

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GABRIELA MULLER RECHE BOGÉA

**EFEITO DO SECRETOMA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO SOBRE O IMUNOESCAPE DE UM MODELO *IN VITRO* DE
MELANOMA**

BRASÍLIA

2022

GABRIELA MULLER RECHE BOGÉA

**EFEITO DO SECRETOMA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO SOBRE O IMUNOESCAPE DE UM MODELO *IN VITRO* DE
MELANOMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:
Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Brasília

2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriela Muller Reche Bogéa

EFEITO DO SECRETOMA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO SOBRE O IMUNOESCAPE DE UM MODELO *IN VITRO* DE MELANOMA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 21 de Março de 2022.

Banca Examinadora:

Presidente: Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo – Universidade de Brasília

Membro 1: Prof. Dr. Ciro Martins Gomes – Universidade de Brasília

Membro 2: Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo – Universidade Federal de Pernambuco

Suplente: Prof. Dr. Fabio Pittella Silva - Universidade de Brasília

*“Só há duas opções nesta vida: se
resignar ou se indignar. E eu não vou me resignar
nunca.”*

(Darcy Ribeiro)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais e meu irmão, que me fizeram acreditar que eu era capaz de fazer tudo que eu desejasse e sempre me apoiaram em todas as minhas decisões. Foram exemplo de ética, responsabilidade e determinação, valores que levo por toda a minha vida.

Agradeço ao meu marido, Daniel, meu maior incentivador. Ele que me inspira a ser uma pessoa melhor todos os dias e me dá coragem para correr atrás dos meus objetivos. Com seu olhar apaixonado pela vida acadêmica, me mostrou de que forma encarar com mais tranquilidade essa caminhada e esteve muito presente em todo o processo, com os melhores conselhos e apoio sempre.

Agradeço ao Prof. Dr. Felipe Saldanha, meu orientador, quem acreditou em mim e no meu potencial desde a primeira conversa. Que me deu a oportunidade de realizar um sonho. Que esteve muito presente e disposto a ajudar durante todo o caminho. Com muita sabedoria e compreensão, soube conduzir a minha pesquisa e o meu trabalho de forma ética e muito profissional.

Agradeço a todos os colegas de pesquisa e professores do laboratório de Farmacologia Molecular, por todo o apoio e por terem me recebido tão calorosamente.

Agradeço às gurias do LHCT, Luma, Marielly e Elizabeth, que sempre me ajudaram com muito apoio técnico e até mesmo emocional, sem vocês nada disso seria possível. Em especial, gostaria de agradecer à Amandda, que se dedicou incansavelmente a me ensinar tudo o que eu sei sobre pesquisa hoje e esteve envolvida e preocupada com o meu projeto como se fosse dela. Serei eternamente grata!

Agradeço às minhas grandes amigas de infância que foram muito pacientes e, apesar da minha ausência nesses últimos dois anos, não largaram minha mão.

Agradeço aos meus sogros, Mara e Mauro, que estiveram presentes nessa jornada dando todo o apoio necessário para que a minha família estivesse amparada nas fases mais difíceis que passamos.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

BOGÉA, Gabriela Muller Reche. EFEITO DO SECRETOMA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO SOBRE O IMUNOESCAPE DE UM MODELO *IN VITRO* DE MELANOMA. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

O melanoma é um tipo de câncer de pele derivado dos melanócitos, com alta taxa de mortalidade e mau prognóstico. Atualmente, várias abordagens imunoterapêuticas estão sob investigação para tratar o melanoma. No entanto, recidivas do câncer e respostas heterogêneas ainda são observadas clinicamente. Portanto, é essencial compreender melhor os mecanismos de imunoescape do melanoma e como esse câncer interage com a resposta imune para garantir o escape imunológico. Nesse trabalho, investigamos qual o impacto do microambiente inflamatório sobre o potencial da linhagem de melanoma metastático MeWo em controlar a resposta imune de células T. Para isso, inicialmente produzimos meios condicionados de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em repouso (MC) e imunoativados com fitohemaglutinina (iMC). Em seguida, a MeWo foi expandida em RPMI, MC ou iMC e o secretoma gerado após a expansão celular foi coletado e identificado como Sec (RPMI), nSec (não inflamatório) ou iSec (secretoma inflamatório), respectivamente. A partir desse momento, submetemos as PBMCs ativadas com fitohemaglutinina ao Sec, nSec e iSec. Inicialmente, notamos que as células MeWo expostas ao iMC apresentaram expressão elevada de importantes moléculas imunomoduladoras, como PD-L1 e IDO. Além disso, essas células apresentaram aumento na expressão das ectoenzimas CD39 e CD73 em sua membrana, indicando maior potencial de gerar imunossupressão por produção de adenosina. Em adição, nossos dados revelaram que o iSec foi capaz de controlar significativamente a proliferação de

células T e reduzir a expressão de marcadores clássicos de ativação como CD69 e HLA-II. Além disso, as PBMCs tratadas com iSec apresentaram expressão reduzida dos principais reguladores das respostas Th1, Th2 e Treg (Tbet e Gata-3 e FOXP3). De modo concordante, notamos expressão reduzida de IFN γ nessas células. Mais importante, as PBMCs cultivadas com iSec apresentaram expressão reduzida dos transcritos TIM-3 e LAG-3, que codificam alvos terapêuticos que têm sido investigados no melanoma. Como pode ser visto, a exposição das células tumorais ao ambiente inflamatório desempenha um papel importante para permitir que essas células atuem com uma função imunossupressora mais potente. Considerando que nosso estudo teve foco em investigar comunicação parácrina, seria importante o desenvolvimento de novas investigações de modo a fornecer um melhor entendimento dos mecanismos de imunoescape do melanoma, com uma abordagem que permita contato celular. Tais avanços são fundamentais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas focadas na imunoterapia do melanoma.

Palavras-chave: melanoma, linfócitos T, resposta imune, secretoma, terapia alvo molecular.

ABSTRACT

BOGÉA, Gabriela Muller Reche. EFFECT OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL SECRETOME ON IMMUNOESCAPE OF AN *IN VITRO* MODEL OF MELANOMA. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

Melanoma is a type of skin cancer derived from melanocytes, with a high mortality rate and poor prognosis. Currently, several immunotherapeutic approaches are under investigation to treat melanoma. However, cancer relapses and heterogeneous responses are still clinically observed. Therefore, it is essential to better understand the mechanisms of melanoma immunoescape and how this cancer interacts with the immune response to ensure immune escape. In this work, we investigated the inflammatory microenvironment impact on the potential of the MeWo metastatic melanoma cell line to control the T cell immune response. First, we produced the conditioned media (MC) of resting peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and immunoactivated with phytohemagglutinin (iCM). Then, MeWo was expanded into RPMI, MC or iMC and the secretome generated after cell expansion was collected and identified as Sec (RPMI), nSec (non-inflammatory) or iSec (inflammatory secretome), respectively. From that moment, we submitted the PBMCs activated with phytohemagglutinin to Sec, nSec and iSec. Initially, we noticed that MeWo cells exposed to iMC showed high expression of important immunomodulatory molecules, such as PD-L1 and IDO. In addition, these cells showed an up regulation on the expression of CD39 and CD73 ectoenzymes in their membrane, indicating a greater potential to generate immunosuppression by adenosine production. In addition, our data revealed that iSec was able to significantly control T cell proliferation and reduce the expression of classic activation markers such as CD69 and HLA-

II. PBMCs treated with iSec showed reduced expression of the main regulators of Th1, Th2 and Treg responses (Tbet, Gata-3 and FOXP3). Accordingly, we noted reduced expression of IFN γ in these cells. More importantly, PBMCs cultured with iSec showed reduced expression of TIM-3 and LAG-3 transcripts, which encode therapeutic targets that have been investigated in melanoma. As can be seen, the exposure of tumor cells to the inflammatory environment plays an important role in allowing these cells to perform a more potent immunosuppressive function. Considering that our study focused on investigating paracrine communication, it would be important to develop new investigations in order to provide a better understanding of melanoma immunoescape mechanisms, with an approach that allows cellular contact. Such advances are fundamental for the development of new therapeutic approaches focused on melanoma immunotherapy.

Keywords: melanoma, T-cells, immune response, secretome, checkpoints.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Função oncogênica do secretoma tumoral.....	Pg 27.
Figura 2 - Desenho experimental utilizado no estudo.....	Pg 33.
Figura 3 - Ativação linfocitária.....	Pg 40.
Figura 4 - Proliferação de linfocitária.....	Pg 41.
Figura 5 - Avaliação de morte celular.....	Pg 42.
Figura 6 - Expressão de CD39 e CD73 em células MeWo.....	Pg 43.
Figura 7 – Análise da expressão gênica do PBMC.....	Pg 45.
Figura 8 - Análise de expressão gênica da linhagem MeWo.....	Pg 48.
Figura 9 – Produção de IL-10 e IFN γ	Pg 49.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência dos principais genes envolvidos no desenvolvimento do melanoma.....Pg 21.

Tabela 2 - Genes investigados e sequência de primers utilizadas nas reações de PCR em tempo real.....Pg 38.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg = micrograma

μL = microlitro

μM = micromolar

g = unidade de medida RCF (força G)

AICD = do inglês “*Activation-induced cell death*”

ATP = do inglês “*Adenosine triphosphate*”

CD = do inglês “*Cluster of differentiation*”

cDNA = do inglês “*Complementary DNA*”

CFSE = do inglês “*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*”

CTLA-4 = do inglês “*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*”

DMSO = do inglês “*Dimethyl sulfoxide*”

DNA = do inglês “*Deoxyribonucleic acid*”

ELISA = do inglês “*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*”

FBS = do inglês “*Fetal bovine serum*”

FITC = do inglês “*Fluorescein isothiocyanate*”

FOXP3 = do inglês “*Forkhead box P3*”

FSC = do inglês “*Foward scatter*”

HLA = do inglês “*Human Leukocyte Antigen*”

IDO = do inglês “*Indoleamine-2,3-dioxygenase*”

IFN = do inglês “*Interferons*”

IL = do inglês “*Interleukin*”

INF- γ = Interferon gamma

MDSCs = do inglês “*Myeloid-derived suppressor cells*”

MHCII = do inglês “*Major histocompatibility complex class II*”

MTT= do inglês “*3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl] - 2,5-diphenyltetrazolium bromide*”

PBMC= do inglês “*Peripheral Blood Mononuclear Cell*”

PBS = do inglês “*Phosphate Buffered Saline*”

PCR = do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”

PHA = do inglês “*Phytohaemagglutinin*”

PI = do inglês “*Propidium Iodide*”

RNA = do inglês "*Ribonucleic Acid*"

rpm = do inglês "*Revolutions per Minute*"

SSC: do inglês "*Side Scatter*"

TGF- β : Do inglês "*Transforming Growth Factor beta*"

TILs = do inglês "*Tumor Infiltrating Lymphocytes*"

TNF = do inglês "*Tumor Necrosis Factor*"

Tregs = do inglês "*T regulatory cells*"

VEGF = do inglês "*Vascular Endothelial Growth Factor*"

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Melanoma: definição	17
1.2 Epidemiologia do melanoma	18
1.3 Fisiopatologia do melanoma	18
1.4 Caracterização e classificação do melanoma	21
1.5 Diagnóstico	23
1.6 Tratamento	24
1.7 Microambiente do melanoma	25
1.8 Relação do melanoma com a resposta imune	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1 Coleta de amostras	31
3.2 Isolamento das PBMCs.....	31
3.3 Preparo do meio condicionado de PBMCs	31
3.4 Cultivo da linhagem e preparo do secretoma da MeWo.....	32
3.5 Ativação linfocitária.....	34
3.6 Proliferação celular	34
3.7 Análise de morte celular	35
3.8 Expressão das ectoenzimas CD39 e CD73 na linhagem MeWo	36
3.9 PCR em tempo real	36
3.10 Ensaio de imun absorção enzimática - ELISA	39
3.11 Análises estatísticas	39
4. RESULTADOS	40
4.1 iSec diminuiu a ativação dos linfócitos T	40
4.2 nSec e iSec controlam a proliferação de linfócitos T	41
4.3 Análise de morte celular	41
4.4 iMC induz a expressão de CD39 e CD73 na membrana das células MeWo.....	42

4.5 Modulação da expressão gênica em PBMC e MeWo.....	43
4.6 ELISA	49
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma: definição

O melanoma é um tumor maligno decorrente de mutações somáticas presentes nos melanócitos, células produtoras do pigmento conhecido por melanina (PAVRI et al., 2016; SHAIN; BASTIAN, 2016). Os melanócitos são células derivadas da crista neural e representam uma pequena população celular da camada basal da epiderme, tendo como função primordial prover a melanina para os queratinócitos. A melanina, por sua vez, é uma macromolécula capaz de absorver a radiação UV, portanto, essa molécula é utilizada pelos queratinócitos para proteger o núcleo celular contra danos no DNA que poderiam ser induzidos pela radiação. Em condições normais, os melanócitos passam por divisão celular menos de duas vezes ao ano, porém sua taxa de proliferação e produção de pigmento podem ser aumentadas quando há estímulo. Os queratinócitos produzem o hormônio estimulador alfa-melanócito (α -MSH), o qual se liga aos receptores dos melanócitos (MC1R) induzindo a sinalização para a síntese de melanina (melanogênese) (PAVRI et al., 2016).

Os queratinócitos maduros passam pelo processo de queratinização, perdem seu núcleo e morrem. Com esse processo, há a formação de uma barreira formada por melanina e células mortas na camada mais externa da pele com a finalidade de proteger as células vivas das camadas abaixo (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). Na presença de queratinócito com o DNA previamente danificado pela exposição à radiação UV, ocorre ativação da sua morte celular programada e liberação do hormônio estimulador da melanogênese. Essa via pode acabar por estimular de forma descontrolada a produção de melanina, aumentando a taxa de proliferação dos melanócitos e, conseqüentemente, favorecendo o desenvolvimento do câncer proveniente destas células (PAVRI et al., 2016). Ademais, variantes menos funcionais do receptor MC1R deixam o melanócito mais suscetível aos agentes mutagênicos e mais propensos

a acumular mutações em regiões sensíveis do seu genoma, podendo então evoluir para uma célula cancerígena (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Além de colonizarem a pele e os folículos pilosos, os melanócitos também podem ser encontrados, em menor quantidade, em outros sítios anatômicos como no trato uveal dos olhos, nas meninges, na mucosa da cavidade oral, nasal e trato anogenital (SHAIN; BASTIAN, 2016; MARGOLIS; MARKOVITS; MARKEL, 2019).

1.2 Epidemiologia do melanoma

Segundo a *American Cancer Society* (ACS), o câncer de pele é a doença maligna mais diagnosticada todos os anos nos Estados Unidos da América. O subtipo melanoma representa apenas 1% das neoplasias de pele, porém é o mais agressivo e apresenta alto índice de mortalidade. Há uma estimativa de 106.110 novos casos de melanoma e 7.180 mortes para o ano de 2021 nos Estados Unidos. Idosos acima dos 65 anos, especialmente do sexo masculino, apresentam risco aumentado de desenvolver o melanoma. Porém, essa patologia vem acometendo cada vez mais a população jovem, tendo se tornado o principal câncer diagnosticado em jovens adultos (entre 25-29 anos) e o segundo mais comum nas idades entre 15 e 29 anos, de acordo com dados obtidos da ACS em 2021 (SHANNAN et al., 2016).

No Brasil, esse câncer representa cerca de 3% das neoplasias malignas de pele. Dados mais recentes do Instituto Nacional de Câncer estimaram 8.450 novos casos por ano no Brasil, sendo 4.250 deles em mulheres. O número mais recente de mortes levantado -no ano de 2015- pelo Sistema de Informação de Mortalidade no Brasil por melanoma foi de 1.794, com a sua maioria (1.012) do sexo masculino (INCA, 2020). A incidência do melanoma tem crescido de forma alarmante, aumentado cerca de 3% a cada ano, a ponto de se tornar um importante problema socioeconômico em todo o mundo (SCHADENDORF et al., 2015; LI; CAI, 2019).

1.3 Fisiopatologia do melanoma

O melanoma consiste em uma doença de origem multifatorial, decorrente da interação entre exposição a fatores ambientais e susceptibilidade genética. Os raios UV possuem efeito genotóxico, portanto a exposição ao sol é o principal fator ambiental que predispõe risco ao melanoma. Quanto à susceptibilidade genética, podemos associar um aumento no risco para o desenvolvimento da doença com a presença de fatores como: mutações genéticas, histórico familiar de câncer de pele e presença de nevos melanocíticos (RASTRELLI et al., 2014).

Do ponto de vista molecular, diversos genes sofrem mutações somáticas que podem levar à progressão da doença. A presença de uma única mutação em um gene oncogênico nos nevos melanocíticos normalmente não é suficiente para desencadear o processo de malignidade, em geral ocorre um acúmulo de mutações secundárias para que essas lesões iniciais se tornem malignas. Essas mutações secundárias atuam em processos como proliferação celular, crescimento, apoptose ou controle de ciclo celular. O padrão de acúmulo dessas mutações e o seu desenvolvimento são as características que determinam os mais diversos subtipos da doença (SHAIN; BASTIAN, 2016; 2020).

As mutações genéticas mais prevalentes no desenvolvimento da doença envolvem perda ou ganho de função em oncogenes como BRAF, NRAS, NF1, CDKN2A, TERT, TP53 (SHAIN; BASTIAN, 2016; BASTIAN, 2014; DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). A mutação BRAF (V600K) é a mais comumente encontrada como iniciadora do processo de senescência dos melanócitos levando à formação de lesões precursoras como um nevo melanocítico benigno, que pode evoluir para um melanoma *in situ* e até mesmo um melanoma invasivo (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019; SHAIN; BASTIAN, 2020). Os nevos melanocíticos são resultado do acúmulo benigno de melanócitos, ou de células névicas, que culminam no que conhecemos popularmente por pintas ou manchas. Apesar da proliferação dos melanócitos apresentar desenvolvimento benigno, o aumento na sua contagem está diretamente ligado ao aumento do risco para melanoma (RASTRELLI et al.; 2014).

Cerca de 70% dos casos de melanoma envolvem mutações que alteram a via de sinalização MAPK, a qual é diretamente afetada pela carcinogênese induzida por radiação ultravioleta (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019; SHAIN; BASTIAN, 2020). Essa via atua no controle de proliferação, crescimento celular e migração em resposta a fatores de crescimento e seu mau funcionamento leva ao crescimento descontrolado das células envolvidas. A via de sinalização MAPK é, portanto, um importante alvo para intervenção terapêutica, assim como BRAF e NRAS, que atuam diretamente na sua regulação e estão mutados em cerca de 50% e 20% dos casos de melanoma, respectivamente (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019, SHANNAN et al., 2016).

As mutações nos genes CDKN2A e TERT são as mais comumente relacionadas à hereditariedade da doença e, portanto, estão comumente associadas ao histórico familiar. Essas mutações costumam estar relacionadas ao desenvolvimento de subtipos histopatológicos mais agressivos quando novas mutações proliferativas acontecem (SHAIN; BASTIAN, 2020). Alguns dos principais genes e suas respectivas incidências foram descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Incidência dos principais genes envolvidos no desenvolvimento do melanoma

Gene	Incidência
<i>BRAF</i>	~50% melanoma cutâneo
<i>KIT</i>	~25% melanomas por exposição crônica ao sol, acral, mucoso
<i>NRAS</i>	~50% nevos congênitos
<i>HRAS</i>	~15% nevos de Spitz, porém ausente em nevos displásicos congênitos e adquiridos
<i>GNAQ</i>	~85% nevo azul, ~50% melanoma uveal
<i>PTEN</i>	~10% dos melanomas
<i>TERT</i>	~30% primário, ~85% melanoma metastático
<i>NF1</i>	~15% melanoma cutâneo
<i>ARID2</i>	~10% melanoma cutâneo
<i>CDKN2A</i>	~25% melanoma cutâneo

FONTE: adaptado de Bradish e Cheng, 2014.

1.4 Caracterização e classificação do melanoma

O melanoma possui diversos subtipos devido à grande variabilidade biológica quanto à célula originária da lesão, o padrão de acúmulo das mutações, características clínicas e histopatológicas, comportamento metastático, exposição aos fatores de risco e características do hospedeiro como etnia, tipo de pele e idade de início da lesão (BASTIAN, 2014).

A classificação da doença que é aceita hoje foi desenvolvida há mais de três décadas por um grupo de pesquisadores da Universidade da Pensilvânia, baseando-se em critérios clínicos e histopatológicos que agruparam os variados tipos em quatro grandes grupos com atributos comuns: melanoma extensivo superficial (MES), melanoma nodular (MN), melanoma

lentigo maligno (MLM), melanoma lentiginoso acral (MLA) (CLARK; ELDER; VAN HORN, 1986).

O MES representa o subtipo mais comum, correspondendo a cerca de 70% dos casos e acomete adultos entre 40 e 60 anos de idade. Normalmente acomete o tronco e costas dos homens e as pernas em mulheres, estando relacionado à exposição intermitente ao sol. Clinicamente, o MES apresenta proliferação radial na epiderme e, superficialmente, na derme. Esse subtipo caracteriza-se por apresentar assimetria, irregularidade das bordas, formação de pápula palpável e grande variedade de coloração (RASTRELLI et al., 2014; KIBBI; KLUGER; CHOI, 2016).

O MN representa cerca de 15-20% dos melanomas, sendo mais comum no sexo masculino, especialmente em indivíduos com idade próxima de 60 anos. Esse subtipo normalmente acomete tronco, cabeça e pescoço, podendo ser ulcerativo (RASTRELLI et al., 2014). O MN tende a ter crescimento com rápida infiltração vertical e por esse motivo normalmente é diagnosticado em estágios avançados. Além disso, esse subtipo apresenta-se geralmente como um nódulo assimétrico com coloração uniforme, bordas regulares e diâmetro pequeno (KIBBI; KLUGER; CHOI, 2016).

O MLM representa em torno de 9% dos melanomas e está relacionado às lesões causadas em decorrência da exposição crônica ao sol. O efeito cumulativo desse subtipo acomete indivíduos de idade avançada e se manifesta, geralmente, no pescoço, couro cabeludo e orelhas em homens e nas bochechas e nariz em mulheres (RASTRELLI et al., 2014). O MLM é indolente, iniciando-se com a aparição de uma mácula de contorno irregular com colorações variando de marrom a preto (KIBBI; KLUGER; CHOI, 2016).

O MLA é o subtipo mais incomum, representando cerca de menos de 5% dos casos e, apesar de acometer todos os tipos de pele, é o mais incidente em pele negra e asiática. Em geral,

esse subtipo acomete pacientes idosos, com predominância no sexo feminino. O MLA manifesta-se na sola dos pés, palmas das mãos e regiões subungueais, podendo ser de difícil diagnóstico, pois no início pode se assemelhar a um processo benigno como verruga ou um hematoma (KIBBI; KLUGER; CHOI, 2016; RASTRELLI et al., 2014).

Com a finalidade de estabelecer um prognóstico mais detalhado sobre a doença, foram desenvolvidas outras duas métricas complementares à análise histopatológica. O índice de Breslow determina a espessura do tumor em milímetros e o nível de Clark caracteriza a profundidade de infiltração do melanoma (PUCKETT et al., 2021). As três análises foram utilizadas em conjunto para determinar o estadiamento da doença e a criação de *guidelines* de recomendação terapêutica (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019; SWETTER et al., 2019). O *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) propôs um sistema de categorização baseado na combinação dos seguintes atributos: (i) características histológicas do tumor primário; (ii) presença de linfonodos regionais acometidos pela doença; (iii) presença de metástase em outras regiões. Com essa nova orientação, os patologistas podem classificar a doença quanto ao estágio e correlacionar com o seu devido prognóstico e taxas de sobrevivência (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). Esse sistema de estadiamento da doença é internacionalmente aprovado e reconhecido e está em constante aprimoramento à medida que novos estudos vão avançando sobre a doença (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019; 19917835). A classificação do melanoma é muito importante para demonstrar a heterogeneidade fenotípica da doença, que antes não era conhecida, além de possibilitar a definição de diferentes tratamentos e possíveis prognósticos a depender de em qual categoria o melanoma se enquadra (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

1.5 Diagnóstico

Nos últimos anos, foram desenvolvidos alguns métodos para levantar a suspeita diagnóstica do melanoma. Dentre eles, o mais conhecido é a regra do ABCDE, que apresenta características suspeitas da lesão como: assimetria, bordas irregulares, coloração variável,

diâmetro maior que 6mm e evolução (SINGH; GUPTA, 2019). O *Glasgow 7-point checklist* representa outro método que utiliza 7 critérios para avaliar e pontuar a lesão: (a) mudança na sensibilidade, (b) diâmetro maior que 1cm, (c) crescimento recente, (d) bordas irregulares, (e) pigmentação irregular, (f) inflamação, (g) sangramento. Com essas metodologias, o médico é capaz de identificar potenciais focos de lesões malignas e prosseguir para estudos mais apurados sobre a lesão (SINGH; GUPTA, 2019).

A análise clínica e a dermatoscopia são essenciais como triagem diagnóstica, entretanto a biópsia com estudo histopatológico é fundamental, sendo considerada como método ouro para confirmar e analisar o subtipo do câncer com a finalidade de direcionar corretamente o tratamento (SINGH; GUPTA, 2019; MAR et al., 2017). A detecção e tratamento precoces são cruciais para que os pacientes tenham um melhor prognóstico e menor mortalidade (RASTRELLI et al., 2014; DONNELLY; AUNG; JOUR, 2019).

1.6 Tratamento

Após o diagnóstico e a caracterização do melanoma, a excisão cirúrgica segue como padrão ouro para o tratamento dessa neoplasia (PAVRI et al., 2016). Em estágios iniciais, apenas a cirurgia já pode ser suficiente para garantir sucesso terapêutico com altas taxas de sobrevivência. Já em estágios mais invasivos e metastáticos, a doença tem mais difícil manejo e as taxas de sobrevivência diminuem drasticamente (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). Para os casos mais agressivos, a quimioterapia com dacarbazina era a única opção até pouco tempo, porém sua alta toxicidade exigiu que novas drogas fossem desenvolvidas e seu uso fosse cada vez mais restrito (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). Nessa linha, os tratamentos com imunomodulação e a terapia-alvo molecular vêm sendo amplamente estudados e têm apresentado grandes benefícios com relação à abordagem terapêutica anterior para a doença (PAVRI et al., 2016).

O uso da interleucina 2 (IL-2) como imunoterapia passiva foi uma das primeiras drogas a ser aprovada pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) como tratamento para o melanoma metastático. A IL-2 atua como agente imunomodulador, ativando a resposta imune do hospedeiro para que ocorra o ataque contra as células malignas (PAVRI et al., 2016).

Como terapia-alvo molecular, alguns medicamentos foram aprovados entre os anos de 2011 e 2013 para uso como o vemurafenib e o dabrafenib, os quais atuam similarmente como inibidores de BRAF (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). O ipilimumab é um anticorpo monoclonal que atua como inibidor de CTLA-4, aumentando o reconhecimento e resposta do sistema imune do hospedeiro às células tumorais (PAVRI et al., 2016). A molécula PD-1 presente nas células T atuam como imunossupressores, estimulando negativamente sua ativação e proliferação. A utilização de anti-PD-1 (pembrolizumab ou nivolumab) como tratamento também tem apresentado resultados satisfatórios para aumentar a resposta do hospedeiro contra a neoplasia (PAVRI et al., 2016). Recentemente, essas terapias têm apresentado bons resultados, com respostas duradouras e poucos efeitos colaterais quando utilizadas de forma combinada, contudo, ainda não há um consenso sobre qual seria o melhor protocolo de combinação terapêutica a ser utilizada (PAVRI et al., 2016).

1.7 Microambiente do melanoma

O termo secretoma vem sendo utilizado desde os anos 2000 e ele engloba o conjunto de todas as macromoléculas bioativas secretadas pela célula no compartimento extracelular, representando a contribuição biológica do câncer no microambiente tumoral. Este produto vem sendo amplamente estudado sobretudo no que diz respeito ao secretoma produzido por células tumorais, pois estas são capazes de desenvolver habilidades para modificar o perfil de moléculas secretórias no microambiente no qual se encontram (DONADELLI, 2018).

A capacidade do melanoma tornar-se invasivo e metastático está diretamente relacionada com o microambiente produzido pelas células tumorais (Figura 1) (TUCCI et al., 2014). Nesse sentido, cabe ressaltar que como os demais tumores sólidos, o melanoma apresenta grande infiltrado de células imunes além de ser diretamente influenciado pelas citocinas e fatores de crescimento presentes no meio tumoral (LADÁNYI, 2015; SHANNAN et al., 2016). Todos esses fatores contribuem para a dinâmica de crescimento e desenvolvimento do tumor em fenótipos tão heterogêneos, porém essa dinâmica ainda não está totalmente esclarecida na literatura (SHANNAN et al., 2016). De fato, há evidências na literatura de que o melanoma é um câncer altamente imunogênico e que poderia evadir e controlar o sistema imune (29164593; TUCCI et al., 2014; MARGOLIN, 2014). Entretanto, existem relatos de que a resposta imune adaptativa pode apresentar uma resposta antitumoral eficiente no estágio inicial da doença (GIAVINA-BIANCHI et al., 2017). Nessa linha, alguns estudos demonstram que é possível correlacionar a presença de infiltrado linfocitário no seu microambiente, principalmente de células T, com um prognóstico favorável para o paciente e, até mesmo, com a regressão espontânea do tumor (LADÁNYI, 2015; MAIO, 2012).

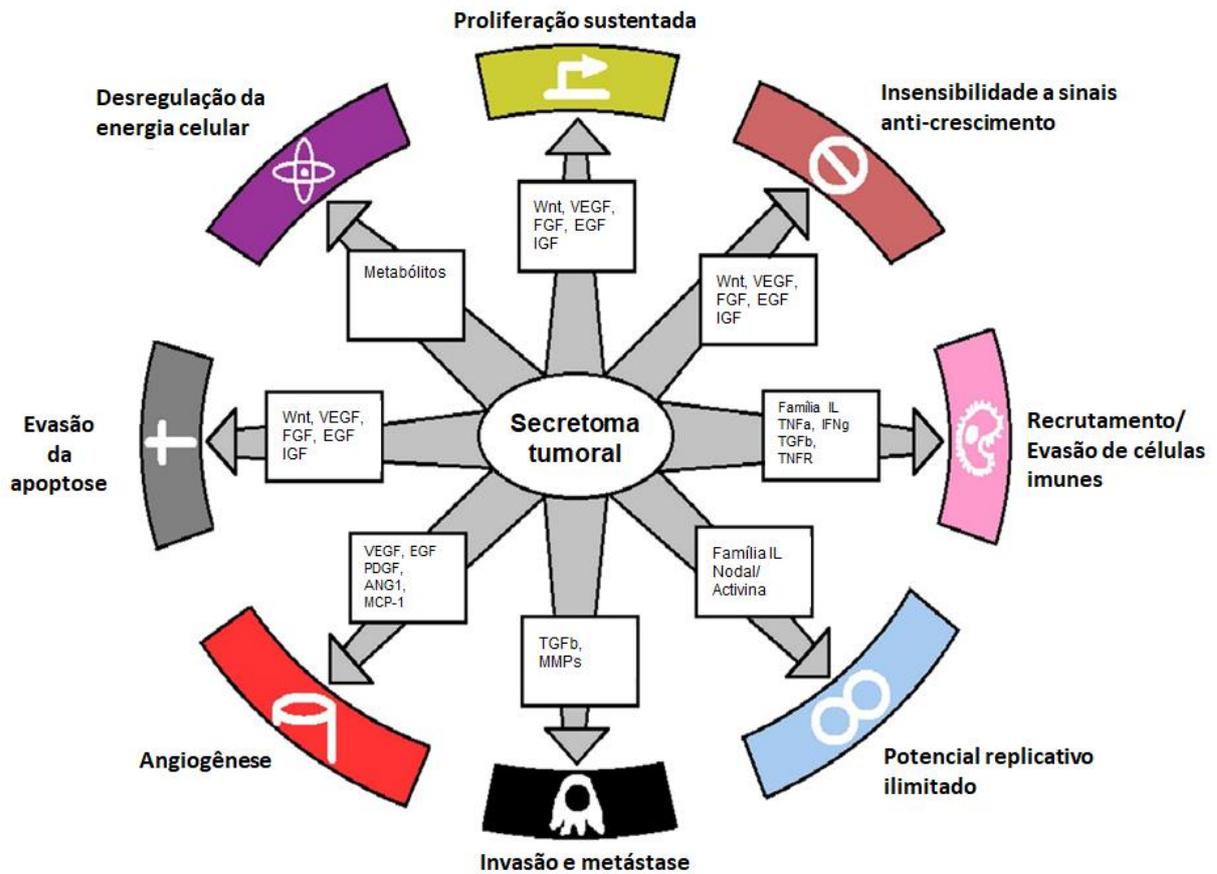


Figura 1 - Função oncogênica do secretoma tumoral. Impacto das macromoléculas encontradas no microambiente tumoral para o desenvolvimento do câncer.

Adaptado de PALTRIDGE; BELLE; KHEW-GOODALL, 2013.

1.8 Relação do melanoma com a resposta imune

O melanoma é uma das neoplasias com mais alta taxa de mutações descritas, por esse motivo, ele é capaz de apresentar diversos antígenos tumorais que podem ser reconhecidos pelo sistema imune, especificamente pelos TCRs dos linfócitos TCD8+. Essa característica que o torna um câncer altamente imunogênico (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019). Uma vez que esses antígenos aberrantes começam a atrair os linfócitos T para o local do tumor, esses linfócitos passam a ser chamados de linfócitos infiltrantes do tumor (TILs). Essa relação entre o tumor e o sistema imune passa por três diferentes fases: eliminação, equilíbrio e evasão (BURUGU; ASLEH-ABURAYA; NIELSEN, 2017). Na primeira fase, o sistema imune atua

reconhecendo e matando as células tumorais. No equilíbrio, há crescimento constante das células tumorais, porém esse crescimento é contrabalanceado pela morte celular. Quando o tumor desenvolve estratégias hábeis para evadir e neutralizar o sistema imune, está caracterizada a terceira fase (evasão). A ausência de TILs em uma biópsia indica, portanto, pior prognóstico para o paciente, já que demonstra que o tumor foi capaz de evadir o sistema imune e crescer livremente (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Já há relatos na literatura de que o desenvolvimento de um nevo displásico para uma lesão maligna depende, além das mutações em regiões promotoras, da interação célula-a-célula com sistema imune que o circunda. Sabe-se que um dos importantes marcadores histopatológicos que indicam a presença de um nevo já em estágio displásico é a presença crônica de infiltrado de células linfocitárias. Essa interação da lesão inicial com o sistema imune poderia então ser a causa da involução desses nevos, de forma a lentamente eliminar a lesão (SHAIN; BASTIAN, 2020).

Essa atração dos nevos às células do sistema imune pode ocorrer devido a eventos como: o acúmulo de mutações somáticas conhecidas por induzirem sinais de morte celular; ou até mesmo pela formação de neoepítomos decorrentes dessas mutações, que fazem com que as células sejam reconhecidas como “estranhas” e tenham de ser eliminadas (SHAIN; BASTIAN, 2020).

Há evidências interessantes que reforçam a forte relação entre a formação exagerada de nevos melanocíticos com imunossupressão. Condições como a gravidez, doenças ou terapias que induzem o indivíduo a um estado imunossuprimido levam a um aumento na proliferação dos melanócitos (SHAIN; BASTIAN, 2020). Por esse motivo é possível inferir que os linfócitos infiltrantes do tumor são moduladores importantes na progressão do melanoma e, portanto, passaram a ser alvos interessantes a serem estudados para atuar no combate desse câncer (MAIBACH et al., 2020). Portanto, é fundamental compreender melhor a dinâmica complexa

que existe entre as células tumorais e o seu microambiente para que seja possível avançar com novas propostas terapêuticas para o melanoma (SHANNAN et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Investigar o efeito do meio condicionado de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) sobre a capacidade de imunoescape da linhagem de melanoma metastático MeWo.

2.2 Objetivos Específicos:

MEWO

- Submeter a linhagem MeWo ao meio condicionado de PBMC e determinar a expressão de transcritos que codificam fatores anti-inflamatórios;
- Determinar a expressão de ectoenzimas CD39 e CD73 na membrana das células MeWo sob estímulo do meio condicionado de PBMC;

PMBC

- Determinar se o secretoma gerado pelo melanoma modula a ativação linfocitária;
- Determinar a proliferação de linfócitos T cultivados em meio enriquecido com o secretoma da linhagem MeWo;
- Avaliar se o secretoma gerado pelo melanoma é capaz de induzir apoptose de linfócitos T;
- Avaliar nas PBMCs expostas ao secretoma do melanoma a expressão de genes associados aos processos de morte, divisão celular e resposta imune;
- Caracterizar a produção de IL-10 e INF- γ no microambiente de PBMC exposto ao secretoma da MeWo;

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta de amostras

Neste estudo utilizamos amostras de sangue periférico de doadores saudáveis (n=6). Os critérios de elegibilidade foram: adultos sem comorbidades de fundo imunológico pré-existente, que não tivessem utilizado anti-inflamatório ou corticosteroides nas duas últimas semanas e que não estivessem com nenhum sinal de doença atual. A obtenção das amostras de sangue periférico e execução dos experimentos foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde.

Cada doador foi submetido à punção de 20ml de sangue total, coletados em tubos estéreis com anticoagulante EDTA. Essas amostras foram utilizadas imediatamente para o isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), através do uso do gradiente de densidade Histopaque-1077 (Sigma Aldrich), conforme descrito a seguir.

3.2 Isolamento das PBMCs

Para isolamento das PBMCs por uso do gradiente de densidade com Ficoll-Histopaque-1077 (Sigma Aldrich), as amostras foram diluídas com tampão PBS (proporção 1:2). Em seguida, cada amostra foi adicionada de 3ml de Histopaque, sem que houvesse mistura entre as partes. Os tubos foram centrifugados por 25 minutos a 360g, permitindo a formação de um anel de PBMCs, que foi coletado por pipetagem. As células obtidas foram lavadas duas vezes com tampão PBS, utilizando centrifugação de 360g por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% FBS e submetidas a contagem celular em da Câmara de Neubauer.

3.3 Preparo do meio condicionado de PBMCs

Para preparo dos meios condicionados, as PBMCs foram cultivadas (1.10^6 células/ml) por 72 horas em duas condições diferentes: i) em meio RPMI com 10% FBS (MC); ii) em meio RPMI com 10% FBS e suplementado com fitohemaglutinina (PHA) na concentração de $10\mu\text{g/ml}$ (iMC). Após esse período, conteúdo foi recolhido e centrifugado a 360g por 10 minutos. O sobrenadante resultante desse cultivo foi recolhido e armazenado a -80°C para ser utilizado como meio condicionado na produção do secretoma da MeWo.

3.4 Cultivo da Linhagem e preparo do secretoma da MeWo

Como modelo de melanoma, utilizamos a linhagem de melanoma metastático MeWo (ATCC HTB-65), derivada de linfonodo humano. Essas células foram cultivadas nos meios condicionados MC, iMC e em RPMI (proporção 1:2), conforme detalhado a seguir.

A linhagem de melanoma MeWo foi expandida em garrafas de 75cm^2 com 10ml de RPMI suplementado com 10% de FBS até atingir 70% de confluência, durante esse período foi realizada a troca de 5ml de meio a cada 48 horas. A partir desse ponto, todo o meio das garrafas foi retirado e as células foram mantidas por 24 horas em cultivo com RPMI suplementado com 10% FBS, MC ou iMC. Após esse período, os meios foram recolhidos, as células foram lavadas com tampão PBS e foram acrescentados 5ml de RPMI sem FBS em todas as garrafas. Após 15 horas de cultivo, os meios foram recolhidos e aliqüotados em *ependorfs* para serem utilizados como o secretoma do melanoma submetido a três diferentes condições: controle (Sec), tratados com o MC (nSec) e tratados com iMC (iSec), conforme Figura 2.

Em todos os ensaios descritos a seguir, as PBMCs foram submetidas ao cultivo em RPMI enriquecido com 50% v/v de Sec, nSec ou iSec. Como controle, as PBMCs foram cultivadas com meio RPMI. Em todas as condições, as células foram mantidas com suplementação de 10% de FBS e estimuladas com PHA ($5\mu\text{g/ml}$).

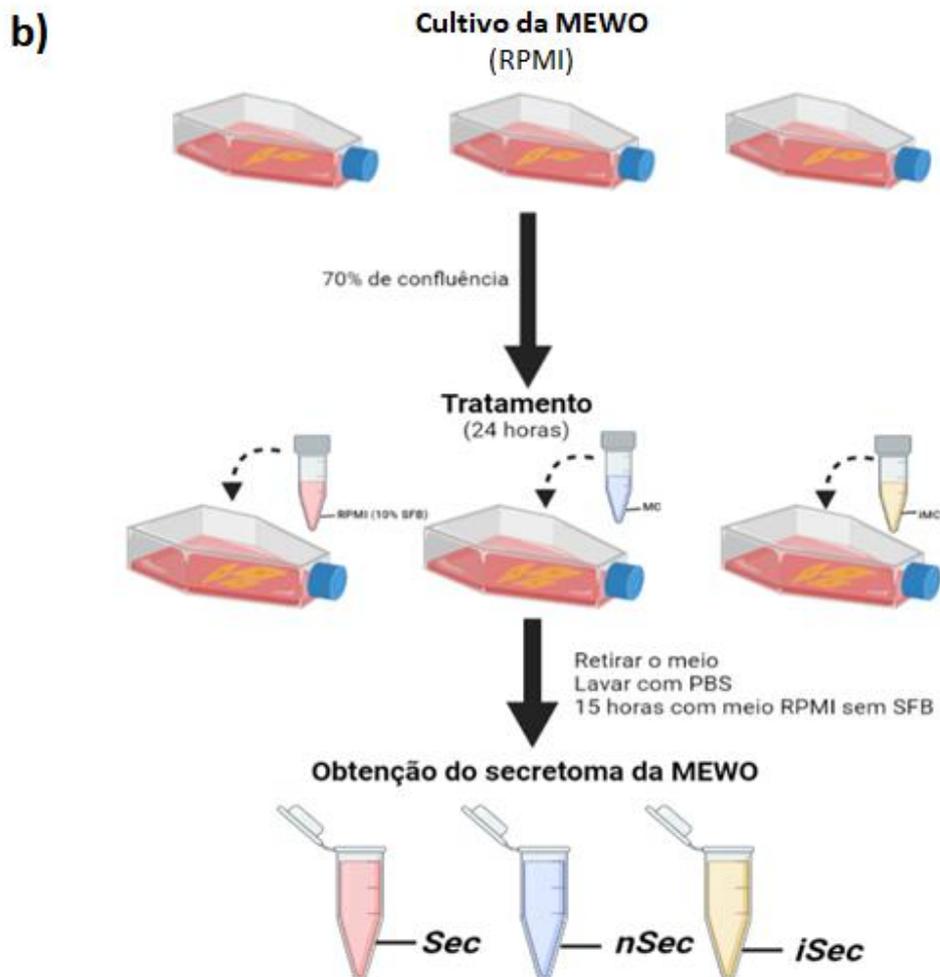
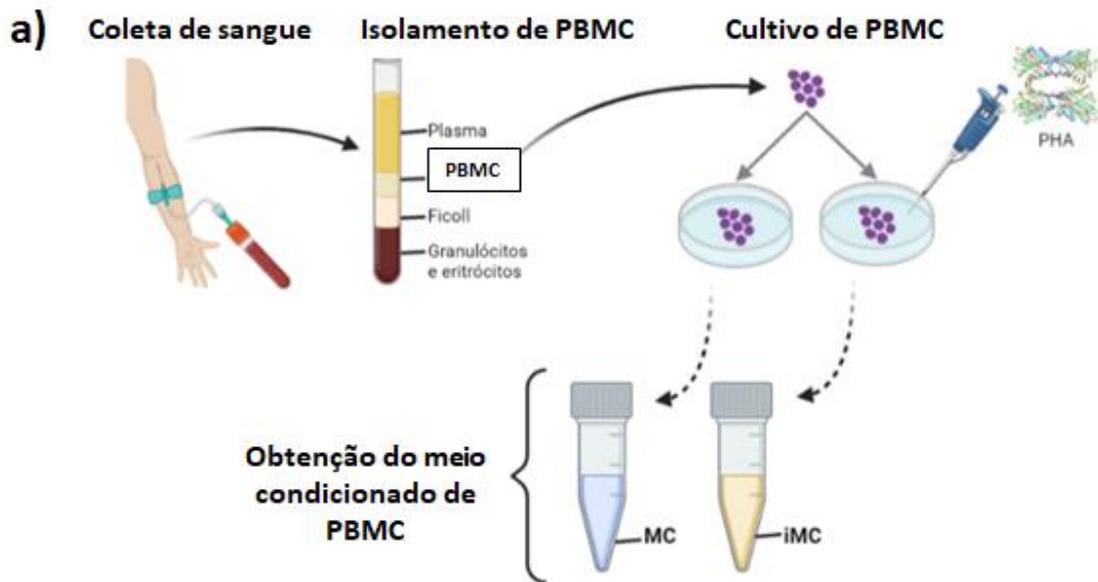


Figura 2 - Desenho experimental utilizado no estudo. a) Estratégia de preparo dos meios condicionados MC e iMC; b) Cultivo da linhagem MeWo para a obtenção do secretoma do melanoma (Sec, nSec, iSec). SFB: soro fetal bovino; PBMC: células mononucleares do sangue periférico; PHA: fitohemaglutinina.

3.5 Ativação linfocitária

Para avaliar se o secretoma da MeWo modula o padrão de ativação dos linfócitos T, investigamos a expressão de CD69 e HLA-II na superfície dessas células, através da técnica de citometria de fluxo.

As PBMCs (2×10^5), estimuladas com $5 \mu\text{g/ml}$ de PHA, foram cultivadas em placas de 96 poços com Sec, nSec e iSec por 24 horas. Após esse período, as amostras foram recolhidas e centrifugadas para se obter o *pellet* celular. As células foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente com anti-CD3-APC e o anticorpo de ativação em estudo (anti-CD69-FITC ou anti-HLA-DR-FITC, Invitrogen). Após marcação, as células foram lavadas com tampão PBS e a leitura foi realizada no equipamento FACSCalibur™. A análise foi feita no software FlowJo.

3.6 Proliferação celular

Avaliamos por citometria de fluxo a capacidade de proliferação células de linfócitos T cultivados com Sec, nSec e iSec. Para isso realizamos marcação prévia das células com *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE, Sigma Aldrich), um marcador fluorescente intracelular que, a cada divisão celular, passa a apresentar metade da concentração do marcador nas células-filhas. Dessa forma, é possível avaliar quantas gerações celulares existem na amostra analisada (LYONS; PARISH, 1994).

Em suma, 1.10^7 PBMCs foram marcadas com $5 \mu\text{M/ml}$ CFSE e incubadas em banho-maria a 37°C por 7,5 minutos. Posteriormente, a marcação foi interrompida com a adição de

10ml de RPMI suplementado com 10% de FBS e as amostras foram mantidas em refrigeração por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com tampão PBS utilizando centrifugação de 360g por 10 minutos. Por fim, as PBMCs foram ressuspensas em RPMI e contadas em Câmara de Neubauer.

Após a marcação com CFSE, 2×10^5 PBMCs foram cultivadas (placas de 96 poços) em Sec, nSec e iSec. Após 120 horas de cultivo - em incubadora a 37°C com 5% de CO₂-, as células foram recolhidas, centrifugadas a 2.000rpm por 5 minutos e lavadas com tampão PBS. O *pellet* celular foi marcado com anti-CD3-APC (BD Biosciences), incubado a temperatura ambiente por 15 minutos, depois foi lavado novamente para remover o excesso de anticorpos livres. A leitura foi realizada no equipamento FACSCalibur™ e a análise foi feita no software FlowJo (versão 10). Todo o processo de marcação com CFSE e plaqueamento foi realizado ao abrigo de luz para que não houvesse decaimento da fluorescência.

3.7 Análise de morte celular

A morte celular foi determinada pelo ensaio de anexina V/iodeto de propídio. O ensaio utilizado permite diferenciar células saudáveis e células em morte celular. A Anexina é uma molécula que não é capaz de penetrar a membrana celular, porém se liga à fosfatidilserina, um fosfolípido intracelular que só é exposto após a indução da apoptose. O PI é um marcador intercalante de DNA também impermeável à célula, ou seja, dependente de dano celular prévio para acessar o núcleo - como em estágios avançados da apoptose ou necrose celular. Por esse motivo, esse ensaio nos permite diferenciar os grupos com marcação duplo negativa (células saudáveis) e anexina V positiva (células em estágio de apoptose inicial) (PIETKIEWICZ et al., 2015).

As PBMCs (2×10^5), estimuladas com 5µg/ml de PHA, foram cultivadas em placas de 96 poços com Sec, nSec e iSec por 72 horas. Após esse período, as células foram recolhidas e

centrifugadas a 2.000rpm por 5 minutos. Para marcação, as células foram incubadas com anexina-V (FITC- Invitrogen) por 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas e ressuspendidas em 300µl tampão de anexina. Em seguida, as células foram marcadas com iodeto de propídio (ThermoFisher) e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. O equipamento utilizado foi o FACSCalibur™ e as análises foram realizadas no software FlowJo.

3.8 Expressão das ectoenzimas CD39 e CD73 na linhagem MeWo

Para avaliação da expressão das ectoenzimas CD39 e CD73, as células MeWo foram submetidas ou não ao MC e iMC, por 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas com tampão PBS e incubadas por 15 minutos com anti-CD39-FITC (Invitrogen) e anti-CD73-APC (BD). Foi feita mais uma lavagem após a marcação com os anticorpos e as células foram ressuspendidas em 300µl de PBS para aquisição. A leitura foi realizada no equipamento FACSCalibur™ e a análise foi feita no software FlowJo.

3.9 PCR em tempo real

O perfil de expressão gênica relacionado aos processos em estudo foi avaliado pela metodologia de PCR em tempo real. Para isso, PBMCs ($1,25 \times 10^6$), ativadas com PHA, foram cultivadas em placas de 24 poços por 120 horas nos meios Sec, nSec ou iSec. As amostras foram então recolhidas e centrifugadas a 2.000rpm por 5 minutos para a formação de *pellet* celular. Do mesmo modo, obtivemos *pellet* celular de células MeWo, cultivadas com MC e iMC. As células foram então submetidas à extração de RNA, por uso de Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

Após obtenção do RNA, foi realizada uma análise quantitativa e qualitativa desse material por espectrofotometria no equipamento *NanoVue Plus* (GE Healthcare). Em seguida, foi realizada a síntese do cDNA, por uso do *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (ThermoFisher), no termociclador (BioRad), seguindo as recomendações do fabricante.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento StepOne Plus (ThermoFisher), por uso da metodologia SYBR *green*. Os genes analisados nas PBMCs foram CTLA-4, TIM-3, LAG-3, KI-67, ROR γ T, IL-10, TGF, IFN, FOXP3, Gata3, CDK-1, Tbet, PD-1, Casp3, BAX. Na linhagem MeWo avaliamos PDL-1, TGF, IL-10, IDO, IFN γ . Os primers utilizados nesse estudo estão descritos na Tabela 2. As análises foram realizadas pela metodologia DDct, após normalização com a expressão do gene calibrador GAPDH (PMID: LIVAK; SCHMITTGEN, 2001)

Tabela 2. Genes investigados e sequência de primers utilizadas nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Primer	Sequência
GAPDH	<i>Foward</i>	TCAACGACCACCTTTGTCAAGCTCAGCT
	<i>Reverse</i>	GGTGGTCCAGGGGTCTTAC
FOXP3	<i>Foward</i>	GCACATTCCCAGAGTTCCT
	<i>Reverse</i>	TTGAGTGTCCGCTGCTTC
ROR γ T	<i>Foward</i>	CTGCTGAGAAGGACAGGGAG
	<i>Reverse</i>	AGTTCTGCTGACGGGTGC
PD-1	<i>Foward</i>	ATGAAGGCCCTGGACTAAGA
	<i>Reverse</i>	TGTCCTGCAGAGAAACACAC
TBET	<i>Foward</i>	GGATGCGCCAGGAAGTTTCA
	<i>Reverse</i>	GACTGGAGCACAATCATCTGGG
GATA-3	<i>Foward</i>	AGCACAGAAGGCAGGGAGTGT
	<i>Reverse</i>	TGATAGAGCCCGCAGGCG
CTLA4	<i>Foward</i>	CATCCCTGTCTTCTGCAAAGCAA
	<i>Reverse</i>	CAGTGGCTTTGCCTGGAGAT
LAG-3	<i>Foward</i>	TCACATTGGCAATCATCACAGTG
	<i>Reverse</i>	CGTTCTTGTCCAGATACTGGAGT
TIM3	<i>Foward</i>	CTGCTGCTGCTACTACTTACAAGG
	<i>Reverse</i>	AGACGGGCACGAGGTTCC
BAX	<i>Foward</i>	CAGACCGTGACCATCTTTGT
	<i>Reverse</i>	GCCTCAGCCCATCTTCTTC
CDK1	<i>Foward</i>	CTTGGCTTCAAAGCTGGCTC
	<i>Reverse</i>	GGGTATGGTAGATCCCGGCT
IL-10	<i>Foward</i>	GGCACCAGTCTGAGAACAG
	<i>Reverse</i>	ACTCTGCTGAAGGCATCTCG
Ki-67	<i>Foward</i>	TAACACCATCAGCAGGGAAAG
	<i>Reverse</i>	CTGCACTGGAGTTCCATAAA
CASP3	<i>Foward</i>	CTAGCGGATGGGTGCTATTG
	<i>Reverse</i>	GATACACAGCCACAGGTATGAG
TGF β 1	<i>Foward</i>	GCTGTATTTAAGGACACCGTGC
	<i>Reverse</i>	TGACACAGAGATCCGCAGTC
IDO	<i>Foward</i>	GGGAAGCTTATGACGCCTGT
	<i>Reverse</i>	CTGGCTTGCAGGAATCAGGA
IFN γ	<i>Foward</i>	ACTGTCGCCAGCAGCTAAAA
	<i>Reverse</i>	TATTGCAGGCAGGACAACCA
PD-L1	<i>Foward</i>	AAACAATTAGACCTGGCTG
	<i>Reverse</i>	TCTTACCACTCAGGACTTG

FONTE: a autora.

3.10 Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA

Os níveis de IFN γ e IL-10 no sobrenadante das PBMC cultivadas em Sec, nSec e iSec foram determinados pela técnica de ELISA sanduíche de captura (Immunotools), seguindo recomendações do fabricante. A absorbância de cada poço foi mensurada a 450nm em leitor de microplacas Multiskan FC (ThermoScientific).

3.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPadPrism (versão 7.0). Inicialmente utilizamos o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. As variáveis que tiveram distribuição normal foram analisadas por ANOVA (com pós teste Tukey), enquanto as variáveis que não se apresentaram normalmente distribuídas foram avaliadas pelo teste de Friedman (com pós teste Dunn's). Foram considerados estatisticamente significativos os resultados que apresentaram diferença entre os grupos com valor de $p < 0,05$. Os níveis de significância foram apresentados como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; e **** $p < 0.0001$.

4. RESULTADOS

4.1 iSec diminuiu a ativação de linfócitos T

O secretoma da MeWo foi capaz de modular a expressão dos marcadores de ativação linfocitária, conforme demonstrado na Figura 3. Apesar de não termos detectado diferenças estatisticamente significativas, notamos que as PBMCs expostas ao iSec apresentaram redução média de 49,25% quanto a expressão de CD69, com relação ao grupo controle. Com relação à análise da expressão de HLA-II, as PBMCs tratadas com o secretoma iSec mostraram diminuição significativa desse marcador ($p=0,01$), com relação ao grupo controle. Foi possível perceber que, de maneira geral, o secretoma da MeWo produzido com o estímulo de PBMC em meio inflamado (iSec) produziu efeitos mais marcados que os demais.

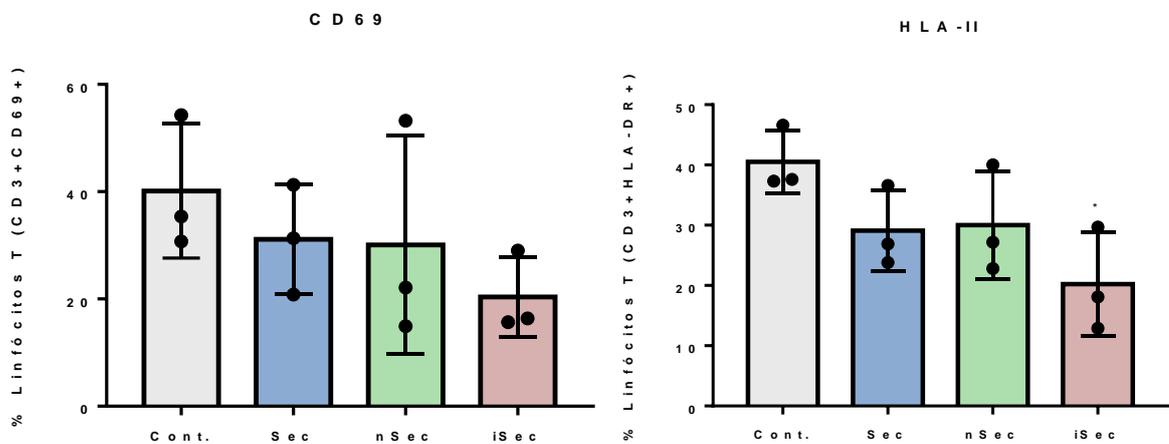


Figura 3. Ativação linfocitária. PBMCs foram cultivados por 24 horas com RPMI (controle), Sec, nSec ou iSec. Posteriormente, foi determinada a expressão de CD69 e HLA-DR em células CD3. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica. Os dados representam média e desvio padrão. A análise estatística aplicada foi análise de variância para testes pareados não paramétricos – Friedman test. *, $p < 0.05$.

4.2 nSec e iSec controlam a proliferação de linfócitos T

O secretoma da MeWo influenciou diretamente na proliferação celular dos linfócitos T analisados. Como pode ser visto na Figura 4, o cultivo das PBMCs com nSec e iSec controlou de modo significativo a proliferação dos linfócitos T ($p= 0,005$, para ambos) comparados ao grupo controle.

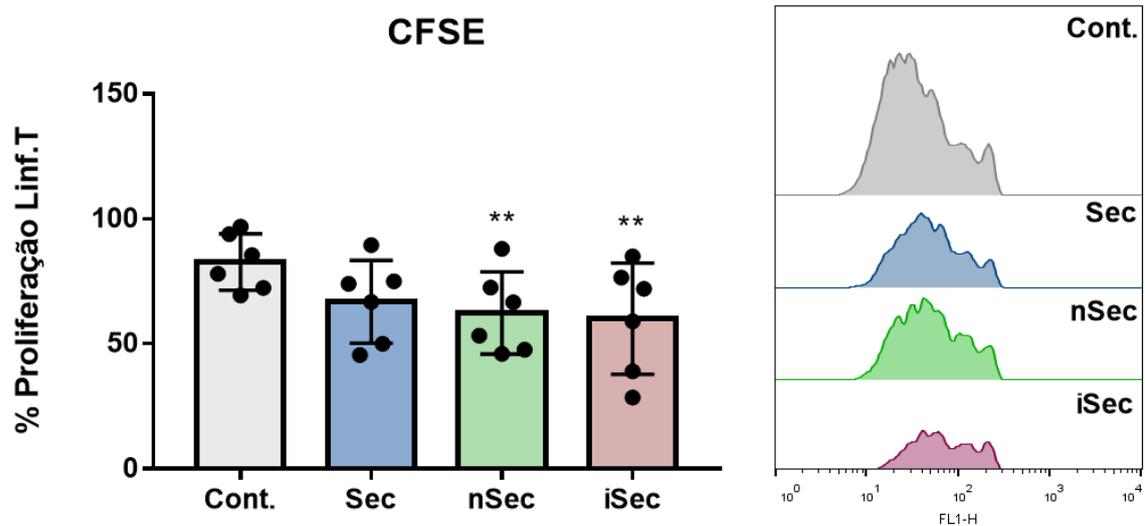


Figura 4. Proliferação linfocitária. PBMCs (n=6) foram cultivados por 120 horas com RPMI (controle), Sec, nSec ou iSec. Posteriormente, foi determinada a porcentagem de CFSE em células CD3. No gráfico à esquerda, os dados representam média e desvio padrão. O histograma à direita é representativo de uma amostra analisada. A cor cinza representa o grupo controle, azul Sec, verde nSec e rosa iSec. Os dados foram analisados pelo teste de Friedman, com pós teste de Dunn's. * $p < 0,05$ ** indica $p < 0,01$.

4.3 Análise de morte celular

Quanto ao ensaio de morte celular, apesar de não encontrarmos diferenças estatisticamente significativas, evidenciamos claramente que na presença de Sec, nSec ou iSec existe aumento na porcentagem de células viáveis, conforme Figura 5.

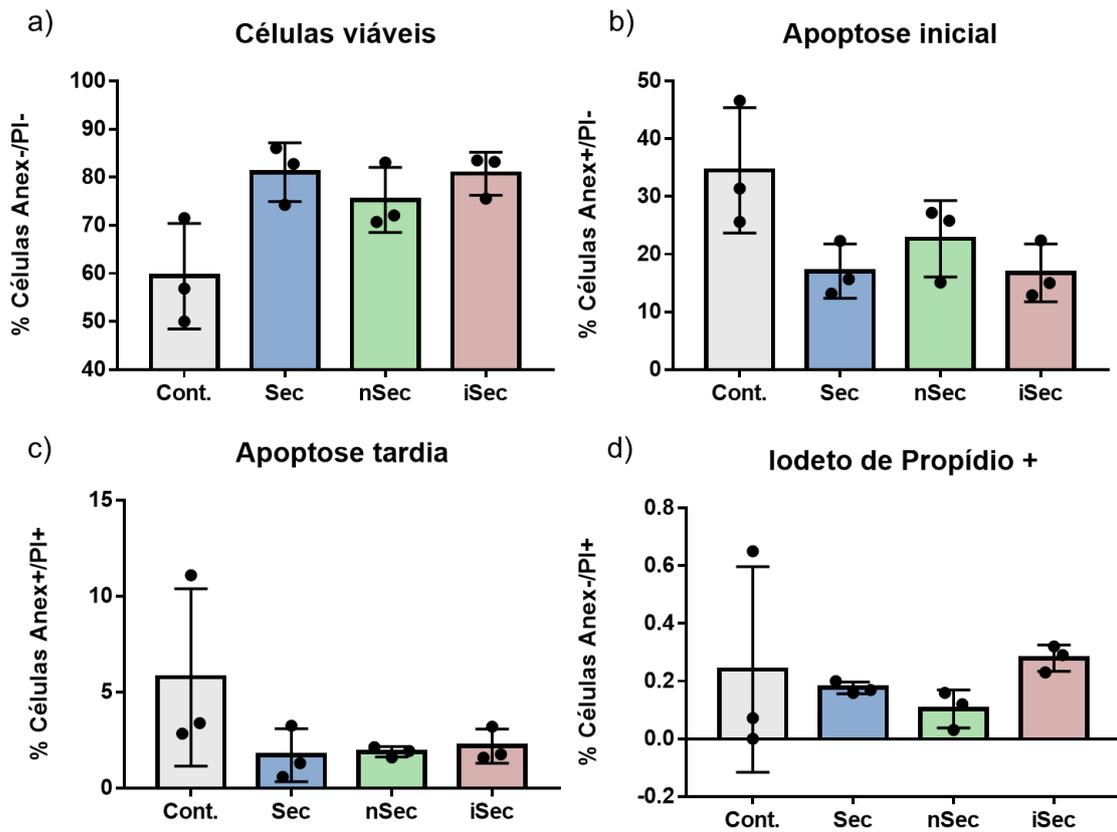


Figura 5. Avaliação de morte celular. PBMCs foram cultivados por 72 horas com RPMI (controle), Sec, nSec ou iSec. Posteriormente, as células foram marcadas com anexina V e Iodeto de propídio. (a) Porcentagem de células viáveis; (b). Porcentagem de células em apoptose inicial; (c) Porcentagem de células em apoptose tardia; (d) Porcentagem de células positivas para iodeto de propídio. Os dados representam média e desvio padrão e o ensaio foi conduzido com triplicata biológica. Os dados foram analisados pelo teste de Friedman, com pós teste de Dunn's.

4.4 iMC induz expressão de CD39 e CD73 na membrana das células MeWo

As ectoenzimas CD39 e CD73 atuam no metabolismo de ATP e na geração de adenosina. A adenosina é capaz de controlar a resposta imune por induzir a geração de cAMP em linfócitos T ativados (FUMAGALLI et al., 2016) É interessante, pois detectamos um aumento significativo na expressão de CD39+ nas células MeWo cultivadas em iMC quando comparadas ao grupo controle ($p= 0,004$) e ao MC ($p=0,03$). Comparando com o grupo controle, notamos que a molécula CD73+ também foi realçada na membrana da MeWo quando essas células foram expostas ao iMC ($p= 0,002$), comparadas ao grupo controle. As células expostas ao iMC também mostraram aumento na expressão de CD73, compradas ao cultivo em MC ($p= 0,003$). Os resultados foram demonstrados na Figura 6.

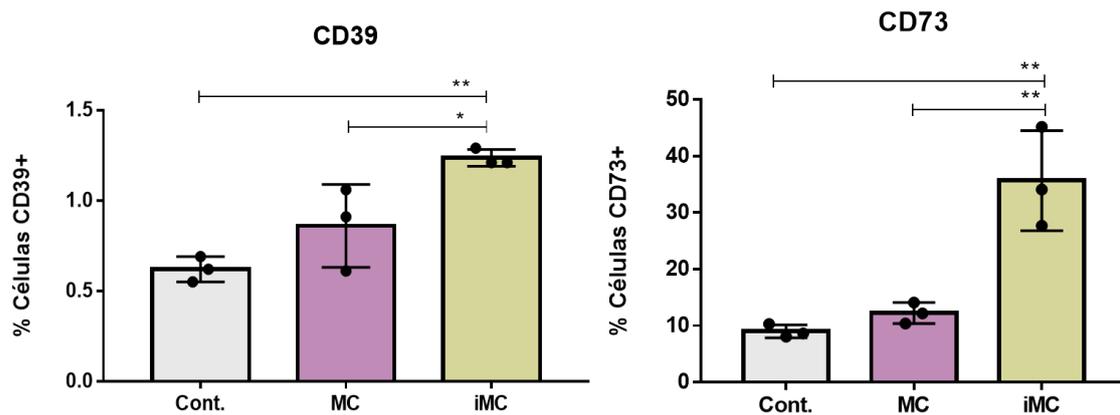
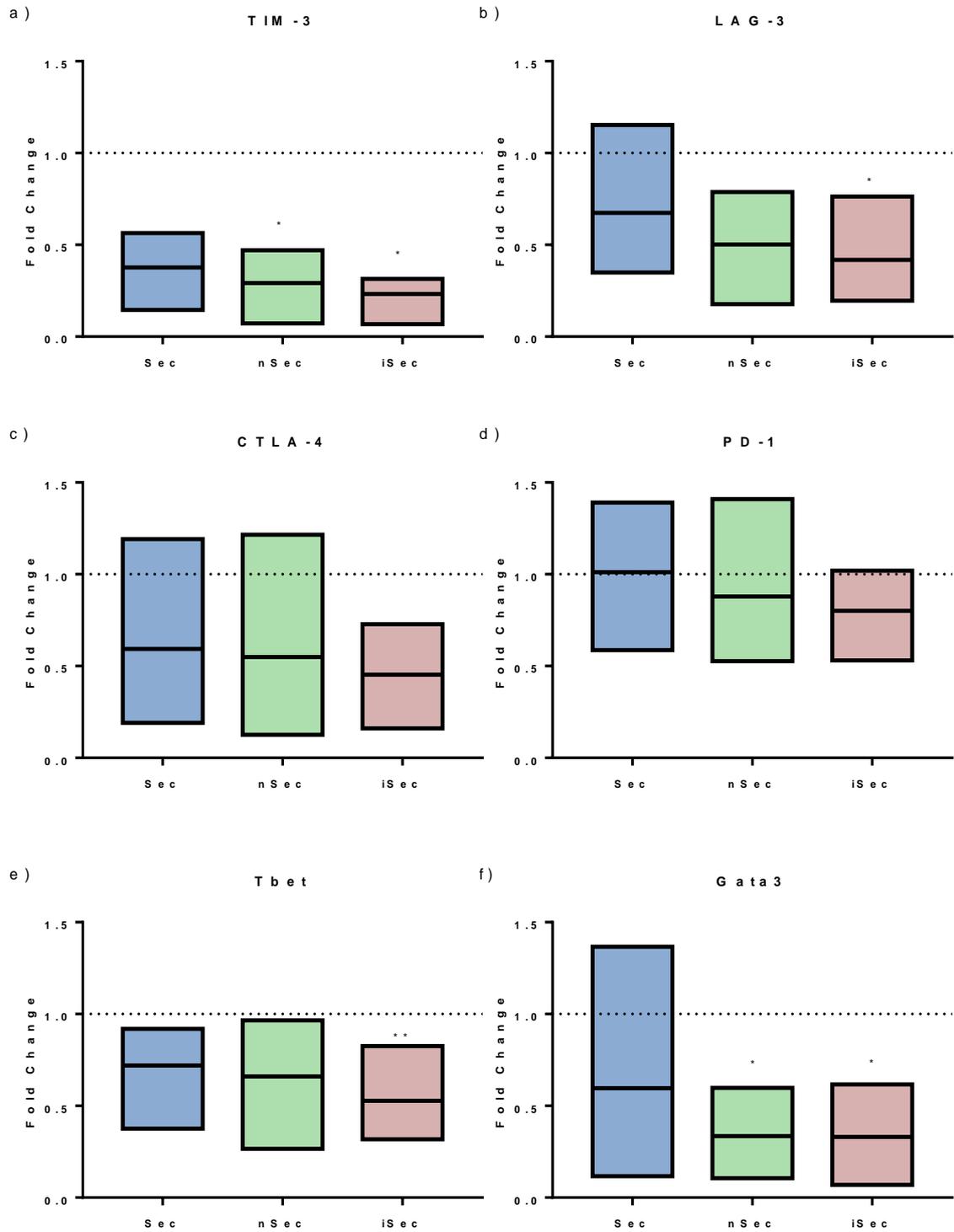


Figura 6. Expressão de CD39 e CD73 na linhagem MeWo. Células MeWo foram cultivadas em RPMI (controle), MC e iMC por 24 horas. Posteriormente, as células foram analisadas quanto à expressão de CD39 e CD73. Os dados representam média e desvio padrão e o ensaio foi conduzido com triplicata experimental. Os dados foram analisados pelo teste de Friedman, com pós teste de Dunn's. * indica $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.5 Modulação da expressão gênica em PBMC e MeWo

Investigamos o efeito de Sec, nSec e iSec sobre a expressão de transcritos relacionados a resposta imune em PBMC. Inicialmente, nós investigamos a expressão de TIM-3, LAG-3, CTLA-4 e PD-1 nessas células. Interessantemente, a expressão de TIM-3 foi estatisticamente reduzida em PBMCs expostas ao nSec ($p=0,04$) e iSec ($p=0,01$), comparada ao grupo controle. As PBMCs expostas ao iSec também mostram expressão reduzida de LAG-3 ($p=0,01$), em comparação com o grupo controle. Não detectamos alterações estatisticamente significativas ao analisar a expressão de CTLA4 e PD-1. Em seguida, avaliamos a expressão de genes que codificam os fatores de transcrição Tbet, Gata-3, ROR γ T e FOXP3. Os níveis transcricionais de Tbet foram encontrados reduzidos nas PBMC cultivadas em iSec ($p=0,007$), enquanto GATA-3 apresentou-se com níveis reduzidos tanto nas PBMC cultivadas em nSec ($p=0,01$), como em iSec ($p=0,01$). Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi encontrada quanto à expressão de ROR γ t. Os níveis transcricionais de FOXP3 estavam diminuídos nas PBMCs cultivadas em nSec ($p=0,04$) e iSec ($p=0,007$). Avaliamos ainda a expressão de IFN- γ , IL-10 e TGF- β em PBMCs cultivadas em Sec, nSec e iSec. Enquanto nenhuma alteração foi

detectada quanto à expressão de IL-10 e TGF- β , os níveis transcricionais de IFN- γ estavam reduzidos nas PBMCs expostas ao nSec ($p=0,01$). Por fim, investigamos a expressão de transcritos relacionados a morte celular. Enquanto BAX apresentou expressão reduzida em PBMC cultivadas com nSec ($p= 0,01$), Casp3 teve expressão reduzida nas PBMC expostas ao iSec ($p=0,01$). Os dados foram demonstrados na Figura 7.



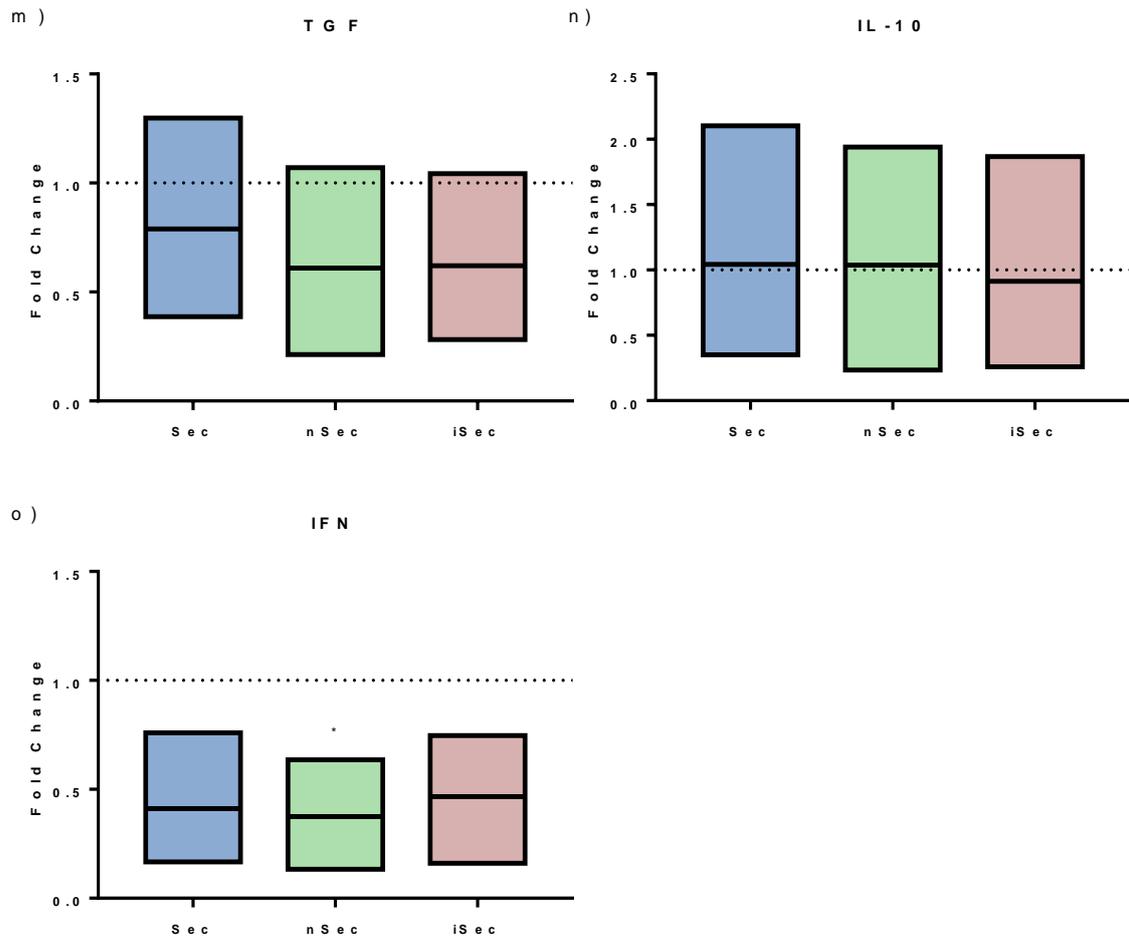


Figura 7- Análise de expressão gênica do PBMC. PBMCs (n=4) foram cultivadas em Sec, nSec e iSec por 120 horas. Após esse período, as células tiveram RNA extraído e foram submetidas a análise de expressão dos genes: (a) TIM-3; (b) LAG-3; (c) CTLA-4; (d) PD-1; (e) Tbet; (f) Gata3; (g) ROR γ T; (h) Foxp3; (i) BAX; (j) Casp3; (k) KI-67; (l) CDK-1; (m) TGF; (n) IL-10; (o) IFN. Os dados foram analisados pela metodologia DDcT, o gene constitutivo foi o GAPDH. Cada amostra foi normalizada com o seu próprio controle (grupo com RPMI), o qual está representado pela linha pontilhada nos gráficos. Os dados representam média com determinação máxima e mínima, e foram analisados pelo teste de Friedman, com pós teste de Dunn's. * indica $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

A linhagem MeWo submetida ao iMC demonstrou aumento significativo na expressão do gene PD-L1, comparada as células cultivadas em MC e o grupo controle ($p = 0,002$, para ambos). O PD-L1 apresentou-se com expressão muito elevada quando as células MeWo foram expostas ao iMC ($p = 0,002$). Da mesma forma, essa magnitude de expressão também foi identificada na expressão do IDO, ao se comparar o grupo iMC com o grupo controle ($p =$

0,0004). Para os demais genes avaliados (IL-10, TGF- β , IFN γ), não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme demonstrado na Figura 8.

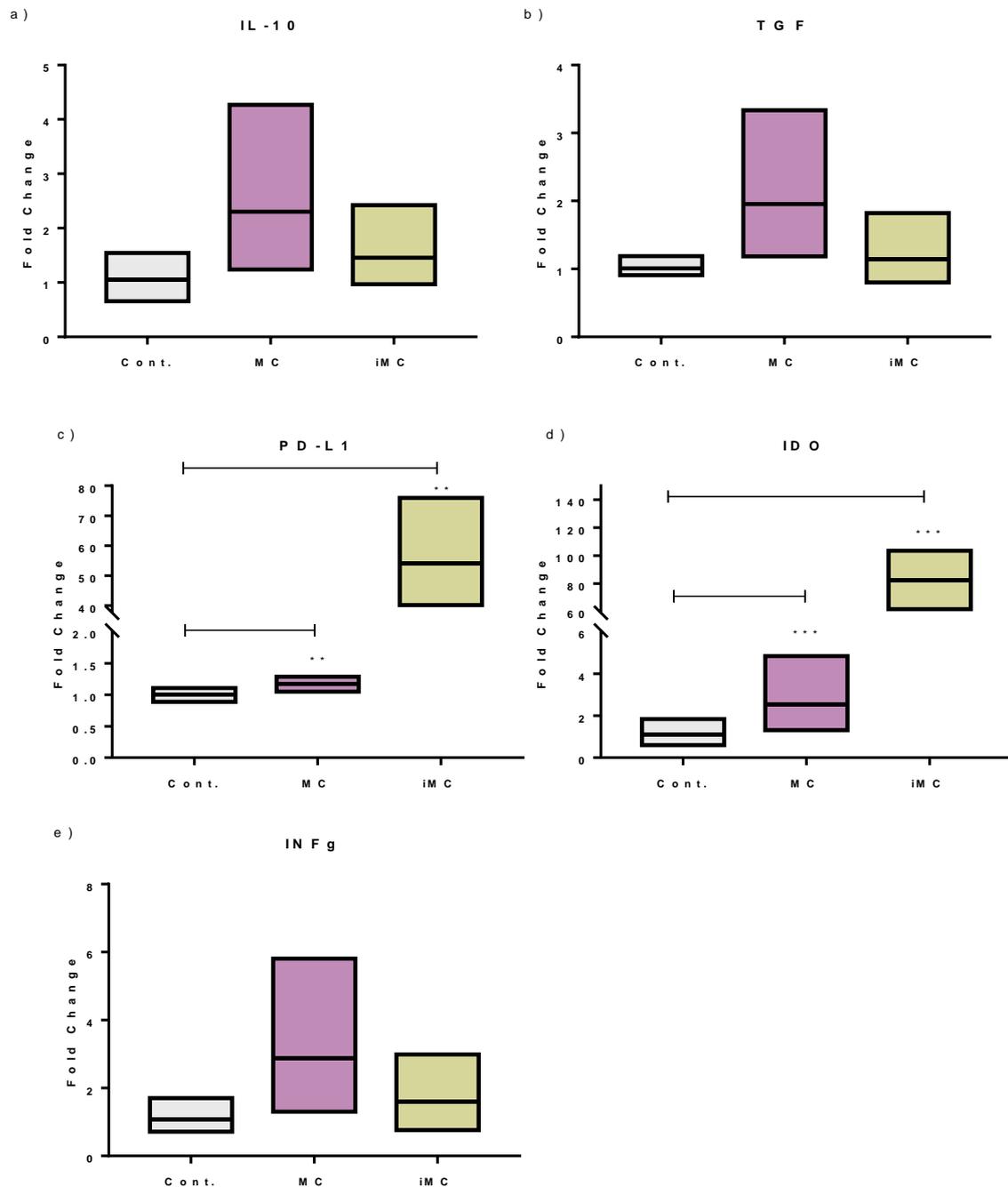


Figura 8 - Análise de expressão gênica da linhagem MeWo. A linhagem foi cultivada em RPMI (controle), MC e iMC. Em seguida, as células tiveram RNA extraído e foram submetidas a análise de expressão dos genes (a) IL-10, (b) TGF- β , (c) PD-L1, (d) IDO e (e) INF γ . O experimento foi realizado em triplicata experimental. Os dados foram analisados pela metodologia DDCT, sendo que o gene constitutivo avaliado foi o GAPDH. Cada amostra foi normalizada com o seu próprio controle (grupo com RPMI). Os dados representam média com determinação máxima e mínima, e foram analisados por ANOVA, com pós teste Tukey. * indica $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.6 ELISA

O ensaio de ELISA demonstrou que após exposição ao iSec, as PBMCs apresentaram aumento na produção de IL-10 ($p= 0,003$). As PBMCs expostas ao meio Sec apresentaram expressão reduzida de IFN γ quando comparadas ao grupo controle ($p=0,04$) (Figura 9). Os dados estão demonstrados na Figura 9.

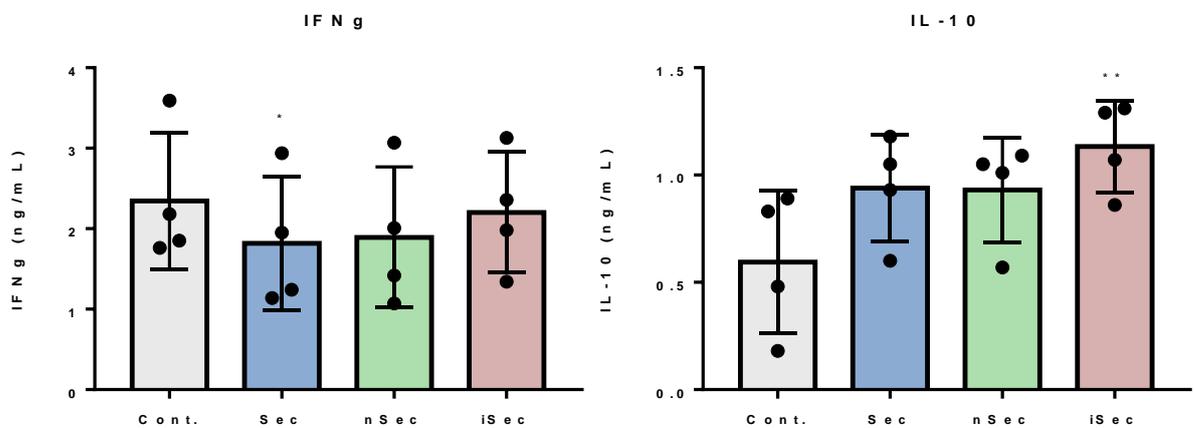


Figura 9 - Produção de IL-10 e IFN γ . PBMCs (n=4) foram cultivadas em RPMI (controle), Sec, nSec e iSec por 120 horas. Após esse período, o sobrenadante foi recolhido e avaliado quanto à produção de IL-10 e IFN γ . Os dados representam média e desvio padrão e foram analisados pelo teste de Friedman, com pós teste de Dunn's. * indica $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5. DISCUSSÃO

A maior parte dos tumores sólidos apresentam grande quantidade de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), em especial os subtipos TCD8+. Apesar do aumento dessas células no microambiente tumoral caracterizar um prognóstico positivo para o paciente, em muitos casos os tumores se desenvolvem rapidamente a despeito da presença das células T. Essa contradição demonstra que, em algumas situações, os linfócitos falham ao tentar eliminar as células tumorais, facilitando o desenvolvimento do câncer (THOMMEN; SCHUMACHER, 2018).

Ainda não há dados suficientes na literatura para entendermos exatamente de que forma as neoplasias e o microambiente produzido por elas influenciam os linfócitos T para que ora eles atuem de forma efetiva, ora falhem na resposta imunológica contra o câncer (MARINARI et al., 2020). Considerando as discordâncias encontradas na literatura (THOMMEN; SCHUMACHER, 2018; MARINARI et al., 2020), a dificuldade de compreender essa dinâmica de comunicação celular com os diferentes tipos de câncer e a vasta importância de decifrar o efeito que o microambiente do câncer produz sobre a resposta imune, este estudo teve o objetivo de investigar o efeito do secretoma de PBMC sobre a capacidade de imunoescape da linhagem celular de melanoma metastático MeWo.

Em nosso estudo, dois marcadores foram utilizados para estudar a ativação linfocitária por meio da citometria de fluxo: o CD69 e o HLA-DR. O CD69 é uma proteína transmembrana expressa nos linfócitos T conhecida por ser um marcador de ativação precoce destas células. Cerca de 30-60 minutos após o estímulo, a transcrição do CD69 é iniciada e a proteína é rapidamente recrutada para a superfície celular. Sua transcrição atinge seu pico em torno de 24 horas após o início e cerca de seis horas após a retirada do estímulo, sua detecção já volta a cair (GORABI et al., 2020). Além disso, há estudos que demonstram que essa proteína passa a ser

permanentemente expressa quando estudada em infiltrados linfocitários presentes em doenças inflamatórias crônicas (SANCHO et al., 1999).

O HLA-DR é uma molécula de superfície celular da subclasse da família do MHC-II. Nos linfócitos T essa proteína é expressa somente após o contato com o antígeno “estranho” e é utilizada como marcador de ativação tardia dessas células (REVENFELD et al., 2016). Em geral, este marcador se eleva com 24 horas e atinge seu pico de transcrição em torno de 48-60 horas após o estímulo (BAJNOK et al., 2017; REA; MCNERLAN; ALEXANDER, 1999).

Em nosso estudo, demonstramos que tanto o CD69, quanto o HLA-DR foram inibidos nas células T quando as PBMCs foram expostas ao iSec. Ainda que não tenha havido diferença estatisticamente significativa quanto à expressão de CD69, o perfil de diminuição da expressão média desse marcador foi de 49,27% quando as células foram expostas ao iSec. Com relação ao HLA-DR, a exposição das PBMCs ao iSec diminuiu a expressão desse marcador em 50,04%, mostrando claramente que o contato com o ambiente inflamatório potencializa a linhagem MeWo a promover inibição na ativação linfocitária.

Em um estudo clínico pregresso, os marcadores de ativação linfocitária CD69+ e HLA-DR+ foram avaliados no sangue periférico de pacientes com câncer de mama e ovário para verificar a sua correlação com a sobrevida dos pacientes após imunoterapia ativa específica. Neste estudo, os pacientes foram tratados com vacinas contendo antígenos sintéticos similares aos do tumor para estimular o sistema imune. Foram quantificadas as células CD69+ antes e após o tratamento. Os pacientes com câncer de mama que tiveram maior sobrevida apresentaram números reduzidos de células CD69+ antes do tratamento e quantidade aumentada após o tratamento, em relação aos pacientes que morreram. Foi possível correlacionar um aumento acima de 50% na quantidade de células CD69+ com o aumento da sobrevida para as duas neoplasias estudadas. Quanto ao HLA-DR+, os autores demonstraram que os pacientes que tiveram maior redução nos linfócitos HLA-DR+ após o tratamento

apresentaram maior sobrevida. Eles correlacionaram esse achado com uma regulação positiva entre os linfócitos HLA-DR⁺ e a presença dos marcadores CD8⁺CD57⁺, o que sugere senescência das células T (YACYSHYN et al., 1995). É importante ressaltar que esse estudo foi realizado com as células obtidas do sangue periférico e não diretamente retiradas do microambiente do tumor em estudo.

Em contrapartida, Saraiva e colaboradores realizaram estudos para demonstrar o perfil de resposta dos linfócitos TCD8⁺ HLA-DR⁺ com avaliação de moléculas como IFN γ e granzima B para avaliar a eficácia da resposta imune em amostras tumorais. Neste estudo eles confirmaram que a expressão de HLA-DR nos TILs está diretamente correlacionada com a ativação de um perfil de resposta imune antitumoral efetiva com o aumento de IFN γ e granzima B (SARAIVA et al., 2018).

A diminuição da presença de linfócitos T ativados no meio tumoral está diretamente relacionada com a diminuição da secreção de IFN γ , que gera uma resposta de feedback negativo para a proliferação linfocitária (SARAIVA et al., 2018). Portanto, prosseguimos para a análise de proliferação celular em nosso estudo, para verificar se os dados estão em linha com o que tem sido apresentado na literatura.

No ensaio de proliferação celular com marcação com CFSE, foi possível perceber que a exposição das PBMCs ao iSec afeta diretamente a proliferação linfocitária. As células T em contato com o microambiente do melanoma apresentaram uma diminuição média de 23,72% na proliferação com relação ao grupo controle. Foi possível perceber que as células T que foram expostas ao nSec e iSec tiveram a proliferação celular marcadamente afetada.

O controle da proliferação linfocitária é essencial para manter a homeostase do sistema imune. Em condições normais é importante que haja um equilíbrio na quantidade de células T de forma a evitar a linfocitose, que pode desencadear a produção de linfócitos auto reativos

culminando em diversas doenças relacionadas com o processo de autoimunidade. Porém, quando se trata de imunidade tumoral, o aumento da proliferação linfocitária é visto como benéfico para favorecer um aumento na migração e no combate das células neoplásicas no microambiente tumoral (DATTA; SARVETNICK, 2009). Alguns estudos realizados com pacientes com melanoma tratados com células T direcionadas aos antígenos específicos da neoplasia resultaram em uma imunoterapia tumoral satisfatória. Em contrapartida, há relatos de pacientes que desenvolveram doenças autoimunes (como o vitiligo) em tecidos saudáveis em decorrência deste mesmo tratamento em altas doses. Esses achados reforçam a importância de encontrar o estímulo na dose adequada para a proliferação linfocitária a fim de chegar à homeostase até mesmo no microambiente tumoral (DATTA; SARVETNICK, 2009).

Alguns autores descreveram que a diminuição da proliferação linfocitária está diretamente relacionada à uma exposição crônica dos linfócitos T aos seus antígenos, levando essas células a um estado de exaustão. Os sinais elevados e sustentados por muito tempo para os receptores TCR culminam na ativação de receptores inibitórios (pontos de controle imunológicos) dessas células (THOMMEN; SCHUMACHER, 2018). Essa estratégia tem como função limitar os danos teciduais causados pela resposta imunológica exacerbada no local (BURUGU; ASLEH-ABURAYA; NIELSEN, 2017). A exaustão celular foi demonstrada primeiramente em infecções virais (HIV, HCV, HBV) e depois foi comprovada também na presença de tumores, porém com os receptores inibitórios apresentando relevância e papéis diferentes para cada caso (BAITSCH et al., 2011).

Nosso desenho experimental não permite o contato direto entre as células T e as células do melanoma a ponto de levar a essa exaustão causada pela exposição crônica a epítomos “estranhos”. Porém, pudemos demonstrar que apenas a modulação do microambiente causada pelo secretoma do câncer já produz efeito similar, prejudicando a proliferação linfocitária e demonstrando ineficiência imunológica para o combate ao câncer. Portanto, em conjunto, os

dados do nosso estudo reforçam que o secretoma da MeWo, especialmente o iSec, gera um ambiente menos propício para a resposta antitumoral, considerando a menor ativação e proliferação celular dos linfócitos T expostos a esse secretoma.

Após identificarmos que o iSec é capaz de controlar a ativação e a proliferação dos linfócitos T foi necessário investigar se a diminuição da proliferação das células T estava relacionada com a indução de morte celular. Identificamos que nenhum dos secretomas produzidos foi capaz de comprometer a viabilidade das células T. Porém, nossos achados demonstram que os poços tratados com o iSec apresentaram aumento (em média, 35,81%) de linfócitos T viáveis e diminuição de uma média de 51,44% na apoptose inicial com relação ao grupo controle. Em nossos resultados, não foi possível observar significância estatística ao avaliar a relação do secretoma da MeWo com a indução da apoptose nos TILs. Possivelmente isso se deve ao número amostral baixo para o ensaio realizado, contudo pudemos demonstrar que não há aumento na indução da apoptose nos PBMCs. Esse fato pode ser explicado pelo fenômeno de morte celular induzida por ativação (AICD), uma vez que a estimulação do complexo TCR/CD3 resulta em apoptose dos linfócitos T. Esse mecanismo tem como finalidade a manutenção da homeostase e da tolerância imunológica por meio de uma deleção clonal periférica. Portanto, quanto maior a ativação, maior o estímulo de morte por AICD (GREEN et al., 2003).

Em contrapartida, há outros achados na literatura que indicam que o microambiente tumoral leva os linfócitos TCD8⁺ a morte celular programada (HORTON; GAJEWSKI, et al., 2018). Em um estudo prévio, os autores utilizaram um modelo de melanoma com características de resistência tumoral a imunoterapia para avaliar a contribuição da apoptose dos TILs nesse mecanismo. Eles conseguiram demonstrar que ao bloquear a via de apoptose das células T (Fas/Fas-ligante), há um aumento na eficácia da imunoterapia antitumoral, em concordância com demais autores (ZHU et al., 2017). Outro estudo similar foi realizado utilizando o bloqueio

da via de apoptose Bcl-xL -em modelos tumorais murinos- e demonstrou resultados favoráveis para a resposta anti-tumoral. Portanto, eles concluíram que focar na apoptose mediada pelo tumor é um fator crítico para o desenvolvimento de imunoterapias eficazes (HORTON et al., 2018).

Uma das formas de escape imunológico desenvolvido por tumores está na expressão dos ectonucleotídeos CD39 e CD73. Esses marcadores estão presentes em diversas neoplasias e são capazes de converter o sinalizador purinérgico trifosfato de adenosina (ATP) em adenosina. Essa modulação de sinalização faz com que haja inibição da inflamação levando a um ambiente imunossupressor, com baixa capacidade antitumoral (ALLARD et al., 2017). Utilizamos a citometria de fluxo para analisar os dois marcadores expressos pelas células do melanoma expostas ao MC e iMC e, interessante, conseguimos demonstrar que, na presença do meio condicionado do linfócito, as células do melanoma aumentam consideravelmente a expressão das ectoenzimas CD39 e CD73. Esse aumento é ainda mais evidente quando analisamos a célula tratada com o iMC. Os dados encontrados em nosso estudo corroboram com os já descritos na literatura quanto à capacidade desenvolvida pelos tumores de modular diretamente a via purinérgica. Por esse motivo, esses marcadores vêm sendo estudados como alvos terapêuticos para a imunoterapia (ALLARD et al., 2017).

Um estudo pré-clínico realizado por Perrot e colaboradores foi desenvolvido para investigar se o impacto do bloqueio das ectoenzimas CD39 e CD73 é capaz de regular a imunossupressão mediada por adenosina e reforçar a imunidade antitumoral. Para bloquear a via da adenosina, foram desenvolvidos dois anticorpos capazes de se ligar à membrana das formas solúveis de CD73 e CD39 e bloquear a hidrólise do ATP. Para avaliar o potencial antitumoral da combinação de terapias convencionais com os anticorpos desenvolvidos foram utilizados modelos animais de camundongos com tumores sólidos de melanoma e fibrosarcoma. Camundongos *knockout* para os genes das ectoenzimas CD39 e CD73 foram tratados com terapia convencional e comparados aos camundongos selvagens submetidos aos

mesmos tratamentos. Os modelos *knockout* apresentaram redução considerável dos tumores associada ao aumento da atividade de células dendríticas e macrófagos, resultando no estímulo da atividade antitumoral de células T. A combinação entre os tratamentos convencionais e os anticorpos bloqueadores da via purinérgica apresentaram resultados similares aos dos camundongos *knockout*, confirmando a capacidade terapêutica antitumoral dessas substâncias, seja por deleção genética ou por imunoterapia de bloqueio, em modelo pré-clínico de camundongos (PERROT et al., 2019). Esses achados justificam o desenvolvimento de estratégias inovadoras de terapia contra o câncer envolvendo o bloqueio da via CD39/CD73 (PERROT et al., 2019, ALLARD et al., 2017).

Segundo Yang e colaboradores, outra forma de escape imunológico do melanoma decorre diretamente da sua capacidade de tornar o seu microambiente imunossupressor com o aumento da produção de citocinas como TGF- β , VEGF e IL-10. Esse padrão de sinalização promove o recrutamento de células como células mieloides supressoras (MDSCs) e linfócitos T regulatórios (Tregs), exercendo um papel crucial para o desenvolvimento, crescimento e progressão do câncer (YANG et al., 2018).

Neste estudo, nós também estudamos o perfil de citocinas expressas pelas PBMCs quando estas são expostas ao secretoma da MeWo com foco em IL-10 e IFN γ , citocinas anti e pró- inflamatórias, respectivamente (SALMAN et al., 2012). A escolha dessas duas citocinas se deve ao papel antagônico que as duas exercem. A IL-10 induz os linfócitos T a um estado anérgico, suprimindo sua proliferação. Já o IFN γ atua diretamente na ativação de linfócitos T citotóxicos (NOWAK et al., 2010). Em nossa análise, pudemos identificar que, na presença do secretoma da MeWo, em especial o iSec, os linfócitos passam a produzir mais IL-10 e menos IFN γ , tornando o microambiente potencialmente anti-inflamatório. Esses dados corroboram com os ensaios funcionais anteriormente descritos com a demonstração de que um melanoma

metastático é capaz de produzir um ambiente cada vez mais favorável para o seu próprio desenvolvimento.

De forma semelhante, os autores Salman *et al* fizeram um estudo do perfil de citocinas produzidas pelas PBMCs quando cultivadas juntamente com células da linhagem do câncer de próstata (PC-3), em diferentes quantidades. Ao analisar o ambiente resultante do co-cultivo entre as células, eles demonstraram que à medida que eles aumentavam a quantidade de células de câncer o microambiente estudado possuía cada vez mais IL-10. Este dado corrobora com os nossos achados com a linhagem de melanoma. Em contrapartida, eles não conseguiram demonstrar nenhuma diferença na produção de IFN γ (SALMAN *et al.*, 2012).

Outro estudo conduzido por Nowak e colaboradores foi realizado no sentido de o perfil de citocinas secretadas pelas PBMCs na presença de células autólogas de câncer de ovário e células de tumor benigno de ovário com as pacientes portadoras dessas doenças. Neste estudo eles realizaram um co-cultivo de PBMCs de pacientes saudáveis ou não (com ou sem ativação com PHA) com as células de ovário (células saudáveis, células de câncer autólogo e células de tumor benigno). Os autores conseguiram demonstrar que as PBMCs (com ou sem PHA) de pacientes com estágio avançado de câncer de ovário produziram quantidade significativamente diminuídas de IFN γ quando comparadas com as PBMCs de pacientes que possuíam tumor benigno de ovário. Seus resultados também demonstraram que somente as células de câncer são capazes de aumentar a produção de IL-10 nas PBMCs estimuladas com PHA (NOWAK *et al.*, 2010).

O aumento do TGF- β pela ativação da via de sinalização Nodal/ativina no microambiente tumoral já foi relacionado com a permanência e manutenção das células-tronco tumorais do câncer pancreático. Da mesma forma, o bloqueio farmacológico das suas vias de ativação foi relacionado com a diminuição da sobrevivência e tumorigenicidade dessas células *in vitro* (LONARDO *et al.*, 2011).

O aumento da expressão de marcadores de exaustão nos linfócitos T, como os pontos de controle imunológico (PD-1, TIM-3, LAG-3, CTLA-4), estão diretamente relacionados à progressão do câncer (FRIDMAN et al., 2017).

Os achados no estudo (BAITSCH et al., 2011) corroboram com a ideia de que os TILs acabam tornando-se células funcionalmente comprometidas, o que prejudica diretamente a eficácia da imunoterapia, especialmente para o melanoma (BAITSCH et al., 2011). Além disso, já foi estabelecido que o aumento do biomarcador sérico lactato desidrogenase é um mau preditor para a resposta do paciente às terapias de bloqueio imunológico como o CTLA-4 e o PD-1. Este achado pode ser um reflexo da produção do lactato como agente imunossupressor resultante do metabolismo das células do câncer (FRIDMAN et al., 2017).

Com relação aos nossos resultados de expressão gênica, não foi possível observar aumento dos marcadores CTLA-4 e PD-1, apesar de termos visto uma redução dos genes TIM-3 e LAG-3. Esse dado vai de encontro com a literatura anteriormente citada. Porém, nos faz questionar se o microambiente agressivo produzido na presença do melanoma não explicaria, em parte, as limitações descritas com relação à utilização de terapias alvo-molecular para tratar a doença (FRIDMAN et al., 2017)

Page e seus colaboradores desenvolveram um estudo com pacientes em estágio inicial de câncer de mama, tratando-os com crioablação e ipilimumab (bloqueador do CTLA-4) em comparação com os dois tratamentos aplicados em separado. Eles utilizaram a dosagem por *Meso Scale Discovery* (MSD) de IFN γ e a contagem de Ki67 (por citometria de fluxo) nos linfócitos T como marcadores de ativação celular. Os pacientes que receberam o tratamento conjunto apresentaram elevação considerável do IFN γ no microambiente tumoral e do Ki67 nos TILs. Além desses achados, o estudo demonstrou que houve uma predominância de influxo de novos clones de TILs com um aumento na ativação do sistema imune na utilização dos tratamentos em conjunto (PAGE et al, 2015). Esses dados corroboram com a hipótese de que a

exaustão linfocitária está diretamente ligada a diminuição de proliferação bem como com a redução na produção de IFN γ no secretoma tumoral (BURUGU; ASLEH-ABURAYA; NIELSEN, 2017).

Além desses pontos de controle estudados, também pudemos observar uma redução significativa dos genes BAX e Casp3. Estes genes estão diretamente envolvidos na ativação da via de morte programada por autofagia dos linfócitos T, o que corrobora com os achados em nosso ensaio de morte celular (GU et al., 2021). A redução nos níveis transcricionais dos genes Tbet, que participa no controle da diferenciação na resposta Th1, e IFN γ , confirmam a modulação do microambiente tumoral para um perfil menos imunogênico (C. WANG et al., 2015). Os transcritos GATA3 e FOXP3, reguladores da resposta Th2 e fundamentais para a homeostase do sistema imune, bem como controle da autoimunidade, também estavam reduzidos, demonstrando a desregulação imunológica causada pelo secretoma do melanoma sobre as células imunes (Y. WANG et al, 2011).

O CDK1 é uma das principais proteínas relacionadas à regulação do ciclo celular, sendo amplamente utilizada como marcador de proliferação linfocitária (WOLOWIEC et al., 1995). Em nossa análise, ao expor o PBMC ao iSec, houve um aumento significativo na transcrição dessa molécula. Esse dado entra em contradição com o que foi demonstrado no ensaio de proliferação celular. Porém, o aumento da transcrição do gene CDK1 para mRNA não necessariamente reflete na tradução da proteína reguladora, além de existirem outros tantos genes que regulam o ciclo celular e que não foram abordados nesse estudo (BICKNELL; RICCI, 2017; JIANG et al., 2018). Portanto, o ensaio funcional de proliferação reflete de forma mais fidedigna o que acontece após a interação do PBMC com o iSec.

O PD-L1 é um ligante que atua como fator imunossupressor das células neoplásicas. Ao interagir com o seu ligante PD-1, inibe o funcionamento das células T. O aumento da sua expressão está diretamente ligado ao aumento da proliferação do câncer, portanto a via de

sinalização PD-1/PD-L1 é um importante alvo na terapia imunológica de vários tipos de câncer (Q.M. WANG et al., 2019).

Em contrapartida, tumores com baixa expressão deste ligante (PD-L1) precisariam de imunoterapias combinadas com ação em múltiplos alvos para que o sistema imune fosse ativado a ponto de conseguir combater o tumor. Nesses casos, o paciente pode se beneficiar ainda mais com a combinação da imunoterapia com terapias tradicionais como a quimioterapia e radioterapia (BURUGU; ASLEH-ABURAYA; NIELSEN, 2017).

Em nosso estudo realizado na célula tumoral MeWo foi possível demonstrar que quanto mais ela é exposta a um ambiente inflamado, maior é a sua expressão do ligante PD-L1. Este achado favorece o tratamento já bem estabelecido com os imunomoduladores pembrolizumab ou nivolumab (anti-PD-1) (PAVRI et al., 2016).

Além do aumento do PD-L1, outro marcador tumoral que teve sua produção diretamente influenciada pela presença do meio condicionado inflamado dos linfócitos foi a enzima IDO. Essa molécula induz à supressão dos linfócitos T efetores, controlando a inflamação e induzindo à tolerância específica ao antígeno (ZHAI et al., 2017; LANÇA, 2020). Diversos estudos demonstram que o aumento da sua expressão está diretamente correlacionado com a diminuição da sobrevida em pacientes com glioma (ZHAI et al., 2017), câncer cervical (INABA et al., 2010), carcinoma oral de células escamosas (LAIMER et al., 2011), linfomas de células T do adulto (MASAKI et al., 2015), câncer colorretal (FERDINANDE et al., 2012) e inclusive o melanoma metastático (SPEECKAERT et al., 2012).

É importante destacar que o infiltrado de células imunes se comporta de forma diferente a depender do câncer em estudo. Marinari e colaboradores estudaram o perfil da resposta imune no microambiente do glioma, tumor originário das células gliais no sistema nervoso central. Eles utilizaram sequenciamento de RNA e citometria de fluxo para analisar o

comportamento das células imunes presente no infiltrado do glioma de alto grau e de que forma elas influenciavam no prognóstico da doença. De forma a contrastar com os achados típicos da literatura (FRIDMAN et al., 2017; ZHANG et al., 2003), eles demonstraram que existe uma forte associação entre o aumento da inflamação (com ativação e infiltração imunológica) e a menor sobrevida global dos pacientes (MARINARI et al., 2020).

Ao reconhecer a importância do escape imunológico para o desenvolvimento da neoplasia, é possível inferir que o desenvolvimento de técnicas para a reativação do sistema imune exerce papel central na terapia imunológica contra o câncer (Q.M. WANG et al., 2019).

Desvendar e descrever a atuação do secretoma das neoplasias mais agressivas tem sido de grande relevância, visto que hoje já é descrito que um câncer metastático é capaz de “preparar” outros órgãos alvo antes mesmo de invadi-los. A secreção de fatores solúveis e vesículas extracelulares é capaz de ativar a comunicação celular com tecidos distantes, modulando as células imunes e primárias do novo sítio, tornando-o um ambiente favorável para o desenvolvimento metastático do câncer (CARVALHO; PAREDES; RIBEIRO, 2020).

De modo geral, nossos achados mostram que, embora o melanoma tenha uma capacidade constitutiva de controlar a função das células T e escapar da vigilância imunológica, a exposição das células tumorais ao microambiente inflamatório desempenha um papel importante para permitir que essas células exerçam uma função imunossupressora mais potente. Considerando que nosso estudo teve foco em investigar comunicação parácrina, seria importante o desenvolvimento de novas investigações de modo a fornecer um melhor entendimento dos mecanismos de imunoescape do melanoma, com uma abordagem que permita contato celular. Tais avanços são fundamentais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas focadas na imunoterapia do melanoma.

6. CONCLUSÃO

Em nosso estudo foi possível concluir que:

- O iSec diminui a proliferação linfocitária;
- O iSec diminui a ativação linfocitária;
- O microambiente do melanoma não induz as células T à apoptose;
- O nSec e iSec são capazes de modular a expressão gênica de Tbet, IFN γ , TIM-3, LAG-3, FOXP3, BAX, CDK-1, Casp3 e Gata3;
- O microambiente resultante da interação entre PBMCs e o secretoma do melanoma apresenta aumento de IL-10 e diminuição de IFN γ ;
- O melanoma submetido ao MC e iMC sofre modulação na expressão de CD39 e CD73;
- O melanoma submetido ao MC e iMC aumenta consideravelmente a expressão de PD-1 eIDO.

7. REFERÊNCIAS

- American Cancer Society: Cancer Facts and Figures. **American Cancer Society**, 2021. Disponível em: https://www.cancer.gov/types/skin/hp/melanoma-treatment-pdq#cit/section_1.1. Acesso em: 2, nov, 2021.
- Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C., & Stagg, J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. **Immunological Reviews**, 276(1), 121–144, 2017.
- Baitsch, L., Baumgaertner, P., Devêvre, E., Raghav, S. K., Legat, A., Barba, L., Wieckowski, S., Bouzourene, H., Deplancke, B., Romero, P., Rufer, N., & Speiser, D. E. Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients. **The Journal of Clinical Investigation**, 121(6), 2350–2360, 2011.
- Bajnok, A., Ivanova, M., Rigó, J., Jr, & Toldi, G. The Distribution of Activation Markers and Selectins on Peripheral T Lymphocytes in Preeclampsia. **Mediators of Inflammation**, 2017, 8045161, 2017.
- Bastian, B. C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. **Annual Review of Pathology**, 9, 239–271, 2014.
- Bicknell, A. A., & Ricci, E. P. When mRNA translation meets decay. **Biochemical Society Transactions**, 45(2), 339–351, 2017.
- Bradish, J. R., & Cheng, L. Molecular pathology of malignant melanoma: changing the clinical practice paradigm toward a personalized approach. **Human Pathology**, 45(7), 1315–1326, 2014.
- Burugu, S., Asleh-Aburaya, K., & Nielsen, T. O. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. **Breast Cancer**, 24(1), 3–15, 2017.
- Carvalho, R., Paredes, J., & Ribeiro, A. S. Impact of breast cancer cells' secretome on the brain metastatic niche remodeling. **Seminars in Cancer Biology**, 60, 294–301, 2020.
- Clark, W. H., Jr, Elder, D. E., & Van Horn, M. The biologic forms of malignant melanoma. **Human Pathology**, 17(5), 443–450, 1986.
- Datta, S., & Sarvetnick, N. Lymphocyte proliferation in immune-mediated diseases. **Trends in Immunology**, 30(9), 430–438, 2009.
- Davis, L. E., Shalin, S. C., & Tackett, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology & Therapy**, 20(11), 1366–1379, 2019.
- Donadelli, M. The cancer secretome and secreted biomarkers. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 78, 1–2, 2018.

- Donnelly, D., 3rd, Aung, P. P., & Jour, G. The “-OMICS” facet of melanoma: Heterogeneity of genomic, proteomic and metabolomic biomarkers. **Seminars in Cancer Biology**, 59, 165–174, 2019.
- Ferdinande, L., Decaestecker, C., Verset, L., Mathieu, A., Moles Lopez, X., Negulescu, A.-M., Van Maerken, T., Salmon, I., Cuvelier, C. A., & Demetter, P. Clinicopathological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression in colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, 106(1), 141–147, 2012.
- Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C., & Kroemer, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature Reviews*. **Clinical Oncology**, 14(12), 717–734, 2017.
- Fumagalli, M., Lecca, D., & Abbracchio, M. P. CNS remyelination as a novel reparative approach to neurodegenerative diseases: The roles of purinergic signaling and the P2Y-like receptor GPR17. **Neuropharmacology**, 104, 82–93, 2016.
- Giavina-Bianchi, M. H., Giavina-Bianchi, P. F., Junior, & Festa, C., Neto. Melanoma: tumor microenvironment and new treatments. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 92(2), 156–166, 2017.
- Gorabi, A. M., Hajighasemi, S., Kiaie, N., Gheibi Hayat, S. M., Jamialahmadi, T., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. The pivotal role of CD69 in autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, 111, 102453, 2020.
- Green, D. R., Droin, N., & Pinkoski, M. Activation-induced cell death in T cells. **Immunological Reviews**, 193, 70–81, 2003.
- Gu, Q., Jiao, S., Duan, K., Wang, Y.-X., Petralia, R. S., & Li, Z. The BAD-BAX-Caspase-3 Cascade Modulates Synaptic Vesicle Pools via Autophagy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 41(6), 1174–1190, 2021.
- Horton, B. L., & Gajewski, T. F. Back from the dead: TIL apoptosis in cancer immune evasion [Review of Back from the dead: TIL apoptosis in cancer immune evasion]. **British Journal of Cancer**, 118(3), 309–311, 2018.
- Horton, B. L., Williams, J. B., Cabanov, A., Spranger, S., & Gajewski, T. F. Intratumoral CD8 T-cell Apoptosis Is a Major Component of T-cell Dysfunction and Impedes Antitumor Immunity. **Cancer Immunology Research**, 6(1), 14–24, 2018.
- Inaba, T., Ino, K., Kajiyama, H., Shibata, K., Yamamoto, E., Kondo, S., Umezumi, T., Nawa, A., Takikawa, O., & Kikkawa, F. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. **Gynecologic Oncology**, 117(3), 423–428, 2010.
- Jiang G.-J., Chen Y.-H., Guo W., Zhang H., & Zou L. [Screening and verification of key genes in T-cell acute lymphoblastic leukemia]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*, 38(3), 261–267, 2018.
- Kibbi, N., Kluger, H., & Choi, J. N. Melanoma: Clinical Presentations. **Cancer Treatment and Research**, 167, 107–129, 2016.

- Ladányi, A. Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, 28(5), 490–500, 2015.
- Laimer, K., Troester, B., Kloss, F., Schafer, G., Obrist, P., Perathoner, A., Laimer, J., Brandacher, G., Rasse, M., Margreiter, R., & Amberger, A. Expression and prognostic impact of indoleamine 2,3-dioxygenase in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, 47(5), 352–357, 2011.
- Lança, Maria Leticia de Almeida. Expressão da Indoleamina 2, 3 dioxigenase em carcinoma espinocelular intraoral, labial, leucoplasia oral e queilite actínica. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25(4), 402–408, 2001.
- Li, X., & Cai, Y. Better prognostic determination and feature characterization of cutaneous melanoma through integrative genomic analysis. **Aging**, 11(14), 5081–5107, 2019.
- Lonardo, E., Hermann, P. C., Mueller, M.-T., Huber, S., Balic, A., Miranda-Lorenzo, I., Zagorac, S., Alcalá, S., Rodríguez-Arabaolaza, I., Ramirez, J. C., Torres-Ruíz, R., Garcia, E., Hidalgo, M., Cebrián, D. Á., Heuchel, R., Löhr, M., Berger, F., Bartenstein, P., Aicher, A., & Heeschen, C. Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. **Cell Stem Cell**, 9(5), 433–446, 2011.
- Lyons, A. B., & Parish, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, 171(1), 131–137, 1994.
- Maibach, F., Sadozai, H., Seyed Jafari, S. M., Hunger, R. E., & Schenk, M. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Prognostic Value in Cutaneous Melanoma. **Frontiers in Immunology**, 11, 2105, 2020.
- Maio, M. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, 23 Suppl 8, viii10–viii14, 2012.
- Margolin, K. Introduction to the role of the immune system in melanoma. **Hematology/oncology Clinics of North America**, 28(3), 537–558, 2014.
- Margolis, N., Markovits, E., & Markel, G. Reprogramming lymphocytes for the treatment of melanoma: From biology to therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 141, 104–124, 2019.
- Marinari, E., Allard, M., Gustave, R., Widmer, V., Philippin, G., Merkler, D., Tsantoulis, P., Dutoit, V., & Dietrich, P.-Y. Inflammation and lymphocyte infiltration are associated with shorter survival in patients with high-grade glioma. **Oncoimmunology**, 9(1), 1779990, 2020.
- Mar, V. J., Chamberlain, A. J., Kelly, J. W., Murray, W. K., & Thompson, J. F. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of melanoma: melanomas that lack classical clinical features. **The Medical Journal of Australia**, 207(8), 348–350, 2017.

- Masaki, A., Ishida, T., Maeda, Y., Suzuki, S., Ito, A., Takino, H., Ogura, H., Totani, H., Yoshida, T., Kinoshita, S., Narita, T., Ri, M., Kusumoto, S., Inagaki, A., Komatsu, H., Niimi, A., Ueda, R., Utsunomiya, A., Inagaki, H., & Iida, S. Prognostic Significance of Tryptophan Catabolism in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, 21(12), 2830–2839, 2015.
- Nowak, M., Klink, M., Glowacka, E., Sulowska, Z., Kulig, A., Szpakowski, M., Szylo, K., & Tchorzewski, H. Production of cytokines during interaction of peripheral blood mononuclear cells with autologous ovarian cancer cells or benign ovarian tumour cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, 71(2), 91–98, 2010.
- Page, D., *et al.* Integrated immunologic assessment of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and peripheral blood to assess synergy of cryoablation (cryo) plus ipilimumab (ipi) in early stage breast cancer (ESBC) patients (pts) [abstract]. In: Proceedings of the Thirty-Seventh Annual CTCRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium: 2014 Dec 9-13; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; **Cancer Res**; 75(9 Suppl): Abstract nr P2-15-01, 2015.
- Paltridge, J. L., Belle, L., & Khew-Goodall, Y. The secretome in cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1834(11), 2233–2241, 2013.
- Pavri, S. N., Clune, J., Ariyan, S., & Narayan, D. Malignant Melanoma: Beyond the Basics. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 138(2), 330e – 340e, 2016.
- Perrot, I., Michaud, H.-A., Giraudon-Paoli, M., Augier, S., Docquier, A., Gros, L., Courtois, R., Déjou, C., Jecko, D., Becquart, O., Rispaud-Blanc, H., Gauthier, L., Rossi, B., Chanteux, S., Gourdin, N., Amigues, B., Roussel, A., Bensussan, A., Eliaou, J.-F., Bonnefoy, N. Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. **Cell Reports**, 27(8), 2411–2425.e9, 2019.
- Puckett, Y., Wilson, A. M., Farci, F., & Thevenin, C. Melanoma Pathology. **In StatPearls. StatPearls Publishing**, 2021.
- Pietkiewicz, S., Schmidt, J. H., & Lavrik, I. N. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. **Journal of Immunological Methods**, 423, 99–103, 2015.
- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C. R., & Alaibac, M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In Vivo**, 28(6), 1005–1011, 2014.
- Rea, I. M., McNerlan, S. E., & Alexander, H. D. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3+ lymphocytes and relationship to serum TNF-alpha, IFN-gamma, and sIL-2R levels in aging. **Experimental Gerontology**, 34(1), 79–93, 1999.
- Revenfeld, A. L. S., Steffensen, R., Pugholm, L. H., Jørgensen, M. M., Stensballe, A., & Varming, K. Presence of HLA-DR Molecules and HLA-DRB1 mRNA in Circulating CD4(+) T Cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, 84(4), 211–221, 2016.
- Salman, H., Ori, Y., Bergman, M., Djaldetti, M., & Bessler, H. Human prostate cancer cells induce inflammatory cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, 66(5), 330–333, 2012.

- Sancho, D., Yáñez-Mó, M., Tejedor, R., & Sánchez-Madrid, F. Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15. **Blood**, 93(3), 886–896, 1999.
- Saraiva, D. P., Jacinto, A., Borralho, P., Braga, S., & Cabral, M. G. HLA-DR in Cytotoxic T Lymphocytes Predicts Breast Cancer Patients' Response to Neoadjuvant Chemotherapy. **Frontiers in Immunology**, 9, 2605, 2018.
- Schadendorf, D., Fisher, D. E., Garbe, C., Gershenwald, J. E., Grob, J.-J., Halpern, A., Herlyn, M., Marchetti, M. A., McArthur, G., Ribas, A., Roesch, A., & Hauschild, A. Melanoma. **Nature Reviews. Disease Primers**, 1, 15003, 2015.
- Shain, A. H., & Bastian, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews. Cancer**, 16(6), 345–358, 2016.
- Shain, A. H., & Bastian, B. C. Author Correction: From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews. Cancer**, 20(6), 355, 2020.
- Shannan, B., Perego, M., Somasundaram, R., & Herlyn, M. Heterogeneity in Melanoma. **Cancer Treatment and Research**, 167, 1–15, 2016.
- Singh, N., & Gupta, S. K. Recent advancement in the early detection of melanoma using computerized tools: An image analysis perspective. *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin*, 25(2), 129–141, 2019.
- Speeckaert, R., Vermaelen, K., van Geel, N., Autier, P., Lambert, J., Haspeslagh, M., van Gele, M., Thielemans, K., Neyns, B., Roche, N., Verbeke, N., Deron, P., Speeckaert, M., & Brochez, L. Indoleamine 2,3-dioxygenase, a new prognostic marker in sentinel lymph nodes of melanoma patients. **European Journal of Cancer**, 48(13), 2004–2011, 2012.
- Swetter, S. M., Tsao, H., Bichakjian, C. K., Curiel-Lewandrowski, C., Elder, D. E., Gershenwald, J. E., Guild, V., Grant-Kels, J. M., Halpern, A. C., Johnson, T. M., Sober, A. J., Thompson, J. A., Wisco, O. J., Wyatt, S., Hu, S., & Lamina, T. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 80(1), 208–250, 2019.
- Thommen, D. S., & Schumacher, T. N. T Cell Dysfunction in Cancer. **Cancer Cell**, 33(4), 547–562, 2018.
- Tucci, M., Stucci, S., Passarelli, A., Giudice, G., Dammacco, F., & Silvestris, F. The immune escape in melanoma: role of the impaired dendritic cell function. **Expert Review of Clinical Immunology**, 10(10), 1395–1404, 2014.
- Wang, C., Collins, M., & Kuchroo, V. K. Effector T cell differentiation: are master regulators of effector T cells still the masters? **Current Opinion in Immunology**, 37, 6–10, 2015.
- Wang, Q.-M., Lian, G.-Y., Song, Y., Huang, Y.-F., & Gong, Y. LncRNA MALAT1 promotes tumorigenesis and immune escape of diffuse large B cell lymphoma by sponging miR-195. **Life Sciences**, 231, 116335, 2019.

- Wang, Y., Su, M. A., & Wan, Y. Y. An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. **Immunity**, 35(3), 337–348, 2011.
- Wołowiec, D., Deviller, P., Simonin, D., Souchier, C., Rimokh, R., Benchaib, M., Bryon, P. A., & Ffrench, M. Cdk1 is a marker of proliferation in human lymphoid cells. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, 61(3), 381–388, 1995.
- Yacyshyn, M. B., Poppema, S., Berg, A., MacLean, G. D., Reddish, M. A., Meikle, A., & Longenecker, B. M. CD69+ and HLA-DR+ activation antigens on peripheral blood lymphocyte populations in metastatic breast and ovarian cancer patients: correlations with survival following active specific immunotherapy. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, 61(4), 470–474, 1995.
- Yang, Z., Qi, Y., Lai, N., Zhang, J., Chen, Z., Liu, M., Zhang, W., Luo, R., & Kang, S. Notch1 signaling in melanoma cells promoted tumor-induced immunosuppression via upregulation of TGF- β 1. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR**, 37(1), 1, 2018.
- Zhai, L., Ladomersky, E., Lauing, K. L., Wu, M., Genet, M., Gritsina, G., Gyórfy, B., Brastianos, P. K., Binder, D. C., Sosman, J. A., Giles, F. J., James, C. D., Horbinski, C., Stupp, R., & Wainwright, D. A. Infiltrating T Cells Increase IDO1 Expression in Glioblastoma and Contribute to Decreased Patient Survival. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, 23(21), 6650–6660, 2017.
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., Rubin, S. C., & Coukos, G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **The New England Journal of Medicine**, 348(3), 203–213, 2003.
- Zhu, J., Powis de Tenbossche, C. G., Cané, S., Colau, D., van Baren, N., Lurquin, C., Schmitt-Verhulst, A.-M., Liljeström, P., Uyttenhove, C., & Van den Eynde, B. J. Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. **Nature Communications**, 8(1), 1404, 2017.