CHOO et al., 2018; WANG, P. et al., 2019).

Para avaliar os efeitos antitumorais dos exossomos M1, foi utilizado o modelo de microambiente de melanoma 3D (esferoide) desenvolvido anteriormente no laboratório (SALEH et al., 2021). Esse modelo 3D, utiliza não somente células tumorais, mas também células estromais, como macrófagos M2 e fibroblastos. Assim, além de ser mais representativo do microambiente tumoral (PINTO et al., 2020), é também um modelo para melhor avaliar o comportamento responsivo à novas terapias, devido a formação de uma estrutura de matriz extracelular a base de colágeno que o envolve. Além da presença de células proliferativas na região periférica com o núcleo necrótico, assemelhando-se ao ambiente *in vivo* (CHAROEN et al., 2014).

No ensaio de triagem, foi demonstrada uma relação indireta entre a viabilidade celular dos esferoides e as concentrações crescentes de exossomos, entretanto, a viabilidade celular permaneceu constante com altas concentrações, evidenciando baixa citotoxicidade. A não alteração na viabilidade das células tumorais após a incubação com exossomos M1 também foi observada por CHENG et al. (2017) e CHOO et al. (2018). Contudo, CHENG et al. (2017) demonstraram que os exossomos de macrófagos M1 quando em combinação com uma vacina peptídica, desenvolvida pelo próprio grupo, exibiu efeitos antitumorais no melanoma, como a diminuição da viabilidade celular, melhores em comparação à terapia utilizando apenas os exossomos. Os pesquisadores alegaram que os exossomos M1 podem servir como agentes que estimulam um microambiente tumoral pró-inflamatório, o que torna o sistema imunológico mais sensível às vacinas contra o câncer, induzindo assim um efeito

antitumoral superior. Eles finalizam concluindo que os resultados obtidos na pesquisa indicam fortemente que os exossomos de macrófagos M1 consistem em um adjuvante imunológico promissor, adequado para a utilização em vacinas contra o câncer. Essa não alteração na viabilidade celular parece ser uma característica específica dos exossomos de macrófagos M1, pois foi descrito que os exossomos derivados de células NK e dendríticas são altamente citotóxicos para células tumorais (BU et al., 2011; LAURA et al., 2020). Uma explicação seria a não expressão do ligante Fas (FasL, do inglês *fas ligand*) pelos macrófagos (WANG, G. et al., 2019), uma vez que os exossomos liberados pelas células NK podem expressar FasL na membrana e exercer forte citotoxicidade contra células tumorais Fas⁺ causando a morte celular por apoptose (LUGINI et al., 2012; ZHU et al., 2017). Além disso, CHOO et al. (2018) demonstram em ensaios *in vivo* uma considerável morte celular devido a repolarização do macrófago M2 para M1 com a utilização dos exossomos M1.

No entanto, no presente trabalho, foi possível observar uma redução expressiva do volume dos esferoides após 3 dias de incubação com exossomos M1, provavelmente devido à supressão do crescimento tumoral observada pela redução da proliferação celular. Após vinte e sete dias de tratamento com exossomos M1, WANG, P. et al. (2019) observaram um volume tumoral reduzido, em mais de 50%, de câncer de mama em ensaio *in vivo*. Essa redução foi ainda mais significativa, quando associada ao paclitaxel, mostrando que os exossomos de macrófagos M1 também podem potencializar os efeitos das terapias atuais. Esse grupo ainda evidenciou um possível mecanismo de ação dos exossomos M1, ativando a via NF-kB, liberando citocinas pró-inflamatórias e ativando a via da caspase-3, aumentando assim a apoptose. Os estudos até aqui demonstram que as formulações baseadas na utilização de exossomos possuem potencial para uma terapia antitumoral eficiente (HANEY et al., 2020).

Por fim, para investigar e então confirmar a hipótese de que um dos responsáveis pela função antiproliferativa era o exo-miR-29a-3p, como observado nos resultados de bioinformática, esse miRNA foi transfectado em células de melanoma humano (SK-MEL-28). Inicialmente, na etapa de seleção das condições ideais para a transfecção, a *Lipofectamine*TM demonstrou considerável citotoxicidade a partir de 48 h. Embora no estudo de WANG, T. et al. (2018) esse reagente de transfecção foi o menos citotóxico para diversos tipos de células testadas, o estudo relata que alterações no tipo de célula, composição do material genético e diferenças na composição do reagente de transfecção podem estar associadas à citotoxicidade celular. Entretanto esse estudo não testou a linhagem celular utilizada no presente trabalho.

Outra particularidade do atual trabalho foi a diminuição da expressão relativa do mimético-hsa-miR-29a-3p em maior concentração (100 nM). Uma explicação para esse fato é que o uso do mimético em doses inadequadas pode causar a morte celular e assim a degradação do material genético (JIN et al., 2015).

Neste trabalho, o miR-29a-3p apresentou baixa expressão em células de melanoma não transfectadas e a alta expressão após a transfecção indicou uma associação com a diminuição da proliferação celular. O mesmo foi observado no estudo de VERA et al. (2021), que identificou inclusive a baixa expressão desse miRNA na mesma linhagem do presente trabalho (SK-MEL-28). Dados de BROSEGHINI et al. (2021) também mostram uma regulação negativa de miR-29a-3p em amostras de melanoma de 20 pacientes, em comparação com pacientes com nevo inicial. A expressão do miRNA mostrou-se dez vezes maior no nevo inicial em relação a expressão das amostras dos pacientes com melanoma.

A inibição da proliferação celular no melanoma é uma forte característica correlacionada à alta expressão do miR-29a. Usando células humanas de melanoma, XIONG et al. (2018) demonstraram que a alta expressão do miR-29a suprimiu o crescimento, a migração, invasão celular e aumentou a apoptose devido a regulação negativa do proto-oncogene *BMII*. Da mesma forma, VERA et al. (2021) relataram nove genes com baixa expressão, quando foi utilizado o mimético-hsa-miR-29a-3p em células humanas de melanoma. Porém após o silenciamento de todos os nove genes, foi possível observar que apenas dois causaram a diminuição da proliferação no ensaio funcional clonogênico realizado, o fator de transcrição *G MAF BZIP* (*MAFG*, do inglês *MAF BZIP transcription factor G*), nunca relatado anteriormente, e o *MYBL2*. Assim, eles confirmaram que a alta expressão do miR-29a regula negativamente os genes *MAFG* e *MYBL2* e essa interação diminui a proliferação celular. SCHMITT et al. (2012), pela primeira vez, confirmaram a relação do interferon- γ (IFN- γ) e a alta expressão da família miR-29 via transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (*STAT1*, do inglês *signal transducer and activator of transcription 1*) resultando na regulação negativa de *CDK6* e com isso ocorrendo a parada de ciclo celular na fase G1/S. Apesar de não ter sido observada diferença significativa na parada do ciclo celular no atual trabalho, provavelmente devido à limitação do tempo do ensaio ser em 24 horas, foi possível observar uma propensão de parada em G0/G1. De qualquer maneira, a diminuição da proliferação celular aqui observada, usando um ensaio como o EdU, consiste em uma forte

evidência, já que se trata de uma medida direta durante a síntese de DNA ativo (SALIC; MITCHISON, 2008).

Embora o surgimento da terapêutica de miRNA ainda não se traduziu em candidatos aprovados pelas agências regulamentadoras para a utilização em doenças como o câncer por exemplo, as possíveis terapias estão em fase de desenvolvimento e já se encontram em ensaios clínicos de fase II. O exemplo mais interessante é o da tecnologia denominada “TargomiR”, a qual apresentou resultados encorajadores em pacientes com mesotelioma pleural maligno recorrente ou câncer de pulmão de células não pequenas. Essa tecnologia usa um mimético de miR-16, minicélulas derivadas de bactérias, como transportadores, além de um anticorpo específico que reconhece uma proteína nas células alvo. No ensaio clínico, o MesomiR-1, tinha como alvo o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) que é consistentemente desregulado em células de câncer de pulmão e apresentou um resultado de 65% de controle da doença. Agora os ensaios avançam para a fase II (REID et al., 2016).

O número de tratamentos eficazes para pacientes com melanoma metastático tem aumentado rapidamente nos últimos anos. Nesse cenário, as combinações de imunoterapia com terapia direcionada têm grande expectativa. Esses *insights* permitirão que a próxima geração de abordagens à imunoterapia sejam adaptadas às características genômicas específicas do melanoma e às características do microambiente tumoral (LEONARDI et al., 2020). Assim, o presente trabalho demonstrou que exossomos e exomiRs apresentaram resultados satisfatórios frente a uma modelo de câncer tridimensional e esta abordagem fornece uma ferramenta inovadora e valiosa para aplicações em oncologia clínica, como uma nova estratégia terapêutica para melanoma.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho identificou diferenças entre os perfis de expressão de miRNAs de exossomos de macrófagos M1 e M2, detectando um efeito antitumoral de exossomos de macrófagos M1, os quais reduziram a proliferação celular em um modelo 3D de microambiente de melanoma murino. Também foi encontrada uma relação entre a alta expressão de miR-29a-3p e a redução da expressão de alvos previstos relacionados à proliferação celular. Essas descobertas foram validadas pela observação da diminuição na proliferação celular após a transfecção do mimético de miR-29a-3p em células de melanoma humano.

8 PERSPECTIVAS

- Validar a regulação entre miRNA-mRNA dos genes identificados na análise de bioinformática;
- Realizar experimentos *in vivo* para análise dos efeitos antiproliferativos dos exossomos M1 e do exo-miR-29a;
- Desenvolver estratégias farmacêuticas para melhorar a aplicação dos exossomos M1 e do exo-miR-29a como terapia anti-melanoma.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, V.; BELL, G. W.; NAM, J. W.; BARTEL, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **eLife**, v. 4, n. AUGUST2015, p. 1–38, 2015.

AMARAL, A. E. DO; CISILOTTO, J.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; LUCCA SCHIAVON, L. DE. Circulating miRNAs in nontumoral liver diseases. **Pharmacological Research**, v. 128, p. 274–287, 2018.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 23, p. 5591–5596, 2012.

BANDARCHI, B.; JABBARI, C. A.; VEDADI, A.; NAVAB, R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. **Journal of clinical pathology**, v. 66, n. 8, p. 644–8, 2013.

BESSE, B.; CHARRIER, M.; LAPIERRE, V.; et al. Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. **OncoImmunology**, v. 5, n. 4, p. 1–13, 2016.

BHATIA, S.; TYKODI, S. S.; THOMPSON, J. A. Treatment of metastatic melanoma: an overview. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 23, n. 6, p. 488–96, 2009.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. **Polarized Activation of Macrophages**. 2014.

BOYCE, S. T. Design principles for composition and performance of cultured skin substitutes. **Burns**, v. 27, n. 5, p. 523–533, 2001.

BROSEGHINI, E.; DIKA, E.; LONDIN, E.; FERRACIN, M. Micorna isoforms contribution to melanoma pathogenesis. **Non-coding RNA**, v. 7, n. 4, p. 1–27, 2021.

BRYCHTOVA, S.; BEZDEKOVA, M.; HIRNAK, J.; et al. **Stromal Microenvironment Alterations in Malignant Melanoma, Research on Melanoma - A Glimpse into Current Directions and Future Trends, Prof. Mandi Murph (Ed.)**. 2011.

BU, N.; WU, H.; SUN, B.; et al. Exosome-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8 + cytotoxic T cells in patients with glioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 104, n. 3, p. 659–667, 2011.

CAMMAERTS, S.; STRAZISAR, M.; RIJK, P. DE; FAVERO, J. DEL. Genetic variants in microRNA genes: Impact on microRNA expression, function, and disease. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 1–12, 2015.

CARREAU, N.; PAVLICK, A. Revolutionizing treatment of advanced melanoma with immunotherapy. **Surgical Oncology**, , n. January, p. 0–1, 2019.

CENDROWICZ, E.; SAS, Z.; BREMER, E.; RYGIEL, T. P. The role of macrophages in cancer development and therapy. **Cancers**, v. 13, n. 8, p. 1–22, 2021.

CHAROEN, K. M.; FALLICA, B.; COLSON, Y. L.; ZAMAN, M. H.; GRINSTAFF, M. W. Embedded multicellular spheroids as a biomimetic 3D cancer model for evaluating drug and drug-device combinations. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2264–2271, 2014.

CHEN, P.; HUANG, Y.; BONG, R.; et al. Tumor-Associated Macrophages Promote Angiogenesis and Melanoma Growth via Adrenomedullin in a Paracrine and Autocrine Manner. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 23, p. 7230–7239, 2011.

CHEN, Y.; WANG, X. MiRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D127–D131, 2020.

CHENG, L.; WANG, Y.; HUANG, L. Exosomes from M1-Polarized Macrophages Potentiate the Cancer Vaccine by Creating a Pro-inflammatory Microenvironment in the Lymph Node. **Molecular Therapy**, v. 25, n. 7, p. 1–11, 2017.

CHIN, L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 8, p. 559–570, 2003.

CHIN, L.; GARRAWAY, L. A.; FISHER, D. E. Malignant melanoma: Genetics and therapeutics in the genomic era. **Genes and Development**, v. 20, n. 16, p. 2149–2182, 2006.

CHOO, Y. W.; KANG, M.; KIM, H. Y.; et al. M1 Macrophage-Derived Nanovesicles Potentiate the Anticancer Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors. **ACS Nano**, v. 12, n. 9, p. 8977–8993, 2018.

CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P. A.; ADAMS, A. E.; et al. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics Find the latest version: Science in medicine Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 4, p. 813–824, 2005.

CIECHOMSKA, M.; O'REILLY, S.; SUWARA, M.; BOGUNIA-KUBIK, K.; LAAR, J. M. VAN. MiR-29a reduces TIMP-1 production by dermal fibroblasts via targeting TGF- β activated kinase 1 binding protein 1, implications for systemic sclerosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–18, 2014.

CITTELLY, D. M.; FINLAY-SCHULTZ, J.; HOWE, E. N.; et al. Progesterin suppression of miR-29 potentiates dedifferentiation of breast cancer cells via KLF4. **Oncogene**, v. 32, n. 20, p. 2555–2564, 2013.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 255–289, 2014.

CORNIL, I.; THEODORESCU, D.; MAN, S.; et al. Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression

(metastasis/growth factors/tumor-host relationship). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. July, p. 6028–6032, 1991.

CURTI, B. D.; FARIES, M. B. Recent advances in the treatment of melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 23, p. 2229–2240, 2021.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.

DAVIDSON, S. M.; TAKOV, K.; YELLON, D. M. Exosomes and Cardiovascular Protection. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 31, n. 1, p. 77–86, 2017.

DE, S.; DAS, SAYANTANI; MUKHERJEE, S.; DAS, SAINY; SENGUPTA (BANDYOPADHYAY), S. Establishment of twist-1 and TGFBR2 as direct targets of microRNA-20a in mesenchymal to epithelial transition of breast cancer cell-line MDA-MB-231. **Experimental Cell Research**, v. 361, n. 1, p. 85–92, 2017.

DEXHEIMER, P. J.; COCHELLA, L. MicroRNAs: From Mechanism to Organism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. June, p. 1–18, 2020.

DILSIZ, N. Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer. **Future Science OA**, v. 6, n. 4, p. 1–15, 2020.

DOMINGUES, B.; LOPES, J.; SOARES, P.; POPULO, H. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 7, p. 35–49, 2018.

EDGAR, J. R. What are exosomes, exactly? **BMC Biology**, v. 14, n. 1, p. 46, 2016.

ENDERLE, D.; SPIEL, A.; COTICCHIA, C. M.; et al. Characterization of RNA from exosomes and other extracellular vesicles isolated by a novel spin column-based method. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–19, 2015.

ESCUDIER, B.; DORVAL, T.; CHAPUT, N.; et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: Results of the first phase 1 clinical trial. **Journal of Translational Medicine**, v. 3, p. 1–13, 2005.

FRIEDRICH, J.; EDER, W.; CASTANEDA, J.; et al. A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the Acid phosphatase assay. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 12, n. 7, p. 925–937, 2007.

GARZETTI, L.; MENON, R.; FINARDI, A.; et al. Activated macrophages release microvesicles containing polarized M1 or M2 mRNAs. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 5, p. 817–825, 2014.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 21–37, 2019.

GEHRMANN, U.; NÄSLUND, T. I.; HILTBRUNNER, S.; LARSEN, P.; GABRIELSSON, S. Harnessing the exosome-induced immune response for cancer immunotherapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 28, n. 1, p. 58–67, 2014.

GONG, J.; LI, J.; WANG, YI; et al. Characterization of microRNA-29 family expression and investigation of their mechanistic roles in gastric cancer. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 2, p. 497–506, 2014.

GORDON, R. Skin cancer: An overview of epidemiology and risk factors. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 29, n. 3, p. 160–169, 2013.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.

GREENING, D. W.; GOPAL, S. K.; XU, R.; SIMPSON, R. J.; CHEN, W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 40, p. 72–81, 2015.

GURUNATHAN, S.; KANG, M.-H.; JEYARAJ, M.; QASIM, M.; KIM, J.-H. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 307, 2019.

HAASE-KOHN, C.; WOLF, S.; HERWIG, N.; MOSCH, B.; PIETZSCH, J. Metastatic potential of B16-F10 melanoma cells is enhanced by extracellular S100A4 derived from RAW264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 1, p. 143–148, 2014.

HANEY, M. J.; ZHAO, Y.; JIN, Y. S.; et al. Macrophage-Derived Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems for Triple Negative Breast Cancer (TNBC) Therapy. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 487–500, 2020.

HANNA, J.; HOSSAIN, G. S.; KOCERHA, J. The potential for microRNA therapeutics and clinical research. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. 478, p. 1–6, 2019.

HAO, N. B.; LÜ, M. H.; FAN, Y. H.; et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.

HE, M.; CROW, J.; ROTH, M.; ZENG, Y.; GODWIN, A. K. Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. **Lab on a Chip**, v. 14, n. 19, p. 3773–3780, 2014.

HEINEMANN, M. L.; ILMER, M.; SILVA, L. P.; et al. Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration. **Journal of Chromatography A**, v. 1371, p. 125–135, 2014.

HUANG, H. Y.; LIN, Y. C. D.; LI, J.; et al. MiRTarBase 2020: Updates to the

experimentally validated microRNA-target interaction database. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D148–D154, 2020.

HUANG, Y.; YANG, N. MicroRNA-20a-5p inhibits epithelial to mesenchymal transition and invasion of endometrial cancer cells by targeting STAT3. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 11, n. 12, p. 5715–5724, 2018.

HUSSEIN, M. R. Tumour-associated macrophages and melanoma tumourigenesis: integrating the complexity. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 87, n. 3, p. 163–176, 2006.

INCA – **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2021/index.asp?ID=2> >. Acesso em 02 de janeiro de 2022.

ISMAIL, N.; WANG, Y.; DAKHLALLAH, D.; et al. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. **Blood**, v. 121, n. 6, p. 984–995, 2013.

JEONG, S. Y.; LEE, J. H.; SHIN, Y.; CHUNG, S.; KUH, H. J. Co-culture of tumor spheroids and fibroblasts in a collagen matrix-incorporated microfluidic chip mimics reciprocal activation in solid tumor microenvironment. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–17, 2016.

JIN, H. Y.; GONZALEZ-MARTIN, A.; MILETIC, A. V.; et al. Transfection of microRNA mimics should be used with caution. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. DEC, p. 1–23, 2015.

JOHNSTONE, R. .; BIANCHINI, A.; TENG, K. Reticulocyte Maturation and Exosomes Release: Transferrin Receptor Containing Exosomes Shows Multiple Plasma Membrane Functions. **Blood**, v. 74, n. 5, p. 1844–1851, 1989.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392–401, 2006.

KOSHIZUKA, K.; KIKKAWA, N.; HANAZAWA, T.; et al. Inhibition of integrin β 1-mediated oncogenic signalling by the antitumor microRNA-29 family in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 9, n. 3, p. 3663–3676, 2018.

KWON, J. J.; FACTORA, T. D.; DEY, S.; KOTA, J. A Systematic Review of miR-29 in Cancer. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 12, p. 173–194, 2019.

LAURA, A.; PACE, D.; TUMINO, N.; et al. Characterization of Human NK Cell-Derived Exosomes: Role of DNAM1 Receptor in Exosome-Mediated Cytotoxicity against Tumor. **Cancers**, v. 12, n. 661, p. 1–16, 2020.

LEONARDI, G. C.; CANDIDO, S.; FALZONE, L.; SPANDIDOS, D. A.; LIBRA, M. Cutaneous melanoma and the immunotherapy revolution (Review). **International**

Journal of Oncology, v. 57, n. 3, p. 609–618, 2020.

LEWIS, C. E.; POLLARD, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 605–612, 2006.

LI, J.; ZHANG, Y.; ZHAO, J.; KONG, F.; CHEN, Y. Overexpression of miR-22 reverses paclitaxel-induced chemoresistance through activation of PTEN signaling in p53-mutated colon cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 357, n. 1–2, p. 31–38, 2011.

LI, P.; KASLAN, M.; LEE, S. H.; YAO, J.; GAO, Z. Progress in exosome isolation techniques. **Theranostics**, v. 7, n. 3, p. 789–804, 2017.

LINDENBERGH, M. F. S.; KOERHUIS, D. G. J.; BORG, E. G. F.; et al. Bystander T-cells support clonal T-cell activation by controlling the release of dendritic cell-derived immune-stimulatory extracellular vesicles. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAR, p. 1–11, 2019.

LIU, C.; SU, C. Design strategies and application progress of therapeutic exosomes. **Theranostics**, v. 9, n. 4, p. 1015–1028, 2019.

LIU, Y.; DUAN, N.; DUAN, S. MiR-29a Inhibits Glioma Tumorigenesis through a Negative Feedback Loop of TRAF4/Akt Signaling. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–8, 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LÖTVALL, J.; HILL, A. F.; HOCHBERG, F.; et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 1–6, 2014.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, L.A.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LUGINI, L.; CECCHETTI, S.; HUBER, V.; et al. Immune Surveillance Properties of Human NK Cell-Derived Exosomes. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2833–2842, 2012.

MACFARLANE, L.-A.; R. MURPHY, P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. **Current Genomics**, v. 11, n. 7, p. 537–561, 2010.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–555, 2002.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human molecular genetics**, v. 15, n. 1, p. 17–29, 2006.

MAVERAKIS, E.; CORNELIUS, L. A.; BOWEN, G. M.; et al. Metastatic melanoma – A review of current and future treatment options. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 95, n. 5, p. 516–524, 2015.

MCDONALD, M. K.; TIAN, Y.; QURESHI, R. A.; et al. Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain. **Pain**, v. 155, n. 8, p. 1527–1539, 2014.

MEDINA, P. P.; SLACK, F. J. MicroRNAs and cancer : An overview. **Cell Cycle**, v. 7, n. 16, p. 2485–2492, 2008.

MI, H.; MURUGANUJAN, A.; EBERT, D.; HUANG, X.; THOMAS, P. D. PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D419–D426, 2019.

MICHIELIN, O.; ATKINS, M. B.; KOON, H. B.; DUMMER, R.; ASCIERTO, P. A. Evolving impact of long-Term survival results on metastatic melanoma treatment. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 8, n. 2, p. 1–13, 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of Murine Macrophages. **Current Protocols in Immunology**, p. 14.2.1-14.2.8, 2008.

MOTT, J. L.; KOBAYASHI, S.; BRONK, S. F.; GORES, G. J. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. **Oncogene**, v. 26, n. 42, p. 6133–6140, 2007.

NATASHA G; GUNDOGAN, B.; TAN, A.; et al. Exosomes as immunotheranostic nanoparticles. **Clinical therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 820–829, 2014.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 49–61, 2014.

ORECCHIONI, M.; GHOSHEH, Y.; PRAMOD, A. B.; LEY, K. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 1084, p. 1–14, 2019.

PAN, B. T.; JOHNSTONE, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. **Cell**, v. 33, n. 3, p. 967–978, 1983.

PANNI, R. Z.; LINEHAN, D. C.; DENARDO, D. G. Targeting tumor-infiltrating macrophages to combat cancer. **Immunotherapy**, v. 5, n. 10, p. 1075–1087, 2013.

PENG, L.; LI, S.; LI, Y.; et al. Regulation of BTG3 by microRNA-20b-5p in non-small cell lung cancer. **Oncology Letters**, v. 18, n. 1, p. 137–144, 2019.

PEPPICELLI, S.; BIANCHINI, F.; CALORINI, L. Inflammatory cytokines induce vascular endothelial growth factor- C expression in melanoma- associated macrophages and stimulate melanoma lymph node metastasis. **Oncology Letters**, p. 1133–1138, 2014.

PINTO, B.; HENRIQUES, A. C.; SILVA, P. M. A.; BOUSBAA, H. Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1186, p. 1–38, 2020.

PITT, J. M.; ANDRÉ, F.; AMIGORENA, S.; SORIA, J.; EGGERMONT, A. Dendritic cell – derived exosomes for cancer therapy. **Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 4, p. 1224–1232, 2016.

PRIGOL, A. N.; RODE, M. P.; SILVA, A. H.; CISILOTTO, J.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Pro-angiogenic effect of PC-3 exosomes in endothelial cells in vitro. **Cellular Signalling**, v. 87, n. August, p. 110126, 2021.

QIU, F.; SUN, R.; DENG, N.; et al. MiR-29a/b enhances cell migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma progression by regulating SPARC and COL3A1 gene expression. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–22, 2015.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

REID, G.; KAO, S. C.; PAVLAKIS, N.; et al. Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer. **Epigenomics**, v. 8, n. 8, p. 1079–1085, 2016.

RIGEL, D. S.; CARUCCI, J. A. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 50, n. 4, p. 215–36; quiz 237–40, 2000.

RODE, M. P.; SILVA, A. H.; CISILOTTO, J.; ROSOLEN, D.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. miR-425-5p as an exosomal biomarker for metastatic prostate cancer. **Cellular Signalling**, v. 87, n. June, 2021.

ROMA-RODRIGUES, C.; FERNANDES, A. R.; BAPTISTA, P. V. Exosome in tumour microenvironment: Overview of the crosstalk between normal and cancer cells. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ROTHERMEL, L. D.; SARNAIK, A. A.; KHUSHALANI, N. I.; SONDAK, V. K. Current Immunotherapy Practices in Melanoma. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 28, p. 403–418, 2019.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 3, p. 203–221, 2017.

SAINI, V.; DAWAR, R.; SUNEJA, S.; GANGOPADHYAY, S.; KAUR, C. Can microRNA become next-generation tools in molecular diagnostics and therapeutics? A systematic review. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2021.

SALEH, N. A.; RODE, M. P.; SIERRA, J. A.; et al. Three-dimensional multicellular cell culture for anti-melanoma drug screening: focus on tumor microenvironment. **Cytotechnology**, v. 73, n. 1, p. 35–48, 2021.

SALIC, A.; MITCHISON, T. J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7, p. 2415–20, 2008.

SANDRU, A.; VOINEA, S.; PANAITESCU, E.; BLIDARU, A. Survival rates of patients with malignant melanoma. **Journal of Medicine and Life**, v. 7, n. 4, p. 31–35, 2014.

SANTOS, P.; ALMEIDA, F. Exosome-Based Vaccines: History, Current State, and Clinical Trials. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 711565, p. 1–15, 2021.

SCHMITT, M. J.; PHILIPPIDOU, D.; REINSBACH, S. E.; et al. Interferon- γ -induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) up-regulates the tumor suppressing microRNA-29 family in melanoma cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 10, p. 1–14, 2012.

SETH, R.; MESSERSMITH, H.; KAUR, V.; et al. Systemic therapy for melanoma: ASCO guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 33, p. 3947–3970, 2020.

SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 8–42, 2015.

SIMONS, M.; RAPOSO, G. Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 575–581, 2009.

SMALLEY, K. S. M.; LIONI, M.; HERLYN, M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. **In vitro cellular & developmental biology. Animal**, v. 42, n. 8–9, p. 242–247, 2006.

SU, J.; LU, E.; LU, L.; ZHANG, C. MiR-29a-3p suppresses cell proliferation in

laryngocarcinoma by targeting prominin 1. **FEBS Open Bio**, v. 7, n. 5, p. 645–651, 2017.

SU, M.-J.; ALDAWSARI, H.; AMIJI, M. Pancreatic Cancer Cell Exosome-Mediated Macrophage Reprogramming and the Role of MicroRNAs 155 and 125b2 Transfection using Nanoparticle Delivery Systems. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30110, 2016.

SULLIVAN, R. J.; LORUSSO, P. M.; FLAHERTY, K. T. The intersection of immune-directed and molecularly targeted therapy in advanced melanoma: Where we have been, are, and will be. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 19, p. 5283–5291, 2013.

SYLVESTRE, Y.; GUIRE, V. DE; QUERIDO, E.; et al. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 4, p. 2135–2143, 2007.

TALUKDAR, S.; MANDAL, M.; HUTMACHER, D. W.; et al. Engineered silk fibroin protein 3D matrices for in vitro tumor model. **Biomaterials**, v. 32, n. 8, p. 2149–2159, 2011.

TANG, B.; LI, X.; REN, Y.; et al. MicroRNA-29a regulates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in murine macrophages through the Akt1/ NF- κ B pathway. **Experimental Cell Research**, v. 360, n. 2, p. 74–80, 2017.

TANG, Y. T.; HUANG, Y. Y.; LI, J. H.; et al. Alterations in exosomal miRNA profile upon epithelial-mesenchymal transition in human lung cancer cell lines. **BMC genomics**, v. 19, n. 802, p. 1–14, 2018.

THAM, M.; TAN, K. W.; KEEBLE, J.; et al. Melanoma-initiating cells exploit M2 macrophage TGF β and arginase pathway for survival and proliferation. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, p. 12027–42, 2014.

THÉRY, C.; ALED, C.; AMIGORENA, S.; RAPOSO, G. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, p. 1–29, 2006.

THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 8, p. 569–579, 2002.

TIAGO, M.; OLIVEIRA, E. M. DE; BROHEM, C. A.; et al. Fibroblasts protect melanoma cells from the cytotoxic effects of doxorubicin. **Tissue engineering. Part A**, v. 20, n. 17–18, p. 2412–21, 2014.

TICKNER, J. A.; URQUHART, A. J.; STEPHENSON, S.-A.; RICHARD, D. J.; O'BYRNE, K. J. Functions and Therapeutic Roles of Exosomes in Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. May, p. 2–9, 2014.

TRAMS, E. G.; LAUTER, C. J.; NORMAN SALEM, J.; HEINE, U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. **BBA - Biomembranes**, v. 645, n. 1, p. 63–70, 1981.

TRAVÉS, P. G.; LUQUE, A.; HORTELANO, S. Macrophages, Inflammation, and Tumor Suppressors: ARF, a New Player in the Game. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

TREDAN, O.; GALMARINI, C. M.; PATEL, K.; TANNOCK, I. F. Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 19, p. 1441–1454, 2007.

VADER, P.; BREAKFIELD, X. O.; WOOD, M. J. A. Extracellular vesicles: Emerging targets for cancer therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 7, p. 385–393, 2014.

VASAIKAR, S. V.; STRAUB, P.; WANG, J.; ZHANG, B. LinkedOmics: Analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D956–D963, 2018.

VERA, O.; BOK, I.; JASANI, N.; et al. A MAPK/miR-29 axis suppresses melanoma by targeting MAFG and MYBL2. **Cancers**, v. 13, n. 6, p. 1–18, 2021.

VIAUD, S.; TERME, M.; FLAMENT, C.; et al. Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: A role for NKG2D ligands and IL-15R α . **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, p. 1–13, 2009.

VOGEL, D. Y. S.; GLIM, J. E.; STAVENUITER, A. W. D.; et al. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. **Immunobiology**, v. 219, n. 9, p. 695–703, 2014.

WANG, B.; LI, D.; FILKOWSKI, J.; et al. A dual role of miR-22 modulated by RelA/p65 in resensitizing fulvestrant-resistant breast cancer cells to fulvestrant by targeting FOXP1 and HDAC4 and constitutive acetylation of p53 at Lys382. **Oncogenesis**, v. 7, n. 54, p. 1–14, 2018.

WANG, G.; JIN, S.; LING, X.; et al. Proteomic Profiling of LPS-Induced Macrophage-Derived Exosomes Indicates Their Involvement in Acute Liver Injury. **Proteomics**, v. 19, n. 3, p. 1–11, 2019.

WANG, P.; WANG, H.; HUANG, Q.; et al. Exosomes from M1-polarized macrophages enhance paclitaxel antitumor activity by activating macrophage-mediated inflammation. **Theranostics**, v. 9, n. 6, p. 1714–1727, 2019.

WANG, T.; LARCHER, L. M.; MA, L.; VEEDU, R. N. Systematic screening of commonly used commercial transfection reagents towards efficient transfection of single-stranded oligonucleotides. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 1–15, 2018.

WANG, X.; LIU, S.; CAO, L.; et al. miR-29a-3p suppresses cell proliferation and

migration by downregulating IGF1R in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 49, p. 86592–86603, 2017.

WANG, Y.; ZHAO, M.; LIU, S.; et al. Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 10, 2020.

WANG, Z.; WANG, B.; SHI, Y.; et al. Oncogenic miR-20a and miR-106a enhance the invasiveness of human glioma stem cells by directly targeting TIMP-2. **Oncogene**, v. 34, n. 11, p. 1407–1419, 2015.

WEAGEL, E.; SMITH, C.; LIU, P. G.; ROBISON, R.; O'NEILL, K. Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 6, n. 4, p. 1–8, 2015.

WHO – **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>>. Acesso em 02 de janeiro de 2022.

WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R. I.; DIEDERICHS, S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 228–234, 2009.

WU, H.; PANG, P.; LIU, M. DA; et al. Upregulated miR-20a-5p expression promotes proliferation and invasion of head and neck squamous cell carcinoma cells by targeting of TNFRSF21. **Oncology Reports**, v. 40, n. 2, p. 1138–1146, 2018.

WU, Z.; HUANG, XIAONA; HUANG, XING; ZOU, Q.; GUO, Y. The inhibitory role of Mir-29 in growth of breast cancer cells. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 32, n. 1, p. 1–7, 2013.

XIA, Y.; RAO, L.; YAO, H.; et al. Engineering Macrophages for Cancer Immunotherapy and Drug Delivery. **Advanced Materials**, v. 32, n. 40, p. 1–20, 2020.

XIAO, J.; NIU, S.; ZHU, J.; et al. miR-22-3p enhances multi-chemoresistance by targeting NET1 in bladder cancer cells. **Oncology Reports**, v. 39, n. 6, p. 2731–2740, 2018.

XIONG, Y.; LIU, LIQIAN; QIU, Y.; LIU, LILI. MicroRNA-29a Inhibits Growth, Migration and Invasion of Melanoma A375 Cells in Vitro by Directly Targeting BMI1. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 332–341, 2018.

YANG, T. T.; SINAI, P.; KAIN, S. R. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. **Analytical biochemistry**, v. 241, n. 1, p. 103–8, 1996.

ZHANG, J.; LI, S.; LI, L.; et al. Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 13, p. 17–24, 2015.

ZHANG, X.; LI, Y.; WANG, D.; WEI, X. miR-22 suppresses tumorigenesis and

improves radiosensitivity of breast cancer cells by targeting Sirt1. **Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 1–10, 2017.

ZHANG, Y.; BI, J.; HUANG, J.; et al. Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 6917–6934, 2020.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; LIU, H.; TANG, W. H. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. **Cell and Bioscience**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2019.

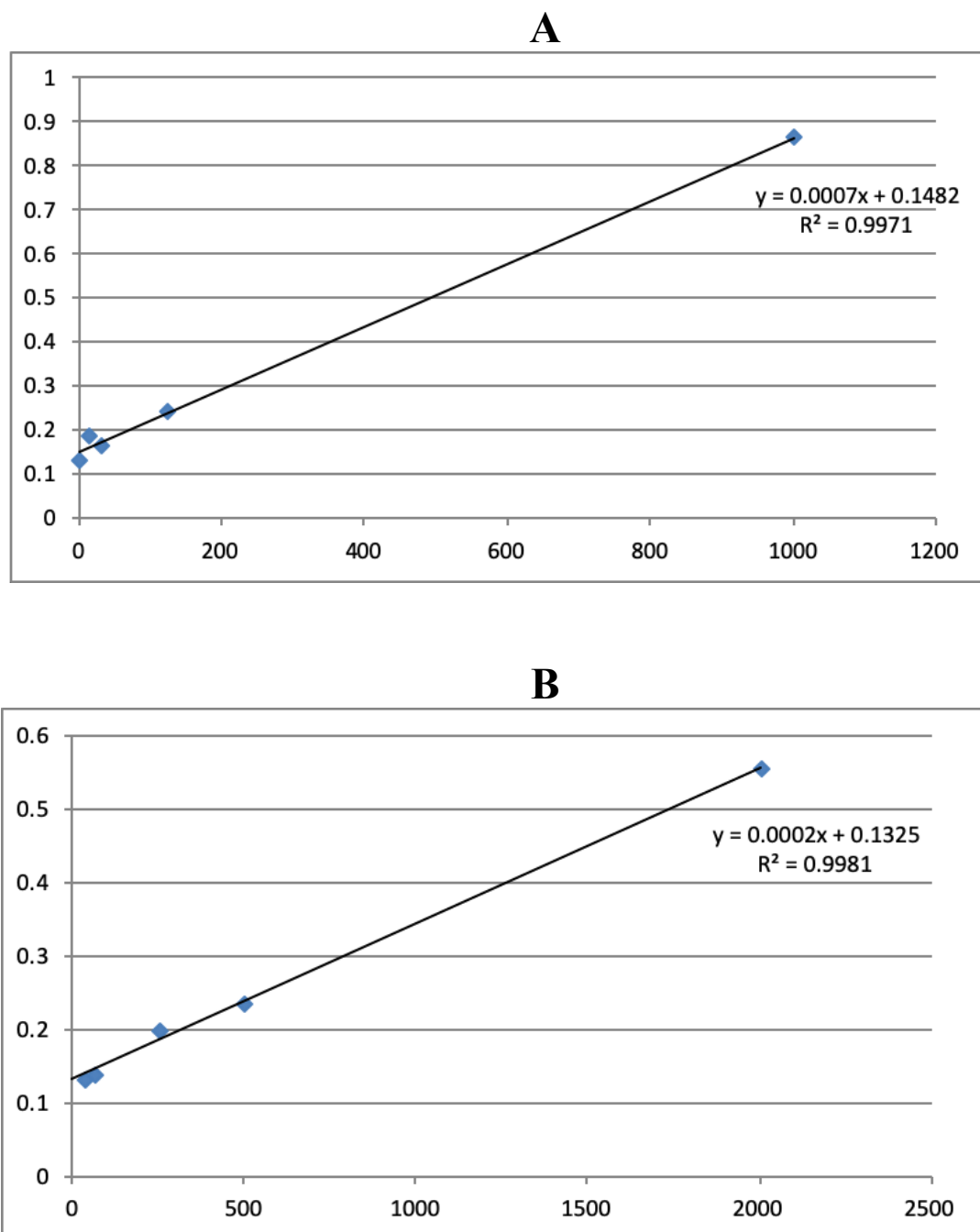
ZHAO, Z.; WANG, L.; SONG, W.; et al. Reduced miR-29a-3p expression is linked to the cell proliferation and cell migration in gastric cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2015.

ZHENG, Z.; CUI, H.; WANG, Y.; YAO, W. Downregulation of RPS15A by miR-29a-3p attenuates cell proliferation in colorectal carcinoma. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 83, n. 11, p. 1–8, 2019.

ZHU, L.; KALIMUTHU, S.; GANGADARAN, P.; et al. Exosomes derived from natural killer cells exert therapeutic effect in melanoma. **Theranostics**, v. 7, n. 10, p. 2732–2745, 2017.

APÊNDICE A – POLARIZAÇÃO MACRÓFAGOS

Figura 22. Curvas analíticas: citocinas.



Gráficos representativos das curvas analíticas obtidas pelos valores de absorvância *versus* concentração dos padrões dos ELISAS A) IL-6 e B) IL-10.

Figura 23. Separação das proteínas por eletroforese.

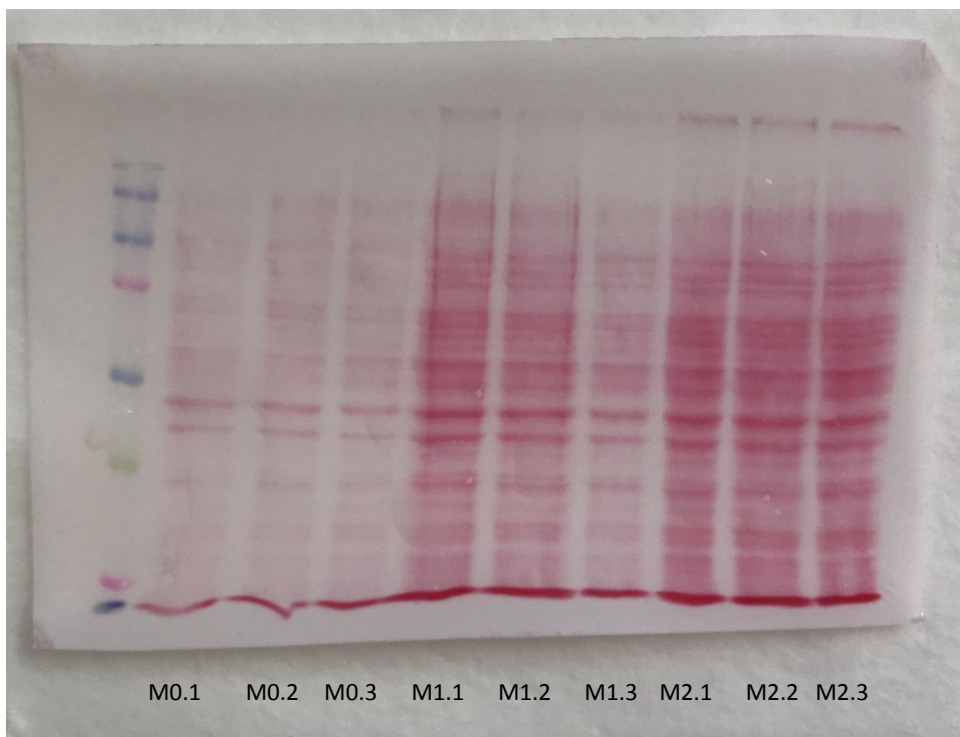


Imagem das proteínas separadas (kDa) em membrana PVDF corada com Ponceau S. n=3.

APÊNDICE B – EXTRAÇÃO RNA**Tabela 12.** Pureza e integridade do RNA dos exossomos e das células de macrófagos.

	Razão 260/280		Razão 260/230	
	Exossomos	Células	Exossomos	Células
M1	2,121	2,062	1,053	2,031
M2	2,245	2,109	0,213	2,067

APÊNDICE C – PREDIÇÃO DE ALVOS E VIAS

Quadro 11. Lista dos genes em comum nas bases de dados utilizadas no estudo regulados pelos miRNAs validados.

hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-29a-3p
<i>NAGK</i>	<i>LIN7C</i>	<i>STRADB</i>	<i>TET3</i>
<i>ZBTB7A</i>	<i>H3F3B</i>	<i>GBA2</i>	<i>TET1</i>
<i>ENPP5</i>	<i>NET1</i>	<i>KCNK2</i>	<i>TET2</i>
<i>HAUS8</i>	<i>ESR1</i>	<i>TSPAN14</i>	<i>NFIA</i>
<i>BTG3</i>	<i>RGS2</i>	<i>H2AFX</i>	<i>HBPI</i>
<i>CCL1</i>	<i>FRAT2</i>	<i>AGPAT3</i>	<i>TDG</i>
<i>CYBRD1</i>	<i>C5orf24</i>	<i>BBC3</i>	<i>C1QTNF6</i>
<i>NKIRAS1</i>	<i>SIRT1</i>	<i>ACVR1B</i>	<i>ADAMTS9</i>
<i>C7orf43</i>	<i>PPMIK</i>	<i>MLEC</i>	<i>COL4A1</i>
<i>PFKP</i>	<i>SNAI1</i>	<i>AMOTL2</i>	<i>SPARC</i>
<i>RHOC</i>	<i>PTEN</i>	<i>PIM2</i>	<i>COL5A2</i>
<i>EPHA4</i>	<i>ERBB3</i>	<i>MBD6</i>	<i>FBN1</i>
<i>RGMB</i>	<i>BTG1</i>	<i>C8orf58</i>	<i>ZBTB5</i>
<i>ZNFX1</i>	<i>NCOA1</i>	<i>DNAJB12</i>	<i>CDC7</i>
<i>TGFBR2</i>	<i>NTRK2</i>	<i>MARCKSL1</i>	<i>ISG20L2</i>
<i>BAMBI</i>	<i>PDIK1L</i>	<i>ABCB9</i>	<i>COMMD2</i>
<i>ATG16L1</i>	<i>BRWD3</i>	<i>PRKCH</i>	<i>TRAF4</i>
<i>RRAGD</i>	<i>RCOR1</i>	<i>MIDN</i>	<i>PTEN</i>
<i>CROT</i>	<i>CHD9</i>	<i>NDST1</i>	<i>CBX6</i>
<i>STAT3</i>	<i>MYCBP</i>	<i>SSR1</i>	<i>PXDN</i>
<i>SEMA4B</i>	<i>RCC2</i>	<i>POLR3D</i>	<i>FEM1B</i>
<i>F3</i>	<i>TIAM1</i>	<i>MAPK7</i>	<i>NAV3</i>
<i>CTSA</i>	<i>CCNT2</i>	<i>ERBB3</i>	<i>REL</i>
<i>SQSTM1</i>	<i>LRRC1</i>	<i>DEDD</i>	<i>PAN2</i>

<i>E2F1</i>	<i>HDAC4</i>	<i>PAK4</i>	<i>ROBO1</i>
<i>LIMA1</i>	<i>TET2</i>	<i>RAB11FIP1</i>	<i>DNMT3B</i>
<i>MAPRE3</i>	<i>EDC3</i>	<i>ZXDB</i>	<i>FOXO3</i>
<i>ANKRD52</i>	<i>SP1</i>	<i>ZXDA</i>	<i>VEGFA</i>
<i>AKTIP</i>		<i>MX11</i>	<i>CCDC117</i>
<i>SMOC1</i>		<i>CSK</i>	<i>CDK6</i>
<i>TNFRSF21</i>		<i>FURIN</i>	<i>MCL1</i>
<i>NTN4</i>		<i>HIC2</i>	<i>BTG2</i>
<i>TMEM100</i>		<i>NEK6</i>	<i>ABCE1</i>
<i>CAMK2N2</i>		<i>MMP14</i>	<i>PIK3R1</i>
<i>FYCO1</i>		<i>RAD54L2</i>	<i>CPEB3</i>
<i>TBC1D17</i>		<i>LMNB2</i>	<i>NKIRAS2</i>
<i>GPR137B</i>		<i>REPS2</i>	<i>ITGB1</i>
<i>AGFG2</i>		<i>DVL3</i>	<i>CCND2</i>
<i>TRIP10</i>			<i>LPL</i>
<i>PRRG4</i>			<i>OTUD4</i>
<i>MKRN1</i>			<i>SERPINH1</i>
<i>REEP3</i>			<i>RNF138</i>
<i>ORMDL3</i>			<i>PPM1D</i>
<i>PPP6C</i>			<i>REST</i>
<i>MKNK2</i>			<i>SETDB1</i>
<i>LDLR</i>			<i>INSIG1</i>
<i>ITGB8</i>			<i>COL4A2</i>
<i>LAPTM4A</i>			<i>TMTC3</i>
<i>GNS</i>			<i>CALM3</i>
<i>EREG</i>			<i>KLF4</i>
<i>ARHGAP1</i>			<i>AKT3</i>
<i>ZBTB4</i>			<i>CCNT2</i>
<i>NBL1</i>			<i>BACE1</i>
<i>MINK1</i>			<i>ENPP2</i>
<i>GNB5</i>			<i>VHL</i>

<i>UXS1</i>			<i>SLC16A1</i>
<i>RRM2</i>			<i>CTNNBIP1</i>
<i>FAM129A</i>			<i>KCTD15</i>
<i>TMEM127</i>			<i>KLHDC3</i>
<i>SLC16A9</i>			<i>PPP1R13B</i>
<i>MIDN</i>			<i>LOX</i>
<i>TXNIP</i>			<i>PLAG1</i>
<i>IQSEC1</i>			<i>ZFP91</i>
<i>PITPNA</i>			<i>NAA40</i>
<i>CHAF1A</i>			<i>WDR26</i>
<i>KIAA0513</i>			<i>ITGA6</i>
<i>TIMP2</i>			<i>ITGA11</i>
<i>FAM102A</i>			<i>PHACTR2</i>
<i>SLC22A23</i>			<i>RAB40C</i>
<i>GJA1</i>			<i>DNMT3A</i>
<i>GOLGA1</i>			<i>MAPKBP1</i>
<i>TNFAIP1</i>			<i>HECW1</i>
<i>ABHD2</i>			<i>IGF1</i>
<i>LASP1</i>			<i>MXD1</i>
<i>TPRG1L</i>			<i>FBRS</i>
<i>GBF1</i>			<i>DDX6</i>
<i>NRBP1</i>			<i>CAND1</i>
<i>TXLNA</i>			<i>GOLGA7</i>
<i>EIF4H</i>			<i>CCNA2</i>
<i>MYO1D</i>			<i>RPS6KA3</i>
<i>HIF1A</i>			<i>DICER1</i>
<i>CCND1</i>			<i>LIMS1</i>
<i>TRIM8</i>			<i>SH3GLB1</i>
<i>FBXO31</i>			<i>CACNA1C</i>
<i>KPNA2</i>			<i>CSRNP2</i>

<i>SCAMP2</i>			<i>MORF4L1</i>
<i>STX6</i>			
<i>MAP7</i>			
<i>RAB11FIP1</i>			
<i>HMGB3</i>			
<i>ZNF385A</i>			
<i>SCAMP5</i>			
<i>RUNX3</i>			
<i>E2F2</i>			
<i>ULK1</i>			
<i>PLEKHO2</i>			
<i>ZFYVE26</i>			
<i>PLEKHM1</i>			
<i>SH3BP5</i>			
<i>RAB5B</i>			
<i>NRIP3</i>			
<i>AAK1</i>			
<i>SIRPA</i>			
<i>SKI</i>			
<i>CCND2</i>			
<i>ARHGEF18</i>			
<i>CIT</i>			
<i>LIMK1</i>			
<i>BMP2</i>			
<i>STK11IP</i>			
<i>FAF2</i>			
<i>PTGFRN</i>			
<i>TSKU</i>			
<i>FMNL3</i>			
<i>NACC2</i>			
<i>SESN2</i>			

<i>C16orf70</i>			
<i>AP3D1</i>			
<i>ATL3</i>			
<i>SMAD6</i>			
<i>SEMA7A</i>			
<i>MCL1</i>			
<i>DNAL1</i>			
<i>TMBIM6</i>			
<i>CERCAM</i>			
<i>PLXNA1</i>			
<i>ANKH</i>			
<i>KLHL36</i>			

Bases de dados TargetScan, miRDB, miRTarBase e LinkedOmics. hsa-miR: microRNA humano.

Quadro 12. Lista das vias relacionadas aos genes regulados pelos miRNAs validados.

hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-29a-3p
<i>lens fiber cell apoptotic process (GO:1990086)</i>	<i>male mating behavior (GO:0060179)</i>	<i>5-methylcytosine catabolic process (GO:0006211)</i>
<i>transforming growth factor beta receptor signaling pathway (GO:0007179)</i>	<i>peptidyl-lysine deacetylation (GO:0034983)</i>	<i>5-methylcytosine metabolic process (GO:0019857)</i>
<i>negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway (GO:0030512)</i>	<i>prostate gland growth (GO:0060736)</i>	<i>C-5 methylation of cytosine (GO:0090116)</i>
<i>positive regulation of autophagy (GO:0010508)</i>	<i>histone deacetylation (GO:0016575)</i>	<i>DNA methylation on cytosine (GO:0032776)</i>
<i>transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway (GO:0007178)</i>	<i>protein deacetylation (GO:0006476)</i>	<i>cellular response to insulin-like growth factor stimulus (GO:1990314)</i>
<i>negative regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway (GO:0090101)</i>	<i>protein deacylation (GO:0035601)</i>	<i>positive regulation of oxidative stress-induced neuron death (GO:1903223)</i>
<i>response to transforming growth factor beta (GO:0071559)</i>	<i>regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling (GO:0014066)</i>	<i>post-embryonic camera-type eye development (GO:0031077)</i>

<i>regulation of autophagy</i> (GO:0010506)	<i>regulation of muscle cell differentiation</i> (GO:0051147)	<i>changes to DNA methylation involved in embryo development</i> (GO:1901538)
<i>positive regulation of neurogenesis</i> (GO:0050769)	<i>regulation of axonogenesis</i> (GO:0050770)	<i>DNA methylation involved in embryo development</i> (GO:0043045)
<i>regulation of neurogenesis</i> (GO:0050767)	<i>regulation of cell junction assembly</i> (GO:1901888)	<i>oxidative demethylation</i> (GO:0070989)
<i>regulation of nervous system development</i> (GO:0051960)	<i>rhythmic process</i> (GO:0048511)	<i>dentate gyrus development</i> (GO:0021542)
<i>regulation of cell development</i> (GO:0060284)	<i>negative regulation of growth</i> (GO:0045926)	<i>DNA demethylation</i> (GO:0080111)
<i>negative regulation of cell differentiation</i> (GO:0045596)	<i>regulation of cell growth</i> (GO:0001558)	<i>collagen-activated signaling pathway</i> (GO:0038065)
<i>negative regulation of developmental process</i> (GO:0051093)	<i>chromatin organization</i> (GO:0006325)	<i>post-embryonic animal organ development</i> (GO:0048569)
<i>regulation of anatomical structure morphogenesis</i> (GO:0022603)	<i>cellular response to hormone stimulus</i> (GO:0032870)	<i>DNA dealkylation</i> (GO:0035510)
<i>positive regulation of cell differentiation</i> (GO:0045597)	<i>regulation of cell development</i> (GO:0060284)	<i>positive regulation of oxidative stress-induced cell death</i> (GO:1903209)

<i>negative regulation of cell population proliferation (GO:0008285)</i>	<i>positive regulation of apoptotic process (GO:0043065)</i>	<i>cell migration involved in sprouting angiogenesis (GO:0002042)</i>
<i>regulation of cellular catabolic process (GO:0031329)</i>	<i>positive regulation of programmed cell death (GO:0043068)</i>	<i>NIK/NF-kappaB signaling (GO:0038061)</i>
<i>regulation of cell differentiation (GO:0045595)</i>	<i>regulation of plasma membrane bounded cell projection organization (GO:0120035)</i>	<i>response to lead ion (GO:0010288)</i>
<i>regulation of multicellular organismal development (GO:2000026)</i>	<i>regulation of anatomical structure morphogenesis (GO:0022603)</i>	<i>cell adhesion mediated by integrin (GO:0033627)</i>
<i>regulation of cell migration (GO:0030334)</i>	<i>negative regulation of cell differentiation (GO:0045596)</i>	<i>negative regulation of cell aging (GO:0090344)</i>
<i>regulation of catabolic process (GO:0009894)</i>	<i>regulation of cell projection organization (GO:0031344)</i>	<i>pyrimidine-containing compound catabolic process (GO:0072529)</i>
<i>phosphorylation (GO:0016310)</i>	<i>positive regulation of cell differentiation (GO:0045597)</i>	<i>basement membrane organization (GO:0071711)</i>
<i>regulation of cell motility (GO:2000145)</i>	<i>regulation of growth (GO:0040008)</i>	<i>DNA methylation or demethylation (GO:0044728)</i>
<i>generation of neurons (GO:0048699)</i>	<i>positive regulation of cell population</i>	<i>blood vessel endothelial cell migration</i>

	<i>proliferation</i> (GO:0008284)	(GO:0043534)
<i>negative regulation of multicellular organismal process</i> (GO:0051241)	<i>regulation of kinase activity</i> (GO:0043549)	<i>positive regulation of cell-substrate junction organization</i> (GO:0150117)
<i>regulation of locomotion</i> (GO:0040012)	<i>negative regulation of developmental process</i> (GO:0051093)	<i>platelet-derived growth factor receptor signaling pathway</i> (GO:0048008)
<i>regulation of intracellular signal transduction</i> (GO:1902531)	<i>response to hormone</i> (GO:0009725)	<i>brain morphogenesis</i> (GO:0048854)
<i>regulation of phosphorylation</i> (GO:0042325)	<i>regulation of cell migration</i> (GO:0030334)	<i>regulation of transcription initiation from RNA polymerase II promoter</i> (GO:0060260)
<i>protein transport</i> (GO:0015031)	<i>chromosome organization</i> (GO:0051276)	<i>regulation of sprouting angiogenesis</i> (GO:1903670)
<i>positive regulation of developmental process</i> (GO:0051094)	<i>regulation of cell differentiation</i> (GO:0045595)	<i>phosphatidylinositol 3-kinase signaling</i> (GO:0014065)
<i>vesicle-mediated transport</i> (GO:0016192)	<i>regulation of cell motility</i> (GO:2000145)	<i>regulation of cell migration involved in sprouting angiogenesis</i> (GO:0090049)
<i>macromolecule localization</i>	<i>developmental process involved in</i>	<i>protein kinase B signaling</i>

<i>(GO:0033036)</i>	<i>reproduction (GO:0003006)</i>	<i>(GO:0043491)</i>
<i>response to endogenous stimulus (GO:0009719)</i>	<i>regulation of locomotion (GO:0040012)</i>	<i>prostate gland development (GO:0030850)</i>
<i>protein localization (GO:0008104)</i>	<i>positive regulation of developmental process (GO:0051094)</i>	<i>DNA methylation (GO:0006306)</i>
<i>neurogenesis (GO:0022008)</i>	<i>positive regulation of catalytic activity (GO:0043085)</i>	<i>DNA alkylation (GO:0006305)</i>
<i>regulation of phosphate metabolic process (GO:0019220)</i>	<i>regulation of cellular component movement (GO:0051270)</i>	<i>cellular response to amyloid-beta (GO:1904646)</i>
<i>regulation of phosphorus metabolic process (GO:0051174)</i>	<i>regulation of developmental process (GO:0050793)</i>	<i>DNA modification (GO:0006304)</i>
<i>establishment of protein localization (GO:0045184)</i>	<i>regulation of apoptotic process (GO:0042981)</i>	<i>collagen fibril organization (GO:0030199)</i>
<i>regulation of developmental process (GO:0050793)</i>	<i>regulation of multicellular organismal development (GO:2000026)</i>	<i>cellular response to acid chemical (GO:0071229)</i>
<i>negative regulation of cell communication (GO:0010648)</i>	<i>regulation of programmed cell death (GO:0043067)</i>	<i>demethylation (GO:0070988)</i>
<i>negative regulation of signaling (GO:0023057)</i>	<i>positive regulation of molecular function (GO:0044093)</i>	<i>cellular response to amino acid stimulus (GO:0071230)</i>

<i>organic substance transport (GO:0071702)</i>	<i>response to oxygen-containing compound (GO:1901700)</i>	<i>endothelial cell migration (GO:0043542)</i>
<i>regulation of catalytic activity (GO:0050790)</i>	<i>regulation of cell death (GO:0010941)</i>	<i>regulation of cell-substrate junction organization (GO:0150116)</i>
<i>regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)</i>	<i>regulation of cell population proliferation (GO:0042127)</i>	<i>negative regulation of response to cytokine stimulus (GO:0060761)</i>
<i>regulation of molecular function (GO:0065009)</i>	<i>regulation of cellular component organization (GO:0051128)</i>	<i>maintenance of cell number (GO:0098727)</i>
<i>cellular localization (GO:0051641)</i>	<i>regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)</i>	<i>positive regulation of neuron death (GO:1901216)</i>
<i>regulation of signal transduction (GO:0009966)</i>	<i>animal organ development (GO:0048513)</i>	<i>stem cell population maintenance (GO:0019827)</i>
<i>localization (GO:0051179)</i>	<i>positive regulation of cellular process (GO:0048522)</i>	<i>pyrimidine-containing compound metabolic process (GO:0072527)</i>
<i>regulation of localization (GO:0032879)</i>	<i>positive regulation of biological process (GO:0048518)</i>	<i>protein O-linked glycosylation (GO:0006493)</i>
<i>regulation of cell communication (GO:0010646)</i>		<i>cell cycle G1/S phase transition (GO:0044843)</i>

<i>regulation of signaling</i> (GO:0023051)		<i>response to vitamin</i> (GO:0033273)
<i>response to stress</i> (GO:0006950)		<i>cellular response to hypoxia</i> (GO:0071456)
<i>transport</i> (GO:0006810)		<i>epithelial cell migration</i> (GO:0010631)
<i>negative regulation of cellular process</i> (GO:0048523)		<i>artery development</i> (GO:0060840)
<i>regulation of response to stimulus</i> (GO:0048583)		<i>cellular response to alcohol</i> (GO:0097306)
<i>negative regulation of biological process</i> (GO:0048519)		<i>cellular response to oxygen levels</i> (GO:0071453)
<i>establishment of localization</i> (GO:0051234)		<i>epithelium migration</i> (GO:0090132)
<i>cellular component organization</i> (GO:0016043)		<i>cellular response to decreased oxygen levels</i> (GO:0036294)
<i>cellular process</i> (GO:0009987)		<i>mitotic cell cycle phase transition</i> (GO:0044772)
		<i>response to nutrient</i> (GO:0007584)
		<i>regulation of DNA binding</i> (GO:0051101)
		<i>regulation of cell-matrix adhesion</i> (GO:0001952)

		<i>cell cycle phase transition</i> (GO:0044770)
		<i>response to acid chemical</i> (GO:0001101)
		<i>activation of protein kinase activity</i> (GO:0032147)
		<i>negative regulation of cell development</i> (GO:0010721)
		<i>response to glucocorticoid</i> (GO:0051384)
		<i>regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway</i> (GO:2001236)
		<i>regulation of myeloid cell differentiation</i> (GO:0045637)
		<i>protein stabilization</i> (GO:0050821)
		<i>regulation of epithelial cell migration</i> (GO:0010632)
		<i>extracellular matrix organization</i> (GO:0030198)
		<i>cellular response to peptide</i> (GO:1901653)

		<i>extracellular structure organization</i> (GO:0043062)
		<i>external encapsulating structure organization</i> (GO:0045229)
		<i>regulation of angiogenesis</i> (GO:0045765)
		<i>regulation of vasculature development</i> (GO:1901342)
		<i>macromolecule methylation</i> (GO:0043414)
		<i>response to alcohol</i> (GO:0097305)
		<i>response to hypoxia</i> (GO:0001666)
		<i>regulation of cell-substrate adhesion</i> (GO:0010810)
		<i>response to decreased oxygen levels</i> (GO:0036293)
		<i>developmental maturation</i> (GO:0021700)
		<i>urogenital system development</i>

		<i>(GO:0001655)</i>
		<i>response to peptide (GO:1901652)</i>
		<i>response to oxygen levels (GO:0070482)</i>
		<i>cellular response to organonitrogen compound (GO:0071417)</i>
		<i>methylation (GO:0032259)</i>
		<i>regulation of protein stability (GO:0031647)</i>
		<i>positive regulation of protein kinase activity (GO:0045860)</i>
		<i>covalent chromatin modification (GO:0016569)</i>
		<i>regulation of neuron death (GO:1901214)</i>
		<i>response to nutrient levels (GO:0031667)</i>
		<i>cellular response to nitrogen compound (GO:1901699)</i>
		<i>regulation of epithelial cell proliferation (GO:0050678)</i>
		<i>negative regulation of</i>

		<i>developmental process (GO:0051093)</i>
		<i>negative regulation of gene expression (GO:0010629)</i>
		<i>response to organonitrogen compound (GO:0010243)</i>
		<i>negative regulation of cell differentiation (GO:0045596)</i>
		<i>response to extracellular stimulus (GO:0009991)</i>
		<i>DNA metabolic process (GO:0006259)</i>
		<i>positive regulation of transferase activity (GO:0051347)</i>
		<i>blood vessel morphogenesis (GO:0048514)</i>
		<i>positive regulation of cellular catabolic process (GO:0031331)</i>
		<i>regulation of cellular response to stress (GO:0080135)</i>
		<i>positive regulation of kinase activity</i>

		<i>(GO:0033674)</i>
		<i>response to nitrogen compound (GO:1901698)</i>
		<i>heart development (GO:0007507)</i>
		<i>positive regulation of catabolic process (GO:0009896)</i>
		<i>regulation of cell development (GO:0060284)</i>
		<i>sensory organ development (GO:0007423)</i>
		<i>chromatin organization (GO:0006325)</i>
		<i>regulation of protein kinase activity (GO:0045859)</i>
		<i>response to endogenous stimulus (GO:0009719)</i>
		<i>regulation of kinase activity (GO:0043549)</i>
		<i>positive regulation of cell differentiation (GO:0045597)</i>
		<i>response to organic cyclic compound (GO:0014070)</i>

		<i>regulation of multicellular organismal development (GO:2000026)</i>
		<i>negative regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0000122)</i>
		<i>regulation of cell differentiation (GO:0045595)</i>
		<i>regulation of transferase activity (GO:0051338)</i>
		<i>cellular response to endogenous stimulus (GO:0071495)</i>
		<i>regulation of cell motility (GO:2000145)</i>
		<i>response to lipid (GO:0033993)</i>
		<i>regulation of cell migration (GO:0030334)</i>
		<i>negative regulation of cell population proliferation (GO:0008285)</i>
		<i>regulation of cellular component movement (GO:0051270)</i>

		<i>response to hormone (GO:0009725)</i>
		<i>negative regulation of multicellular organismal process (GO:0051241)</i>
		<i>regulation of locomotion (GO:0040012)</i>
		<i>response to abiotic stimulus (GO:0009628)</i>
		<i>positive regulation of developmental process (GO:0051094)</i>
		<i>regulation of cell cycle (GO:0051726)</i>
		<i>positive regulation of catalytic activity (GO:0043085)</i>
		<i>animal organ morphogenesis (GO:0009887)</i>
		<i>cellular response to oxygen-containing compound (GO:1901701)</i>
		<i>intracellular signal transduction (GO:0035556)</i>
		<i>positive regulation of</i>

		<i>transcription by RNA polymerase II</i> (GO:0045944)
		<i>negative regulation of cell death</i> (GO:0060548)
		<i>tube development</i> (GO:0035295)
		<i>cellular response to stress</i> (GO:0033554)
		<i>negative regulation of apoptotic process</i> (GO:0043066)
		<i>circulatory system development</i> (GO:0072359)
		<i>negative regulation of transcription, DNA-templated</i> (GO:0045892)
		<i>negative regulation of nucleic acid-templated transcription</i> (GO:1903507)
		<i>negative regulation of RNA biosynthetic process</i> (GO:1902679)
		<i>positive regulation of phosphorylation</i> (GO:0042327)
		<i>negative regulation of</i>

		<i>programmed cell death (GO:0043069)</i>
		<i>regulation of developmental process (GO:0050793)</i>
		<i>response to oxygen- containing compound (GO:1901700)</i>
		<i>negative regulation of signal transduction (GO:0009968)</i>
		<i>positive regulation of protein modification process (GO:0031401)</i>
		<i>apoptotic process (GO:0006915)</i>
		<i>negative regulation of RNA metabolic process (GO:0051253)</i>
		<i>regulation of anatomical structure morphogenesis (GO:0022603)</i>
		<i>regulation of cell death (GO:0010941)</i>
		<i>negative regulation of cell communication (GO:0010648)</i>
		<i>negative regulation of signaling</i>

		<i>(GO:0023057)</i>
		<i>negative regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031327)</i>
		<i>regulation of phosphorylation (GO:0042325)</i>
		<i>negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process (GO:2000113)</i>
		<i>regulation of response to stress (GO:0080134)</i>
		<i>negative regulation of response to stimulus (GO:0048585)</i>
		<i>negative regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010558)</i>
		<i>programmed cell death (GO:0012501)</i>
		<i>negative regulation of biosynthetic process (GO:0009890)</i>
		<i>regulation of cell population proliferation (GO:0042127)</i>
		<i>positive regulation of RNA metabolic process (GO:0051254)</i>

		<i>regulation of apoptotic process (GO:0042981)</i>
		<i>regulation of hydrolase activity (GO:0051336)</i>
		<i>positive regulation of cellular component organization (GO:0051130)</i>
		<i>positive regulation of cellular protein metabolic process (GO:0032270)</i>
		<i>regulation of programmed cell death (GO:0043067)</i>
		<i>negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0045934)</i>
		<i>positive regulation of protein metabolic process (GO:0051247)</i>
		<i>response to organic substance (GO:0010033)</i>
		<i>regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0006357)</i>
		<i>positive regulation of nucleobase-containing</i>

		<i>compound metabolic process (GO:0045935)</i>
		<i>negative regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010605)</i>
		<i>negative regulation of metabolic process (GO:0009892)</i>
		<i>positive regulation of nucleic acid-templated transcription (GO:1903508)</i>
		<i>positive regulation of transcription, DNA-templated (GO:0045893)</i>
		<i>positive regulation of RNA biosynthetic process (GO:1902680)</i>
		<i>anatomical structure morphogenesis (GO:0009653)</i>
		<i>regulation of phosphate metabolic process (GO:0019220)</i>
		<i>regulation of phosphorus metabolic process (GO:0051174)</i>
		<i>regulation of cellular protein metabolic process (GO:0032268)</i>

		<i>positive regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010557)</i>
		<i>positive regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051173)</i>
		<i>positive regulation of molecular function (GO:0044093)</i>
		<i>tissue development (GO:0009888)</i>
		<i>positive regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010604)</i>
		<i>regulation of protein metabolic process (GO:0051246)</i>
		<i>cellular response to organic substance (GO:0071310)</i>
		<i>negative regulation of cellular metabolic process (GO:0031324)</i>
		<i>cellular macromolecule biosynthetic process (GO:0034645)</i>
		<i>positive regulation of cellular metabolic</i>

		<i>process (GO:0031325)</i>
		<i>nucleic acid metabolic process (GO:0090304)</i>
		<i>macromolecule modification (GO:0043412)</i>
		<i>negative regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051172)</i>
		<i>regulation of catalytic activity (GO:0050790)</i>
		<i>regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)</i>
		<i>positive regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031328)</i>
		<i>regulation of protein modification process (GO:0031399)</i>
		<i>cellular protein modification process (GO:0006464)</i>
		<i>protein modification process (GO:0036211)</i>
		<i>positive regulation of metabolic process (GO:0009893)</i>
		<i>positive regulation of</i>

		<i>biosynthetic process</i> (GO:0009891)
		<i>animal organ</i> <i>development</i> (GO:0048513)
		<i>regulation of</i> <i>transcription, DNA-</i> <i>templated</i> (GO:0006355)
		<i>regulation of nucleic</i> <i>acid-templated</i> <i>transcription</i> (GO:1903506)
		<i>regulation of RNA</i> <i>biosynthetic process</i> (GO:2001141)
		<i>cellular macromolecule</i> <i>metabolic process</i> (GO:0044260)
		<i>negative regulation of</i> <i>cellular process</i> (GO:0048523)
		<i>negative regulation of</i> <i>biological process</i> (GO:0048519)
		<i>regulation of RNA</i> <i>metabolic process</i> (GO:0051252)
		<i>regulation of cellular</i> <i>macromolecule</i> <i>biosynthetic process</i>

		(GO:2000112)
		<i>regulation of macromolecule biosynthetic process (GO:0010556)</i>
		<i>regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031326)</i>
		<i>regulation of nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0019219)</i>
		<i>regulation of biosynthetic process (GO:0009889)</i>
		<i>response to stress (GO:0006950)</i>
		<i>regulation of gene expression (GO:0010468)</i>
		<i>regulation of molecular function (GO:0065009)</i>
		<i>cellular response to chemical stimulus (GO:0070887)</i>
		<i>cellular protein metabolic process (GO:0044267)</i>
		<i>response to chemical (GO:0042221)</i>
		<i>regulation of</i>

		<i>macromolecule metabolic process (GO:0060255)</i>
		<i>regulation of cell communication (GO:0010646)</i>
		<i>regulation of metabolic process (GO:0019222)</i>
		<i>positive regulation of cellular process (GO:0048522)</i>
		<i>regulation of signaling (GO:0023051)</i>
		<i>protein metabolic process (GO:0019538)</i>
		<i>system development (GO:0048731)</i>
		<i>regulation of localization (GO:0032879)</i>
		<i>regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051171)</i>
		<i>regulation of cellular metabolic process (GO:0031323)</i>
		<i>regulation of primary metabolic process (GO:0080090)</i>
		<i>regulation of signal</i>

		<i>transduction</i> (GO:0009966)
		<i>multicellular organism development</i> (GO:0007275)
		<i>positive regulation of biological process</i> (GO:0048518)
		<i>macromolecule metabolic process</i> (GO:0043170)
		<i>cellular developmental process</i> (GO:0048869)
		<i>cell differentiation</i> (GO:0030154)
		<i>developmental process</i> (GO:0032502)
		<i>cellular response to stimulus</i> (GO:0051716)
		<i>anatomical structure development</i> (GO:0048856)
		<i>regulation of response to stimulus</i> (GO:0048583)
		<i>cellular component organization</i> (GO:0016043)
		<i>organonitrogen compound metabolic process</i> (GO:1901564)

		<i>cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)</i>
		<i>primary metabolic process (GO:0044238)</i>
		<i>signal transduction (GO:0007165)</i>
		<i>cellular metabolic process (GO:0044237)</i>
		<i>response to stimulus (GO:0050896)</i>
		<i>organic substance metabolic process (GO:0071704)</i>
		<i>nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)</i>
		<i>multicellular organismal process (GO:0032501)</i>
		<i>metabolic process (GO:0008152)</i>
		<i>regulation of cellular process (GO:0050794)</i>
		<i>regulation of biological process (GO:0050789)</i>
		<i>biological regulation (GO:0065007)</i>
		<i>cellular process</i>

		<i>(GO:0009987)</i>
--	--	---------------------

Em vermelho encontram-se as vias biológicas relacionados com processos antitumorais. Base de dados GeneOntology. hsa-miR: microRNA humano.

ANEXO A – ARTIGO

Cytotechnology (2021) 73:35–48
<https://doi.org/10.1007/s10616-020-00440-5>



ORIGINAL ARTICLE

Three-dimensional multicellular cell culture for anti-melanoma drug screening: focus on tumor microenvironment

Najla Adel Saleh · Michele Patrícia Rode · Jelver Alexander Sierra · Adny Henrique Silva · Juliano Andreoli Miyake · Fabíola Branco Filippin-Monteiro · Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Received: 20 July 2020 / Accepted: 4 November 2020 / Published online: 20 November 2020
 © Springer Nature B.V. 2020

Abstract The development of new treatments for malignant melanoma, which has the worst prognosis among skin neoplasms, remains a challenge. The tumor microenvironment aids tumor cells to grow and resist to chemotherapeutic treatment. One way to mimic and study the tumor microenvironment is by using three-dimensional (3D) co-culture models (spheroids). In this study, a melanoma heterospheroid model composed of cancer cells, fibroblasts, and macrophages was produced by liquid-overlay technique using the agarose gel. The size, growth, viability, morphology, cancer stem-like cells

population and inflammatory profile of tumor heterospheroids and monospheroids were analyzed to evaluate the influence of stromal cells on these parameters. Furthermore, dacarbazine cytotoxicity was evaluated using spheroids and two-dimensional (2D) melanoma model. After finishing the experiments, it was observed the M2 macrophages induced an anti-inflammatory microenvironment in heterospheroids; fibroblasts cells support the formation of the extracellular matrix, and a higher percentage of melanoma CD271 was observed in this model. Additionally, melanoma spheroids responded differently to the

N. A. Saleh · M. P. Rode · T. B. Creczynski-Pasa (✉)
 Departamento de Ciências Farmacêuticas, GEIMM—
 Grupo de Estudos de Interações entre Micro e
 Macromoléculas, Universidade Federal de Santa Catarina,
 S/N Centro de Ciências da Saúde Bloco H - 3º andar, sala
 H302—Bairro Trindade, Florianópolis,
 Santa Catarina CEP: 88040-900, Brazil
 e-mail: tania.pasa@ufsc.br

N. A. Saleh
 e-mail: najla.saleh@posgrad.ufsc.br

M. P. Rode
 e-mail: michele.rode@ufsc.br

J. A. Sierra
 Departamento de Física, Universidade Federal de Santa
 Catarina, Florianópolis, SC, Brazil
 e-mail: jelver.sierra@posgrad.ufsc.br

A. H. Silva
 Departamento de Ciências Biológicas, Universidade
 Federal de Santa Catarina, Florianópolis,
 SC, Brazil
 e-mail: adny.henrique@posgrad.ufsc.br

J. A. Miyake
 Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade
 Federal de Santa Catarina, Florianópolis,
 SC, Brazil
 e-mail: juliano.miyake@ufsc.br

F. B. Filippin-Monteiro (✉)
 Departamento de Análises Clínicas, GEIMM—Grupo de
 Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas,
 Universidade Federal de Santa Catarina, S/N Centro de
 Ciências da Saúde Bloco H - 3º andar, sala H302—Bairro
 Trindade, Florianópolis, Santa Catarina CEP: 88040-900,
 Brazil
 e-mail: fabiola.monteiro@ufsc.br