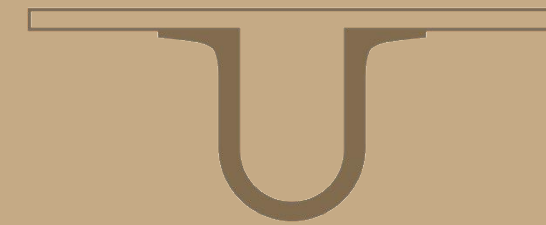




UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Magda Sofia Pereira da Costa Fonseca

**PAPÉL DA INFLAMAÇÃO CRÓNICA E DO SISTEMA IMUNITÁRIO
NO CONTROLO DA METASTIZAÇÃO PULMONAR DO
MELANOMA NO CONTEXTO DE OBESIDADE**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pelo
Professor Doutor João Nuno Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra

Setembro de 2018

Faculdade de Farmácia

**PAPEL DA INFLAMAÇÃO CRÓNICA E DO SISTEMA
IMUNITÁRIO NO CONTROLO DA METASTIZAÇÃO
PULMONAR DO MELANOMA
NO CONTEXTO DE OBESIDADE**

Magda Sofia Pereira da Costa Fonseca

Tese no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica,
orientada pelo Professor Doutor João Nuno Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra

Setembro de 2018



**UNIVERSIDADE D
COIMBRA**



Dedico este trabalho a todos os doentes de melanoma,
que tenham fé nos investigadores do mundo inteiro que se esforçam, diariamente,
para descobrir novas formas de melhorar a sua qualidade de vida.

Agradecimentos:

Antes de mais, quero expressar o meu agradecimento à vida, por me ter possibilitado a oportunidade de concretizar o início de um percurso que tentei fazer, há cerca de 13 anos atrás, mas que, perante o que vivenciei neste período, vejo que agora é, efetivamente, o momento adequado para levar adiante uma das minhas paixões, a investigação em oncologia, em prol do bem-estar do outro. Acreditar é poder, sem sombra de dúvida!

Igualmente, quero expressar o sentimento de prazer que tive ao realizar este trabalho de investigação, em todo o seu percurso. É, realmente, um trabalho fascinante ser investigador e, quando o trabalho é feito com amor e paixão, ainda mais delicioso se torna o caminho até chegar ao seu produto final!

Começo por agradecer aos meus orientadores da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, onde desenvolvi esta tese, nomeadamente à professora Doutora Raquel Soares e ao Doutor Pedro Coelho, pela boa orientação que me deram e pelo agradável acolhimento que me proporcionaram na equipa de trabalho.

Agradeço, igualmente, aos colegas da equipa e do Departamento de Biomedicina, pelo apoio prestado no esclarecimento de dúvidas.

Agradeço aos membros de equipas do I3S (Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, da Universidade do Porto), a quem solicitei ajuda para a realização de alguns procedimentos laboratoriais, pela sua disponibilidade imediata e espírito de interajuda, nomeadamente à Doutora Perpétua do Ó e à colega de mestrado Márcia Peixoto com quem contatei durante mais tempo.

Por fim, agradeço às pessoas da minha esfera de vida mais íntima por todo o suporte dado: 1) à família, nomeadamente aos meus eternos melhores amigos que são os meus pais - serão sempre poucas as palavras de reconhecimento para eles; 2) aos amigos que me acompanharam mais de perto nesta fase, pela confiança depositada nas minhas capacidades; e 3) a uma pessoa que entrou, recentemente, na minha vida, que é muito especial e importante para mim, e que, desde o primeiro momento, acreditou em mim e sei que me apoiará a seguir a minha paixão no futuro, que é o meu namorado.

Termino escrevendo que, se esta é, realmente, a minha missão de vida, que sinto que seja, então, que no dia da defesa desta tese, eu consiga transmitir toda essa vibração positiva e que ela me acompanhe no presente e no futuro para me ajudar a descobrir soluções terapêuticas e preventivas para melhorar a qualidade de vida do doente oncológico!

Resumo:

A obesidade é considerada um fator de risco para o aparecimento de melanoma maligno. Um dos órgãos para o qual os melanócitos tumorais apresentam maior tropismo é o pulmão. A resposta imunológica pulmonar é um dos fatores-chave que modula a metastização, estando muita investigação a ser feita nesse âmbito. Resultados recentes sugerem que a metastização pulmonar do melanoma está reduzida em animais obesos. Pretendeu-se investigar esta questão, analisando a influência da obesidade em dois componentes muito importantes no controlo da metastização: a inflamação crónica, associada ao excesso de tecido adiposo, e o sistema imunitário pulmonar. Analisaram-se metástases e parênquima pulmonar de ratinhos C57Bl6/J obesos (submetidos a dieta gorda) e não obesos. Começou-se por quantificar a proliferação e a apoptose nas metástases, tendo-se observado que estas encontram-se, predominantemente, em latência metabólica, quer em animais obesos quer normoponderais. Foram quantificados, seguidamente, os focos inflamatórios e os mastócitos pela coloração de Giemsa, tendo-se observado que os animais obesos apresentam um estado inflamatório latente mais evidente, com maior número de mastócitos no seu parênquima, mas menor nas metástases. Para melhor caracterizar a interação melanoma-macrófagos alveolares no pulmão, foram realizados ensaios em culturas celulares de macrófagos RAW 264.7 e de melanoma B16F10, em meio condicionado de adipócitos 3T3L1, tendo-se verificado que o meio condicionado de 3T3L1 reduz a viabilidade de ambos os tipos celulares e contribui muito pouco para a repolarização das RAW 264.7 quando ativadas pelo LPS de E.coli. Os resultados obtidos sugerem que a obesidade reduz a metastização pulmonar do melanoma através da redistribuição da população imunológica local e do efeito da inflamação latente.

Palavras-chave: Melanoma, metástases, obesidade, mastócitos, macrófagos alveolares, inflamação, pulmão

Abstract:

Obesity is considered a risk factor for the appearance of malignant melanoma. One of the organs for which tumor melanocytes present the greatest tropism is the lung. The pulmonary immune response is one of the key factors that modulate metastasis, with much research to be done in this area. Recent results suggest that lung metastasis of melanoma is reduced in obese animals. The aim of this study was to investigate the influence of obesity on two very important components in the control of metastasis: chronic inflammation, associated with excess adipose tissue, and the pulmonary immune system. Metastases and lung parenchyma of obese C57Bl6/J (fat diet) and non-obese mice were analyzed. It was begun by quantifying the proliferation and apoptosis in the metastases, being observed that these are predominantly in metabolic latency, in both obese and normoponderal animals. The inflammatory foci and mast cells were, then, quantified by Giemsa staining. Obese animals had a more evident latent inflammatory state, with a higher number of mast cells in their parenchyma, but lower in metastases. In order to better characterize the melanoma-alveolar macrophages interaction in the lung, assays were performed on cell cultures of RAW 264.7 macrophages and B16F10 melanoma in conditioned medium of 3T3L1 adipocytes. The conditioned medium of 3T3L1 was found to reduce the viability of both cell types and contributes very little to the repolarization of RAW 264.7 when activated by LPS of E.coli. The results suggest that obesity reduces lung metastasis of melanoma through redistribution of the local immunological population and the effect of latent inflammation.

Key words: Melanoma, metastases, obesity, mast cells, alveolar macrophages, inflammation, lung

Lista de abreviaturas:

TAM's – “Tumor Associated Macrophages”

TAMC's – “Tumor Associated Mast Cells”

IL-1 – Interleucina 1

TNF alfa – “Tumor Necrosis Factor” alfa

IL-6 – Interleucina 6

iNOS – síntase do óxido nítrico isoforma indutível

IL-10 – Interleucina 10

TGF beta – “Tumor Growth Factor” alfa

VEGF – “Vascular Endothelial Growth Factor”

FBS – soro bovino fetal

HFD – “High Fat Diet”

SC – subcutânea

IV – Intravenosa

NI – Não inoculado

CT – Controlo

LAP – Localização Alveolar Periférica

LANP – Localização Alveolar Não Periférica

LSA – Localização Supraalveolar

BrdU – Bromodesoxiuridina

TUNEL – “Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling”

DAPI – “4',6-Diamidine-2'-phenylindole”

PBS – “Phosphate Buffer Saline”

DAB – Diaminobenzidina

PBST – “Phosphate Buffer Saline Triton X-100”

LPS – Lipopolissacarídeo

MTT – “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide”

MN – Meio Normal/”standard”

MC – Meio Condicionado

TA – Tecido Adiposo

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 <i>Melanoma</i>	1
1.2 <i>Obesidade e sua interação com o melanoma</i>	1
1.3 <i>Imunidade no melanoma</i>	4
1.4 <i>Objetivos propostos</i>	7
2. Materiais e métodos	9
3. Resultados.....	17
4. Discussão.....	31
5. Conclusões e perspectivas futuras	37
6. Referências bibliográficas	39

1. Introdução:

1.1. *Melanoma*

O cancro cutâneo é o tipo de malignidade mais prevalente na população caucasiana, sendo o melanoma a forma mais agressiva, apesar de não ser a mais frequente (1). Os estudos epidemiológicos indicam que os indivíduos com idade superior a 50 anos, independentemente do seu grupo socioeconómico, são os mais afetados (2). Por outro lado, a incidência do melanoma maligno tem crescido anualmente, a nível mundial, com uma taxa de cerca de 0,6% (1). Este incremento deve-se, em parte, ao aumento dos rastreios de deteção precoce do cancro da pele, da execução de biópsias e do registo dos casos de incidência em plataformas de dados sobre a saúde pública.

O melanoma é uma consequência da transformação maligna dos melanócitos localizados na junção dermo-epidérmica da pele (3). Há muitos fatores de risco para o melanoma maligno (4) sendo alguns dos principais: a) exposição frequente à radiação ultravioleta (2) (5) sobretudo com picos de intensidade; b) exposição a radiação ultravioleta artificial; c) queimaduras solares; d) número de nevos cutâneos superior a 25; e) pele com fotótipos muito baixos (I e II) (2). Outros fatores de risco, como os ambientais, podem contribuir para o progressivo crescimento da incidência do melanoma: a) cosméticos; b) conservantes; c) alteradores endócrinos; d) metais pesados; e) herbicidas e pesticidas; e f) condições metabólicas patológicas, como a obesidade e outras doenças invasivas (2).

1.2 *Obesidade e sua interação com o melanoma*

Efetivamente, a obesidade tem um peso estimado de cerca de 10 a 20%, de entre todas as causas identificadas e possíveis de cancro (2). Sendo uma condição metabólica cuja incidência tem triplicado, nos últimos 40 anos, um pouco por todo o mundo (2), e estando já evidenciada a sua associação com a maior probabilidade de iniciação e progressão tumoral (6) torna-se

primordial estudar se no caso do melanoma esta associação se verifica igualmente, visto, como o referido, este cancro aumentar a sua incidência de forma muito rápida. Porém, os estudos já realizados são controversos. Alguns estudos mostram que a associação é mais significativa nos homens do que nas mulheres; outros indicam que só nas zonas geográficas onde a intensidade da radiação ultravioleta é menor é que a obesidade é um significativo fator de risco (2). Portanto, mais estudos precisam de ser feitos para uniformizar os resultados.

Relativamente ao melanoma, de uma forma geral, as evidências apontam para uma contribuição muito significativa das modificações do tecido adiposo, na obesidade, para a iniciação, progressão, invasão e metastização (7) do melanoma primário, essencialmente devida à proximidade do tecido adiposo subcutâneo do tumor primário (8)(9). Estudos feitos em ratinhos ingerindo uma dieta rica em gorduras (“High fat diet”) revelou que a injeção subcutânea da linha celular B16F10, de melanoma maligno, provocou o desenvolvimento de tumores primários maiores do que nos ratinhos controlo alimentados com uma dieta normal (“Standard diet”) (10). Outro estudo revelou que as células B16F10 incubadas com soro plasmático de ratinhos obesos passam para o estado de transição epitélio-mesenquimal, altamente favorecedor da invasão e metastização celular (11).

Muitos são os mecanismos propostos para esta associação entre a obesidade a progressão do melanoma (7), mas que precisam de ser devidamente aprofundados e esclarecidos. Os mais importantes estão resumidos na figura 1.

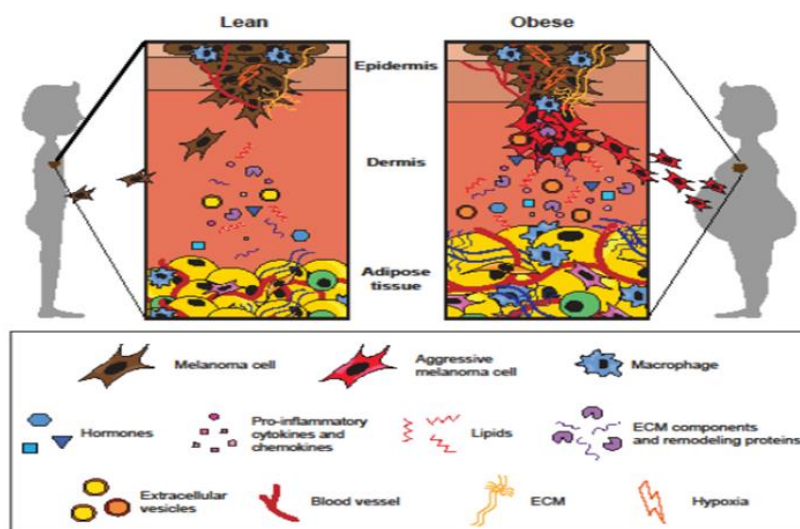


Figura 1. Modificações do tecido adiposo na obesidade influenciam a progressão do melanoma. O tecido adiposo secreta fatores solúveis e exossomas, que estimulam a proliferação, migração e metastização do melanoma primário. Na obesidade, estas moléculas estão quantitativa e qualitativamente alteradas, o que aumenta mais a progressão do melanoma. A obesidade modifica, igualmente, o microambiente tumoral através da promoção de um estado inflamatório crónico, da remodelação da matriz extracelular e da hipóxia tecidual. Adaptada de *Obesity and melanoma: Could fat be fueling malignancy?*, 2017, de Clement et al

O tecido adiposo sofre várias modificações quando a obesidade está instalada, quer a nível dos adipócitos, quer no microambiente circundante, desde a hipertrofia e hiperplasia adipocitária, ao stress oxidativo, hipóxia e inflamação crónica (12). O perfil de secreção das adipocinas está alterado, com aumento da leptina e diminuição da adiponectina (8) (13).

Igualmente aumentada está a secreção de citocinas pró-inflamatórias, de proteínas remodeladoras da matriz extracelular e de ácidos gordos livres, tornando-se estas biomoléculas como os principais substratos energéticos das células adjacentes (8) (12) A angiogénese, bem como a fibrose extracelular, estão intensificadas durante a progressão tumoral. Simultaneamente, aumenta a infiltração de células imunitárias devido ao estado inflamatório constante (8) (12) Todos estes fenómenos tendem a ser mediados por vesículas extracelulares cuja secreção está aumentada pelos adipócitos expandidos, como os exossomas (14) que contêm moléculas solúveis que medeiam a comunicação parácrina e endócrina, a partir do tecido adiposo, acreditando-se ser uma das causas possíveis para a invasão e metastização do melanoma, bem

como para a autorregulação do crescimento do melanoma primário. Efetivamente, constatou-se que os exossomas adipocitários, na obesidade, estimulam a reprogramação metabólica dos melanócitos tumorais, favorecendo a beta-oxidação lipídica como mecanismo principal de proliferação do melanoma (8). Estas vesículas extracelulares estão, igualmente, implicadas na preparação dos nichos pre-metastáticos nos pulmões e no fígado, através da mobilização de populações de células mielóides e hematopoiéticas para estes órgãos.

1.3 *Imunidade no melanoma*

Como referido, o melanoma, na presença do ambiente pro-inflamatório promovido pelo excesso de tecido adiposo, recruta, mais eficazmente, células imunitárias para se integrarem no microambiente tumoral, de modo a proporcionarem uma imunoproteção, logo uma progressão e metastização mais rápidas. Em estudos recentes em modelo animal, constatou-se que ratinhos obesos têm maior probabilidade de apresentarem deterioração imunitária (2). Esta senescência imunológica prematura sugere uma ligação entre a obesidade e um sistema imunitário disfuncional.

O melanoma maligno é um tipo de tumor muito imunogénico, pois estimula quer uma resposta imunitária inata, quer adaptativa. As células imunitárias que mais frequentemente infiltram o tecido adiposo inflamado e, por consequência, são as que mais abundantemente são encontradas no microambiente do melanoma são os linfócitos (15), os neutrófilos (16), os mastócitos (17) e os macrófagos (18) (19), como mostra a figura 2. Estas células segregam uma variedade grande de substâncias pro-inflamatórias que contribuem para a inflamação crónica característica do tecido adiposo na obesidade. Destas, os tipos celulares que têm sido mais estudados são os macrófagos e os mastócitos mais recentemente.

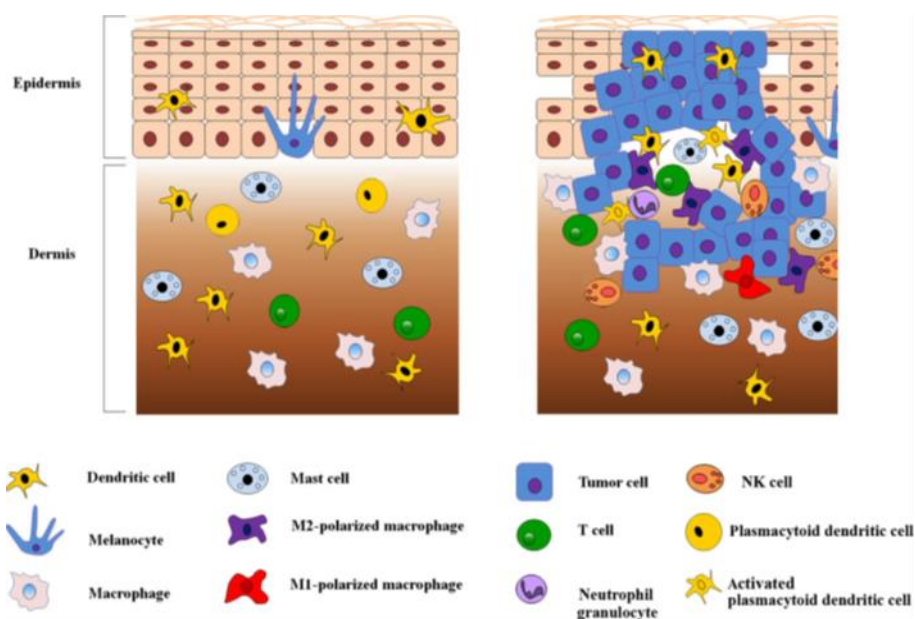


Figura 2. Sistema imunitário na pele normal e no melanoma primário: esquema representativo da redistribuição dos macrófagos, dos neutrófilos, das células dendríticas, dos mastócitos, das células dendríticas plasmacitóides e das células “natural killer” no melanoma maligno. Adaptada de *Innate immunity in cutaneous melanoma*, 2016, de Mignogna et al

Como referido, a infiltração macrófágica promove um ambiente permissivo para a metastização do melanoma primário e, quando há excesso de tecido adiposo, na obesidade, esta imunoproteção é mais extensa. (12) A angiogénese aumenta, bem como a linfangiogénese e a produção de citocinas pro-inflamatórias pelo tumor primário (8). Os macrófagos também segregam moléculas que facilitam a metastização pulmonar do melanoma, através da redução da acumulação de células “natural killer” no parênquima pulmonar, como é o caso da YKL-40 (20). Efetivamente, para que haja uma eficaz metastização pulmonar é, igualmente, necessária a intervenção imunoprotetora dos macrófagos residentes ou alveolares (18). Naturalmente, os macrófagos alveolares, residentes nos espaços alveolares intersticiais, têm um papel muito importante na imunorregulação pulmonar e previnem muitas doenças pulmonares, nomeadamente, o cancro, através de um efeito citotóxico direto por fagocitose, ou pela secreção de citocinas inflamatórias e ativação das células “natural killer” (18). Na presença de células de melanoma metastizado, estes macrófagos alveolares podem perder capacidade tumoricida e serem recrutados para o microambiente tumoral, de modo a auxiliarem a progressão neoplásica no pulmão. A este fenómeno designa-se reversão da polarização

macrofágica (21) e é uma ferramenta de implantação e sobrevivência do melanoma no pulmão (18). Resumidamente, a figura 3 apresenta os principais tipos de fenótipos macrofágicos.

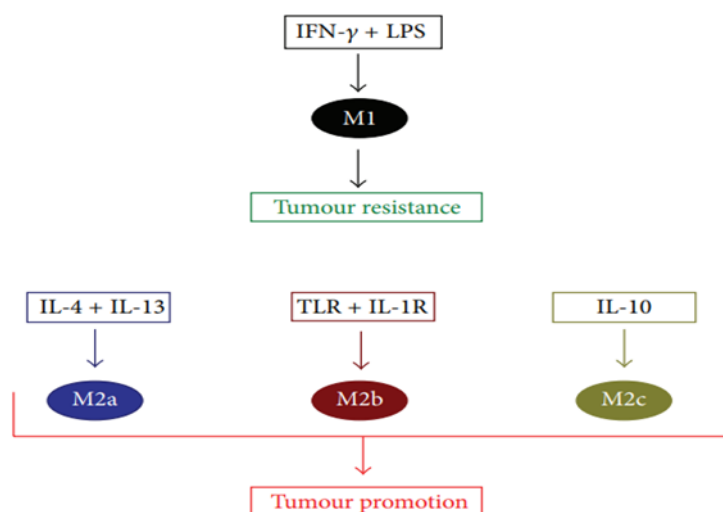


Figura 3. Polarização dos macrófagos alveolares. A ação anti-tumoral é mediada pelas citocinas IL-1, TNF ALFA e IL-6, bem como pela enzima iNOS, enquanto que a ação pró-tumoral é mediada pelas citocinas IL-10 e TGF-BETA, e por moléculas angiogénicas. Adaptada de *Alveolar Macrophage Polarisation in Lung Cancer, 2014, de Almatroodi et al*

O fenótipo predominante no microambiente do melanoma é o M2 (ativação alternativa macrofágica), pois é o fenótipo pró-tumoral por excelência (22) através da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e de VEGF que é um mediador da angiogénese (22) Em menor quantidade, está presente o fenótipo M1 (ativação clássica macrofágica), pois é o que exerce ação tumoricida (19). Um pequeno número de macrófagos apresenta um fenótipo misto, ou seja, ambos M1 e M2, numa percentagem média de 5%, de uma forma generalizada, segundo os resultados dos últimos estudos realizados (18). Devido a esta plasticidade, os macrófagos podem, facilmente, sofrer modulação fenotípica por ação das células do melanoma, tornando-se TAM's ("Tumor Associated Macrophages") (23).

Outro tipo de células que pode modular a fenotipagem dos macrófagos alveolares é os mastócitos (24). As evidências científicas recentes apontam para que os mastócitos sejam outro tipo de células imunitárias que podem infiltrar o tecido adiposo e o microambiente do melanoma primário e metastático (TAMCs ou “Tumor Associated Mast Cells”) (17) (25). Sugere-se uma dualidade funcional destas células, relativamente ao melanoma: ação tumoricida e pró-tumoral (26). Estes papéis dependem, por um lado, do modelo tumoral em questão, do estadio e do tipo de tumor, das características do microambiente tumoral e da sua localização dentro do tumor (intratumoral vs peritumoral). A ação pró-tumoral consiste, essencialmente, na promoção do aumento da angiogénese e da linfangiogénese, e do recrutamento de outras células imunitárias adjuvantes da progressão tumoral (26). A figura 4 ilustra a dupla função dos TAMCs.

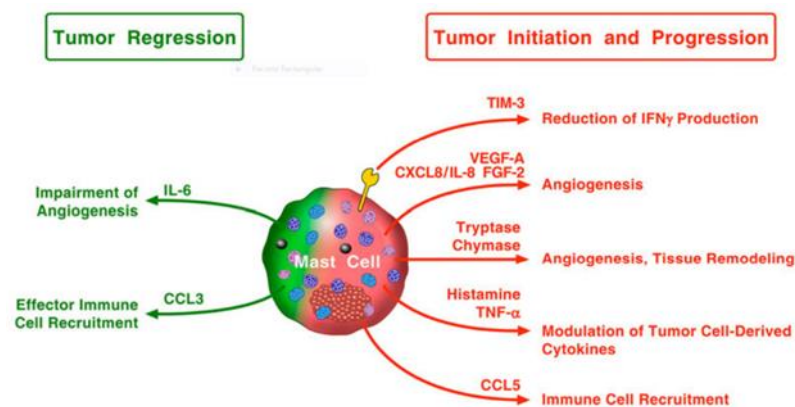


Figura 4. Dualidade funcional dos mastócitos relativamente ao melanoma. Adaptada de *Controversial role of mast cells in skin cancers*, 2016, de Varricchi et al

1.4 Objetivos propostos:

Pesquisas feitas sobre a modulação do microambiente do melanoma metastático pulmonar, relativamente ao infiltrado de macrófagos e de mastócitos, em contexto de obesidade, estão em fase inicial. Logo, definir o papel específico de cada um destes tipos celulares para a sobrevivência

tumoral, num ambiente sistémico de inflamação crónica de baixo grau, como o é a obesidade, continua a ser um desafio para a comunidade científica.

Resultados recentes em modelo de ratinho sugerem que a obesidade pode dificultar a metastização pulmonar do melanoma. Observou-se que, no pulmão previamente inflamado, o número e a área total das metástases obtidas, após a inoculação intravenosa de B16F10 – células de melanoma maligno de murganho – em ratinho obeso, diminuíram quando comparadas com animais normoponderais inoculados com a mesma linha celular. Com o objetivo de identificar os possíveis mecanismos inerentes a este resultado, procedeu-se ao estudo, por imunofluorescência, imunohistoquímica e imunocitoquímica, em cortes parafinados de tecido pulmonar e em cultura celular, da resposta imunológica mediada pelos mastócitos, pelos macrófagos alveolares, pelas suas subpopulações M1 e M2, e pelos linfócitos T CD8+, à invasão tumoral do parênquima pulmonar previamente inflamado, em contexto metabólico de obesidade, usando como controlos ratinhos normoponderais. O pulmão dos ratinhos inoculados por via subcutânea foi, igualmente, avaliado para determinar o efeito endócrino da tumorização primária sobre a metastização pulmonar. Pretendeu-se, desta forma, compreender melhor o papel da inflamação e do sistema imunitário no controlo da metastização pulmonar do melanoma no contexto de obesidade.

2. Materiais e métodos:

2.1 **Cultura celular.** Foram utilizadas duas linhas celulares: a B16F10 (ATCC CRL-6475) e a RAW 264.7 (ATCC TIB-71), ambas provenientes de murganho. A linha B16F10 é, originalmente, isolada das metástases pulmonares de melanoma dos ratinhos C57Bl6/J e consiste em células de melanoma cutâneo metastático com alto tropismo para a invasão pulmonar. A linha RAW 264.7 consiste em macrófagos não diferenciados, isolados a partir do tumor induzido em ratinhos Balb/c, pelo vírus leucémico Abelson. Ambas as linhas foram cultivadas no meio “standard” Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (Sigma-Aldrich, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor (Sigma-Aldrich, USA) e com 1% de penicilina/ estreptomicina / anfotericina B (Sigma-Aldrich, USA). As culturas foram mantidas numa incubadora a 37°C, em atmosfera húmida e com 5% de CO₂. No caso da cultura da linha RAW 264.7, em cada placa de 5mL cultivada adicionou-se um volume extra de 10% de soro bovino fetal (FBS) inativado pelo calor ao meio “standard” já suplementado com os componentes acima referidos, de modo a otimizar o crescimento celular. A manipulação celular foi feita de modo a atingir-se entre 70 a 80% de confluência. Foi também obtido meio condicionado de adipócitos brancos 3T3L1 previamente ao início do trabalho experimental. Resumidamente, pré-adipócitos foram diferenciados em adipócitos brancos por incubação com uma mistura hormonal composta por insulina, dexametasona e isobutilmetilxantina; posteriormente, após cultivo em meio adequado, o meio condicionado dos adipócitos brancos 3T3L1 foi isolado ao 8º dia de cultura e armazenado a -80°C para ser usado nos ensaios subseqüentes.

2.2 **Tratamento dos ratinhos C57Bl6/J com dieta “high-fat” e dieta “normal standard”.** Os ratinhos C57Bl6/J, machos e com 5 semanas de idade, foram adquiridos à empresa Charles River (França) e mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Os ratinhos foram adaptados às condições climatéricas do biotério e tiveram livre acesso a comida e água. Estiveram em quarentena durante 10 dias antes do seu uso e foram mantidos, durante todo o tempo, num ambiente controlado e livre de patogénicos específicos: 23±5 °C, 35±5% de humidade relativa e ciclos de 12 horas de alternância luminosidade/obscuridade. Posteriormente, os ratinhos foram distribuídos, aleatoriamente, por 2 grupos, de acordo com o tipo de dieta a

testar: a dieta normal e a dieta rica em gorduras (“High Fat Diet“ ou HFD). A dieta normal (#2014;Teklad Diets, USA) foi constituída por 13% de gordura do óleo de soja, 67% de carboidratos e 20% de proteínas; a dieta HFD (EFR/M acc. D12451 (I) mod; ssniff Spezialdiäten, Alemanha) conteve 45% de gordura de banha, 35% de carboidratos e 20% de proteínas. As duas dietas foram renovadas diariamente e fornecidas livremente aos ratinhos. O peso e o consumo de dieta e água foram monitorizados durante o estudo.

2.3 Inoculação da linha celular B16F10. Após 26 semanas de administração das duas dietas, os ratinhos de ambos os grupos foram, aleatoriamente, distribuídos em outros 3 grupos: SC (inoculação subcutânea, 6 animais/dieta), IV (inoculação intravenosa, 6 animais/dieta) e CT (não inoculados/controlo, 3 animais/dieta). Ao grupo SC foi injetada, por via subcutânea, 1×10^6 células B16F10 ressuspensas em 0,1 mL de PBS, na zona da prega dorsal, e o desenvolvimento de tumores palpáveis foi monitorizado ao longo dos 14 dias seguintes. Ao 15º dia, os ratinhos foram sacrificados, os tumores e os pulmões excisados e embebidos em parafina para posterior análise histológica. Ao grupo IV foi injetada, por via intravenosa, 2×10^5 células B16F10 ressuspensas em 0,25mL de uma solução salina a 0,9%, na veia da cauda; após 3 semanas, os ratinhos foram sacrificados, os pulmões foram excisados e embebidos em parafina para posterior análise histológica. Ao grupo CT não foram injetadas células B16F10. Todos estes procedimentos foram conduzidos por pessoas acreditadas, de acordo com as normas da Comunidade Europeia de Experimentação Animal e as regras protocolares do biotério.

2.4 Análise histológica. Os tecidos do melanoma primário e pulmonares foram fixados com uma solução tamponada de formaldeído 10%, desidratados e embebidos em parafina. Foram obtidos cortes dos blocos parafinados, com 4 um de espessura, sujeitos a coloração de hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica. A seleção dos cortes parafinados foi feita de acordo com a integridade e posição do tecido pulmonar nas lâminas e, no caso dos inoculados por via IV, da presença de metástases pulmonares. O tamanho amostral dos casos de ratinhos não inoculados (CT), inoculados por via IV (IV) e por via SC (SC), não obesos e obesos, foi, respetivamente: 3 (CT1 CD, CE e SM – não obesos), 3 (CT2 CD, CE e SM – obesos), 5 (IV7 CE, ID, SD, SE e SM – não obesos), 2 (IV8 CE e SM - obesos), 3 (SC3 CE, ID e SM – não

obesos) e 3 (SC4 CE, SD e SM – obesos). Os ensaios realizados no pulmão dos ratinhos englobaram as metástases, no caso do grupo dos IV apenas, e o parênquima, em todos os 3 grupos (CT, SC e IV). As metástases foram diferenciadas quanto à sua localização: alveolar periférica (LAP), alveolar não periférica (LANP) e supraalveolar (LSA).

2.5 Ensaio de avaliação da proliferação dos melanócitos nas metástases pulmonares. Seguiu-se o protocolo recomendado pelo teste do BrdU – “BD Pharmingen, BrdU In-Situ Detection Kit” (USA). Procedeu-se à contagem dos melanócitos com marcação positiva para o BrdU, relativamente ao número total de melanócitos em cada metástase, e exprimiou-se o resultado em percentagem média de melanócitos em proliferação. Primeiramente, avaliou-se o estado proliferativo em todo o pulmão e, posteriormente, agrupou-se as metástases de acordo com a sua localização. A observação microscópica foi feita no microscópio ótico “NIKON Eclipse 50i” (USA), em várias ampliações.

2.6 Ensaio de avaliação da apoptose dos melanócitos nas metástases pulmonares. Seguiu-se o protocolo sugerido pela técnica TUNEL – “In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein”, da Roche (Suíça). A coloração dos núcleos celulares foi feita com DAPI em metanol puro (1:1000, 5 minutos de atuação em câmara húmida). Procedeu-se à contagem dos melanócitos com marcação positiva para apoptose, relativamente ao número total de melanócitos em cada metástase, e exprimiou-se o resultado em percentagem média de melanócitos em apoptose. A observação microscópica foi feita com o microscópio de fluorescência “ZEISS” com sistema “Apotome” (Dinamarca) e a captura e tratamento das imagens com o programa “AxioVision” (Dinamarca).

2.7 Imunohistoquímica para quantificação dos linfócitos T CD8+. Os cortes de tecido pulmonar selecionados foram desparafinados em xilol durante 30 minutos e, seguidamente, hidratados numa série de gradação decrescente de etanol (100%, 90% e 70%), durante 5 minutos em cada um, terminando em água destilada durante 5 minutos igualmente. Seguidamente, a peroxidase endógena foi bloqueada através do uso de uma solução de 4% de

peróxido de hidrogénio em PBS, durante 40 minutos. Após lavagem com PBS, procedeu-se à recuperação antigénica térmica, a 98°C em banho-maria, durante 10 minutos, usando uma solução aquosa de citrato de sódio com Tween 20 0,05%, pH 6,0 como adjuvante. Posteriormente ao arrefecimento em água corrente e à lavagem com PBS, procedeu-se ao bloqueio das ligações inespecíficas com uma solução em PBS de 10% de NSS (“Newborn Suine Serum”) e 2% de BSA (“Albumin Bovine Fraction V”, NZYTech, Portugal) durante 1 hora, à temperatura ambiente. A incubação com o anticorpo primário “rabbit anti-mouse” CD8 policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA, SC-7188), na diluição 1:50 em NSS, foi feita “overnight”, a 4°C. Após lavagem com PBS, incubou-se com o anticorpo secundário “goat anti-rabbit” IgG policlonal (Abcam, USA, ab6012), na diluição 1:100 em NSS, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Paralelamente, deixou-se a complexar, durante 30 minutos, uma solução em NSS de 1 uL de avidina e 1 uL de biotina (VECTASTAIN Elite ABC Kit (Standard*), Vector Laboratories, USA, PK-6100). Após lavagem com PBS, procedeu-se à incubação com o complexo avidina-biotina durante 50 minutos, à temperatura ambiente. Seguidamente à lavagem com PBS, procedeu-se à revelação da reação com uma solução de DAB (DAB substrate kit, Abcam, USA, ab94665) em tampão adequado (7,5 uL DAB por cada 500uL de tampão), até um tempo máximo de 5 minutos, período de tempo este estimado por otimização da técnica. Após a remoção da DAB, através de lavagem com PBS, efetuou-se a coloração com hematoxilina, durante 2 minutos, seguida da lavagem em água corrente até ser eliminado o excesso do corante (cerca de 10 minutos). Procedeu-se à desidratação dos cortes, através de uma série de gradação crescente de etanol (70%, 90% e 100%), durante 5 minutos em cada um, terminando no xilol durante o mesmo período de tempo. A montagem foi feita em entellan e as lâminas observadas ao microscópio ótico “NIKON Eclipse 50i” (USA), a várias magnitudes. Procedeu-se à identificação de marcação positiva para CD8+, relativamente à área total de cada metástase e do parênquima pulmonar.

2.8 Avaliação da eficácia do cromogéneo “Fast-Red” como substituto da DAB na imunohistoquímica. Foi realizado o ensaio da proliferação com BrdU, usando o kit do “Fast-Red” (Vector NovaRED Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories, USA, SK-4800) para substituir a DAB, de modo a verificar se, com o novo cromogéneo, se anularia ou reduziria a interferência

da cor castanha da melanina e dos grânulos mastocitários, de modo a otimizar a imunohistoquímica para deteção dos linfócitos T CD8+, nomeadamente. A observação microscópica foi feita no microscópio ótico “NIKON Eclipse 50i” (USA) em várias ampliações.

2.9 Coloração de Giemsa para quantificação dos mastócitos. O protocolo usado foi, previamente, otimizado para a identificação de mastócitos em carcinoma basocelular cutâneo. Resumidamente, os cortes foram desparafinados em xilol durante 30 minutos e, seguidamente, hidratados numa série de gradação decrescente de etanol (100%, 90% e 70%), durante 5 minutos em cada um, terminando em água destilada durante 5 minutos igualmente. Seguidamente, os cortes foram cobertos com corante de Giemsa, filtrado imediatamente antes do seu uso, e deixados a corar, em câmara húmida, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Seguiu-se a diferenciação em etanol a 95%, até um máximo de 5 minutos como período de tempo otimizado para obter a melhor coloração. Procedeu-se à desidratação dos cortes em etanol a 100% e em xilol, seguidamente, durante 5 minutos em cada solvente. A montagem das lâminas foi feita em entellan e a observação microscópica foi feita no microscópio ótico “NIKON Eclipse 50i”, (USA) em várias ampliações. Procedeu-se à contagem dos mastócitos corados em cada metástase, relativamente ao pulmão total e de acordo com a localização das metástases, bem como no parênquima pulmonar, exprimindo-se o resultado em valor absoluto.

2.10 Imunofluorescência com dupla marcação para a quantificação de macrófagos alveolares com fenótipo M1 e M2. Primeiramente, para verificação da presença ou ausência de fluorescência natural do tecido pulmonar dos C57Bl6/J, procedeu-se à observação microscópica de fluorescência de uma lâmina de corte de pulmão, previamente desparafinado e hidratado, de ratinho não obeso, nos comprimentos de onda correspondentes à fluorescência verde e vermelha. As fotografias desta observação microscópica foram obtidas pelo microscópio de fluorescência da marca “ZEISS” com sistema “Apotome” (Dinamarca) através do programa “Axio Vision” (Dinamarca). Após a desparafinação (xilol, 30 minutos) e hidratação (etanol 100% 5 minutos, etanol 90% 5 minutos, etanol 70% 5 minutos e água destilada 5 minutos) dos cortes de tecido pulmonar, procedeu-se à remoção da melanina com peróxido de hidrogénio 40%, em banho de água a 60°C, durante 2 horas, e subsequente lavagem em PBS. Seguidamente, fez-se a

recuperação antigénica, com solução aquosa de citrato de sódio com Tween 20 0.05%, pH 6,0, em banho de água a 98°C, durante 10 minutos, com subsequente arrefecimento e série de 2 lavagens em PBS. A eliminação da fluorescência do formaldeído foi feita posteriormente, através do uso de tetraidroborato de sódio 1mg/mL, na hotte, em 3 incubações de 10 minutos cada, mantendo os cortes teciduais em gelo, com subsequente série de 3 lavagens com PBS, sendo uma quarta lavagem feita com PBST 0,3% (PBS com Triton X-100 0,3%). Em seguida, procedeu-se ao bloqueio das ligações teciduais inespecíficas, durante 1 hora à temperatura ambiente, em câmara húmida, usando o soro de bloqueio constituído por 10% NSS (“Newborn Suine Serum”) e 2% BSA (“Albumin Bovine Fraction V”, NZYTech, Portugal) em PBST 0,3%. Incubou-se com a solução, em soro de bloqueio, dos anticorpos primários “rabbit anti-mouse” CD86 monoclonal (ABclonal, USA, A10795) e “rat anti-mouse” CD206 monoclonal (ThermoFisher Scientific, USA, MA5-16871), na diluição 1:50, “overnight”, a 4°C, em câmara húmida, mantendo o controlo negativo incubado com o soro de bloqueio. Após uma série de 3 lavagens com PBST 0.3%, procedeu-se à incubação com uma solução, em soro de bloqueio, dos anticorpos secundários “donkey anti-rabbit” conjugado com Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, USA, A21206) e “donkey anti-rat” conjugado com Alexa Fluor 594 (ThermoFisher Scientific, USA, A21209), na diluição 1:1000, durante 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara húmida. Seguiu-se uma série de 3 lavagens com PBST 0.3%, e uma última com PBS, e a eliminação da fluorescência das lipofuscinas teciduais através do uso do corante negro de sudão 0,3% (m/v) em etanol 70% (v/v), durante 10 minutos em permanente agitação mecânica ligeira. Procedeu-se a uma série de 8 lavagens rápidas com PBS e à coloração dos núcleos celulares com DAPI 1:1000 durante 5 minutos, à temperatura ambiente e em câmara húmida. Foi feita a montagem numa solução de PBS/glicerol 1:3 para observação no microscópio de fluorescência “ZEISS” com sistema “Apotome” (Dinamarca) e o programa “AxioVision” (Dinamarca), na ampliação de 100x e 400x.

2.11 Esquema de tratamentos e co-culturas. As mono e co-culturas foram feitas com as linhas RAW 264.7 e B16F10, na quantidade de 20000 e 10000 células por poço, respetivamente, em placas de 96 e 24 poços, conforme o ensaio (32) (33). O cultivo das monoculturas e da linha RAW 264.7, na co-cultura, foi feito durante 48 horas, em meio “standard” e em meio condicionado de 3T3L1, ambos suplementados com um volume extra de 10% de soro bovino

fetal (FBS) no caso das células RAW 264.7; a linha B16F10, na co-cultura de 24h, foi adicionada sob a forma de uma suspensão em meio “standard”. O tratamento das células RAW 264.7 decorreu durante 24h e consistiu na ativação com LPS de *E.coli* (O111:B4, Sigma-Aldrich, USA) (o solvente usado foi o Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium sem FBS) 4 μ g/mL por poço (32) (33).

2.12 Ensaio do MTT para avaliação da viabilidade celular. Após o procedimento descrito em 2.11, foi feita a adição de MTT em cada poço e a incubação das placas a 37°C durante 3 horas. A absorvância foi medida a 550nm e a 650nm, correspondendo este último comprimento de onda ao ensaio em branco, num leitor de placas da marca “ThermoElectron Corporation, Multiskan Ascent” (USA). Realizaram-se 3 ensaios por cada tipo de meio testado e a respetiva média \pm SEM foi calculada.

2.13 Imunocitoquímica de fluorescência para a quantificação dos fenótipos M1 e M2 macrófágicos. Numa primeira fase, realizou-se a imunocitoquímica de fluorescência na cultura das células RAW 264.7 em meio “standard” e em meio condicionado de 3T3L1, e, posteriormente, na sua co-cultura com as células B16F10. As condições da mono- e da co-cultura foram as descritas em 2.11. A fixação das células foi feita com solução de paraformaldeído 4% em PBS, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, seguida de uma série de 3 lavagens com PBS. Seguidamente, procedeu-se à permeabilização das células com uma solução de Triton X-100 0.1% em PBS, durante 30 minutos, à temperatura ambiente, seguida de uma série de 3 lavagens com PBS. Procedeu-se ao bloqueio das ligações inespecíficas com uma solução de bloqueio constituída por 10% FBS e 1% BSA em PBS, durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se à incubação com a solução, em soro de bloqueio, dos anticorpos primários “rabbit anti-mouse” CD86 monoclonal (ABclonal, USA, A10795) e “rat anti-mouse” CD206 monoclonal (ThermoFisher Scientific, USA, MA5-16871), na diluição 1:100, “overnight”, a 4°C, mantendo o controlo negativo com a solução de bloqueio. Seguidamente, fez-se uma série de 3 lavagens com PBS e a incubação com a solução, em soro de bloqueio, dos anticorpos secundários “donkey anti-rabbit” conjugado com Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, USA, A21206) e “donkey anti-rat” conjugado com Alexa Fluor 594 (ThermoFisher Scientific, USA,

A21209), na diluição 1:250, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Procedeu-se à coloração dos núcleos celulares com DAPI 1:1000, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, seguida de uma série de 3 lavagens com PBS. Finalizou-se com a montagem das lamelas de vidro em meio aquoso de PBS/glicerol 1:3 e com a respetiva observação em microscópio de fluorescência “LEICA DMI 6000-B” (Alemanha), na ampliação de 100x e 400x. Usou-se o software “Image J” para a quantificação da fluorescência verde e vermelha.

2.14 Análise estatística. A análise estatística dos resultados foi feita pelo programa IBM SPSS STATISTICS versão 25. Para os ensaios nos ratinhos, os testes usados foram os não paramétricos, nomeadamente o teste U de Mann-Whitney, e o valor de $p=0,05$ foi o nível de significância estatística considerado, havendo diferença estatisticamente significativa para valores de $p<0,05$. Para os ensaios nas culturas celulares, foi feito o teste paramétrico ANOVA, com as mesmas condições de significância estatística referidas anteriormente. Todos os valores quantitativos são expressos em média +/- S.E.M. de 3 repetições do mesmo ensaio.

3. Resultados:

3.1 Metástases pulmonares de melanoma encontram-se em latência metabólica, predominantemente em animais obesos.

O primeiro objetivo proposto foi determinar o grau de influência da obesidade no estado de crescimento das metástases pulmonares.

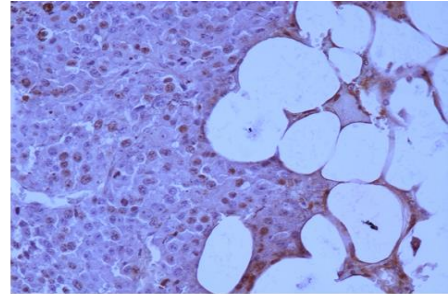
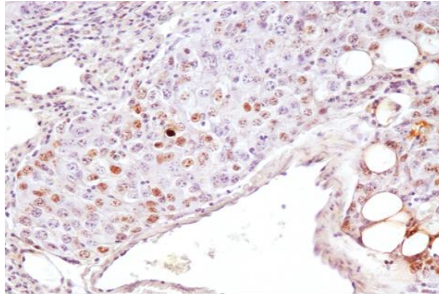
Procedeu-se ao ensaio da proliferação com o BrdU (figura 1 A) e da apoptose com o TUNEL (figura 1 B). Verificou-se que existe alguma percentagem de melanócitos em proliferação e que nenhuma destas células está em apoptose. A percentagem de melanócitos tumorais em proliferação é menor nos animais obesos, mas não há diferenças estatisticamente significativas relativamente aos animais não obesos (figura 1 C). Os resultados sugerem que os melanócitos metastáticos encontram-se, sobretudo, em latência metabólica.

As metástases com localização supraalveolar são as que apresentam maior percentagem de proliferação (figura 1 D).

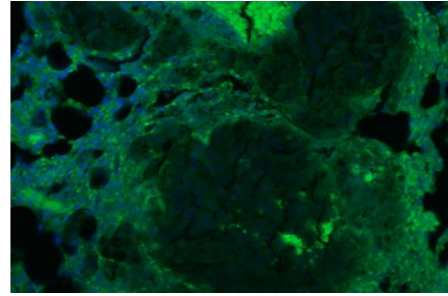
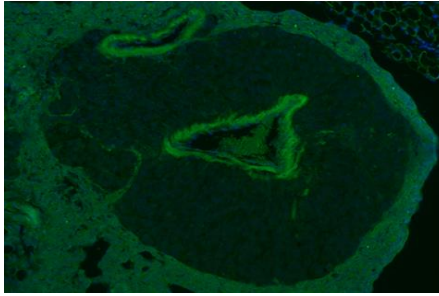
Dieta "Normal Standard"

Dieta "High Fat"

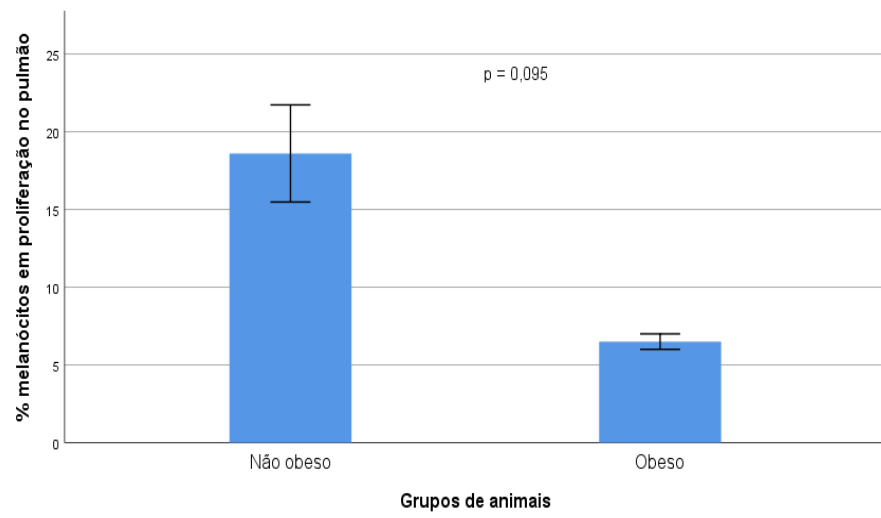
A



B



C



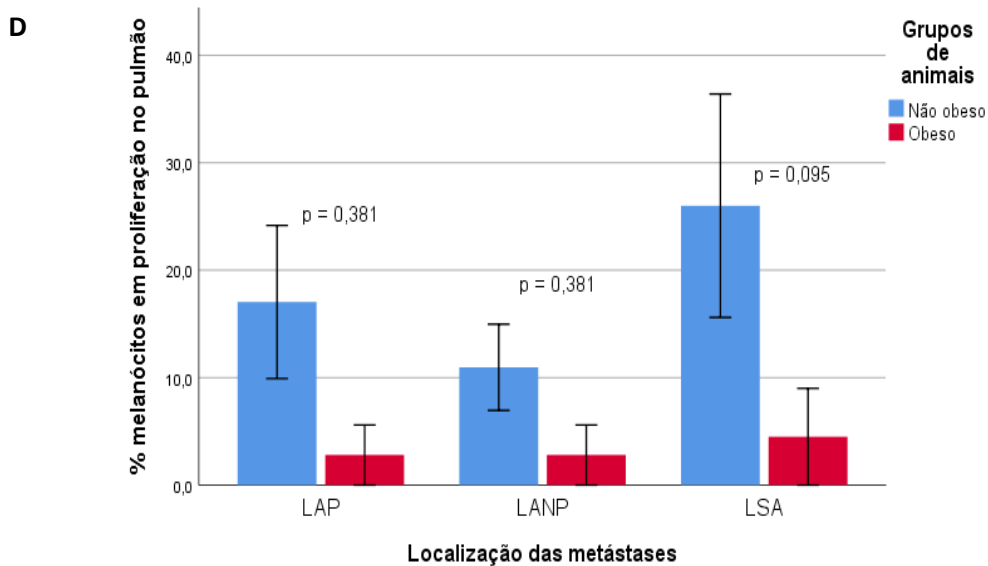


Figura 1. As metástases pulmonares de melanoma apresentam latência metabólica em animais obesos. A) Imagens representativas do ensaio de proliferação com BrdU, 200x. Células em proliferação apresentam coloração castanha. B) Imagens representativas do ensaio TUNEL para avaliação da apoptose, 200x. C) Quantificação dos melanócitos em proliferação nas metástases pulmonares de melanoma em animais não obesos e obesos. Os valores de melanócitos com marcação positiva são expressos em percentagem média +/- S.E.M. (n=7). D) Quantificação dos melanócitos em proliferação nas metástases pulmonares de melanoma, de acordo com a sua localização. LAP=localização alveolar periférica, LANP=localização alveolar não periférica, LSA=localização supraalveolar. Os valores de melanócitos com marcação positiva são expressos em percentagem média +/- S.E.M. (n=7).

Possíveis fenómenos apoptóticos foram observados em células que não melanócitos, provavelmente mastócitos, especialmente nas metástases pulmonares de ratinhos não obesos, como mostra a figura 2. Pesquisas anteriormente feitas revelaram que os mastócitos podem sofrer desgranulação, em processos inflamatórios respiratórios, mediada pela apoptose e induzida por outros tipos celulares que beneficiam dessa desgranulação para proliferar mais eficazmente (10). Parece, segundo as observações feitas neste trabalho, que fenómenos idênticos

ocorrem nas metástases pulmonares de melanoma, sobretudo em ratinhos não obesos, podendo facilitar a proliferação dos melanócitos.

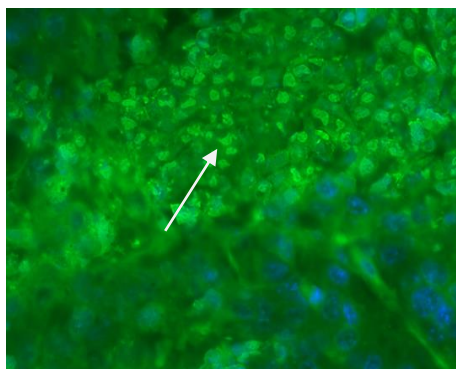


Figura 2. Ensaio de TUNEL numa metástase pulmonar de melanoma de animal não obeso, 200x. A seta assinala um mastócito em apoptose.

3.2 As metástases pulmonares de animais obesos parecem recrutar menor quantidade de mastócitos.

Antes de iniciar o estudo específico da população imunológica, foram analisados os focos inflamatórios presentes no pulmão dos diferentes grupos de ratinhos: não obesos e obesos, não inoculados e inoculados por via subcutânea e intravenosa com a linha B16F10, pela coloração de Giemsa (figura 3 A).

Foi observado um número aumentado de focos inflamatórios pulmonares em ratinhos obesos e não inoculados (figura 3 B), não sendo estas diferenças estatisticamente significativas entre ratinhos não obesos e obesos.

Estes resultados sugerem que a obesidade favorece a ocorrência de um estado inflamatório pulmonar latente, prévio à metastização.

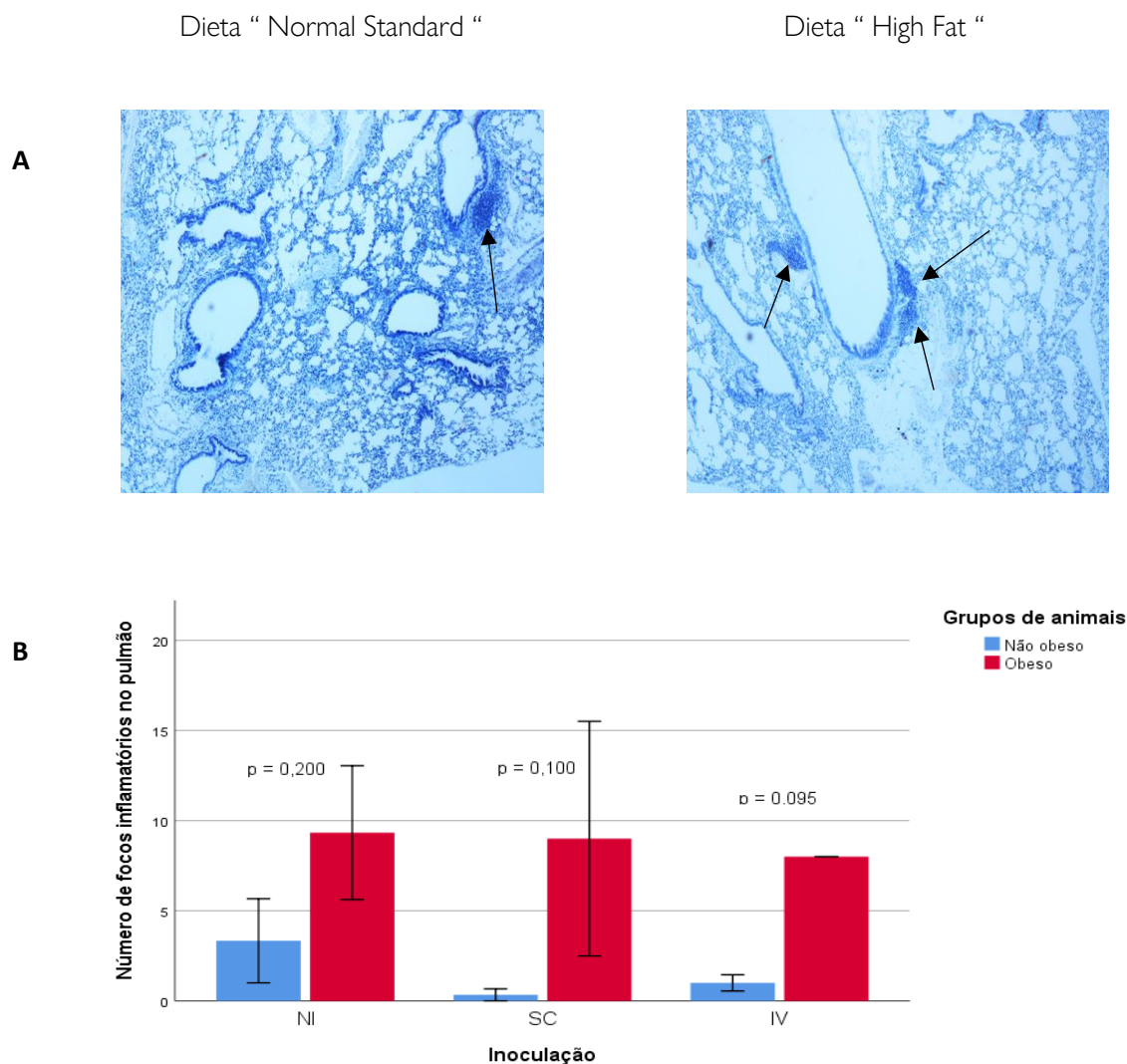


Figura 3. Os animais obesos não inoculados são os que apresentam maior número de focos inflamatórios pulmonares. A) Imagens representativas da coloração de Giemsa para quantificação dos focos inflamatórios no pulmão de animais não inoculados, 100x. Os focos inflamatórios estão assinalados com as setas. B) Quantificação do número de focos inflamatórios, de acordo com a ausência e presença de melanócitos tumorais inoculados, e de acordo com a ausência e presença de obesidade nos animais. NI= não inoculado, SC=subcutânea, IV=intravenosa. Os valores do número de focos inflamatórios são expressos em média+/- S.E.M. (n=3 para NI e SC, n=7 para IV)

Seguidamente, procedeu-se à análise da distribuição quantitativa das populações imunológicas pulmonares, primeiramente nas metástases e, posteriormente, no parênquima pulmonar. Seleccionaram-se três tipos de células imunológicas para analisar, devido ao papel central que

desempenham na proteção inata e adaptativa do pulmão: mastócitos, macrófagos alveolares e linfócitos T CD8+.

No entanto, por razões metodológicas, não foi possível identificar a população de linfócitos T CD8+, bem como a de macrófagos alveolares, utilizando a imunohistoquímica e a imunofluorescência por dupla marcação, respectivamente.

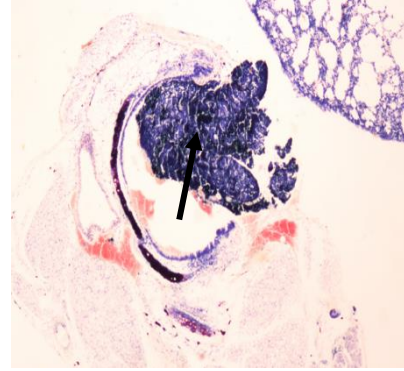
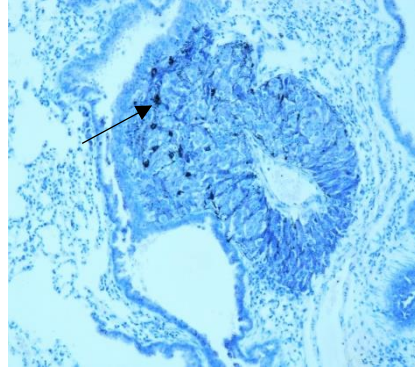
Outra população imunológica analisada nas metástases foi a dos mastócitos, por coloração de Giemsa (figura 4 A). Observou-se que nos ratinhos obesos os mastócitos estão presentes em menor quantidade, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas entre não obesos e obesos, como mostra a figura 4 B. As metástases com localização alveolar periférica contêm maior número de mastócitos (figura 4 C).

Curiosamente, observou-se que os animais obesos não inoculados apresentam maior número de mastócitos no seu parênquima pulmonar, não havendo diferenças estatisticamente significativas relativamente aos não obesos (figura 5A e B).

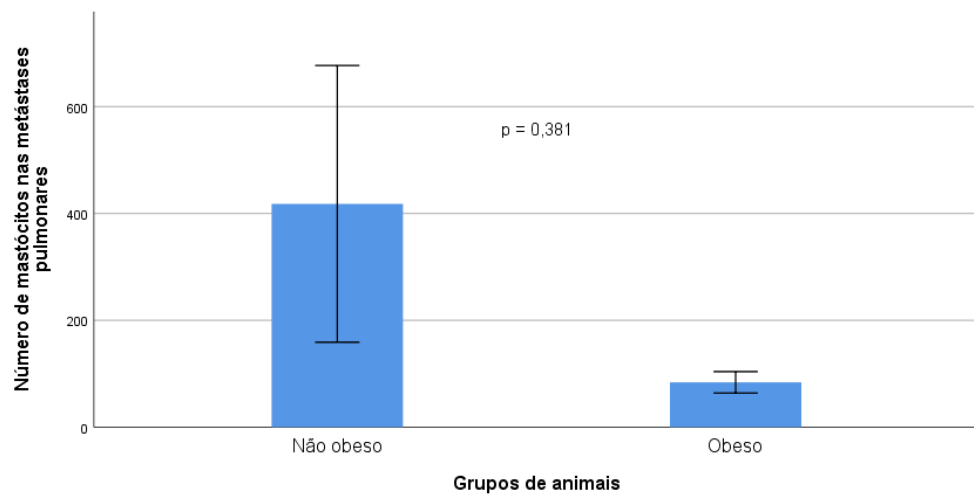
Dieta "Normal Standard "

Dieta " High Fat "

A



B



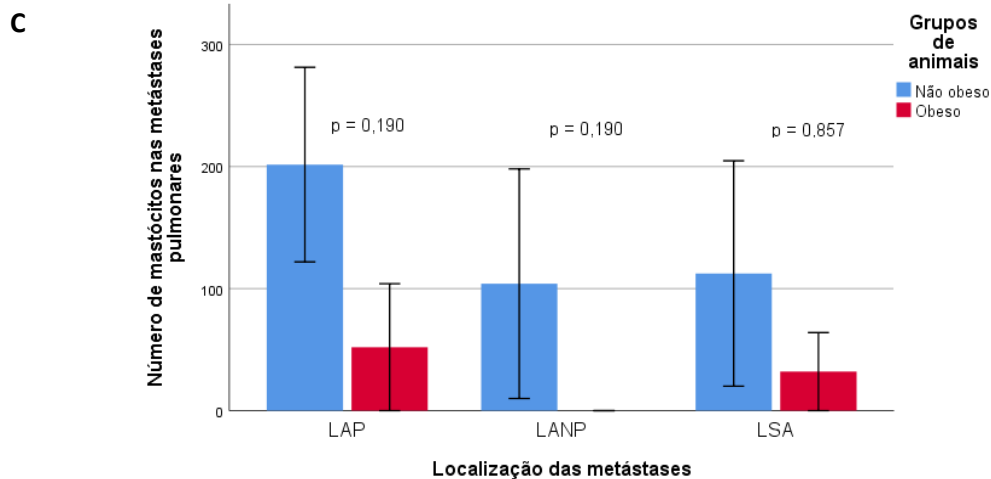


Figura 4. Os animais obesos apresentam menor número de mastócitos nas suas metástases pulmonares. A) Imagens representativas da coloração de Giemsa para quantificação dos mastócitos nas metástases pulmonares, 100x. Os mastócitos estão assinalados com as setas. B) Quantificação do número de mastócitos nas metástases pulmonares de melanoma nos animais não obesos e obesos. Os valores do número de mastócitos são expressos em média \pm S.E.M. (n=7). C) Quantificação do número de mastócitos nas metástases pulmonares de melanoma, de acordo com a sua localização. LAP=localização alveolar periférica, LANP=localização alveolar não periférica, LSA=localização supra-alveolar. Os valores do número de mastócitos são expressos em média \pm S.E.M. (n=7).

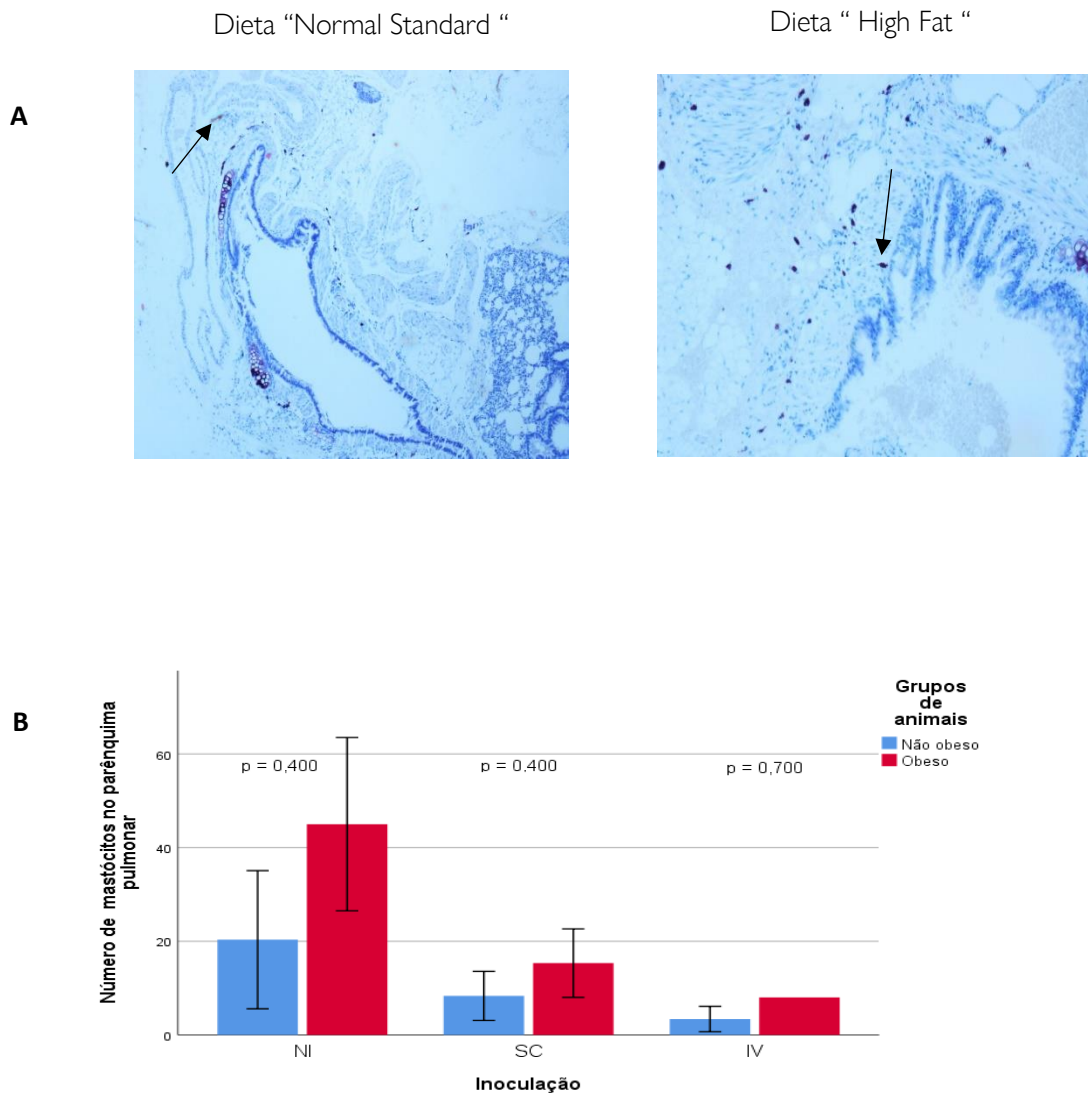


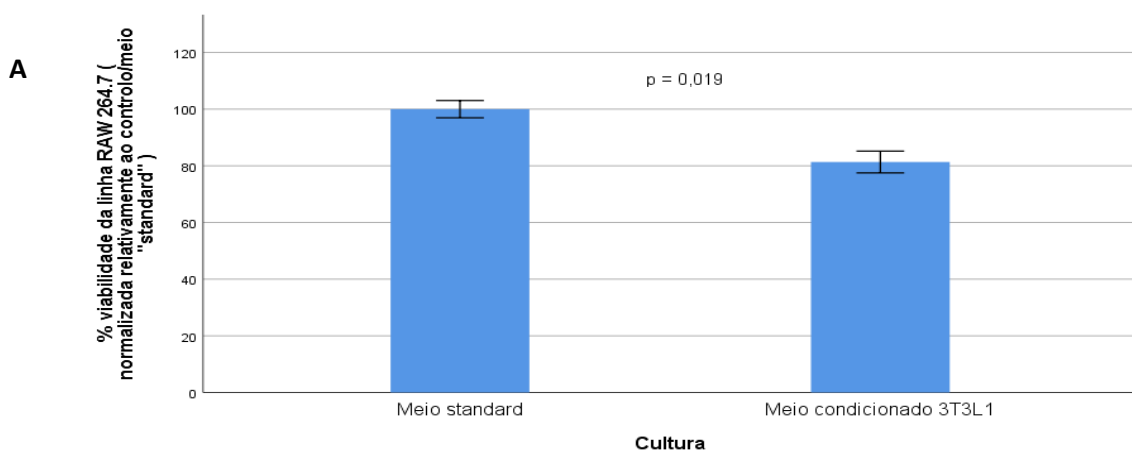
Figura 5. Os animais obesos não inoculados apresentam maior número de mastócitos no seu parênquima pulmonar. A) Imagens representativas da coloração de Giemsa para a quantificação de mastócitos no parênquima pulmonar de animais não inoculados, 100x. Os mastócitos estão assinalados com as setas. B) Quantificação do número de mastócitos no parênquima pulmonar, de acordo com a ausência e presença de melanócitos tumorais inoculados, e de acordo com a ausência e presença de obesidade nos animais. NI= não inoculado, SC=subcutânea, IV=intravenosa. Os valores do número de mastócitos são expressos em média±/ S.E.M. (n=3 para NI e SC, n=7 para IV)

3.3 Os macrófagos reduzem a viabilidade dos melanócitos tumorais, na presença de meio condicionado de 3T3L1.

As limitações técnicas associadas à imunofluorescência para quantificação dos macrófagos alveolares nos animais direcionou o trabalho de investigação para a realização de ensaios com culturas celulares das linhas RAW 264.7 e B16F10, como alternativa metodológica.

O primeiro ensaio teve como objetivo avaliar a viabilidade das RAW 264.7 e das B16F10 na presença de meio condicionado de 3T3L1 (simulador da obesidade) e de meio “standard” (simulador da ausência de obesidade).

Verificou-se uma redução da viabilidade das RAW 264.7 em cerca de 18% (figura 6 A) e das B16F10 em cerca de 26% (figura 6 B), na presença de meio condicionado de 3T3L1, registando-se, relativamente ao meio “standard”, uma diferença estatisticamente significativa.



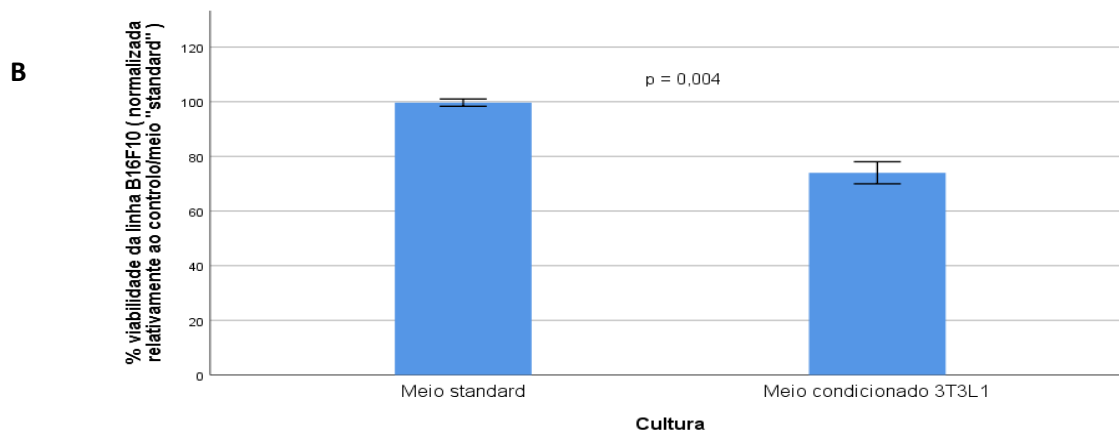


Figura 6. O meio condicionado de 3T3L1 reduz a viabilidade das RAW 264.7 (A) e das B16F10 (B). Os valores da viabilidade são expressos em percentagem média +/- S.E.M. normalizados em relação ao meio "standard". (n=3).

A viabilidade das B16F10, quando co-cultivadas com as RAW 264.7 não ativadas previamente, está reduzida em cerca de 7% na presença de meio condicionado de 3T3L1, enquanto que sofre um aumento de cerca de 18% na presença de meio "standard", não sendo estas diferenças estatisticamente significativas (figura 7).

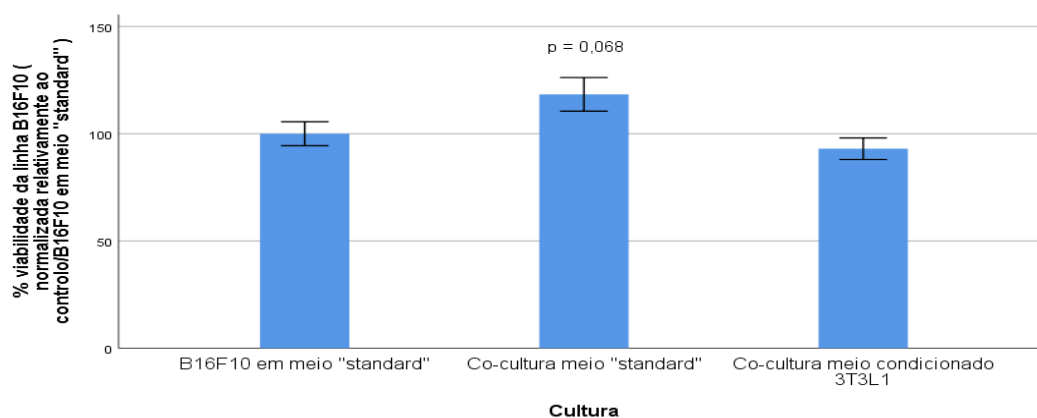
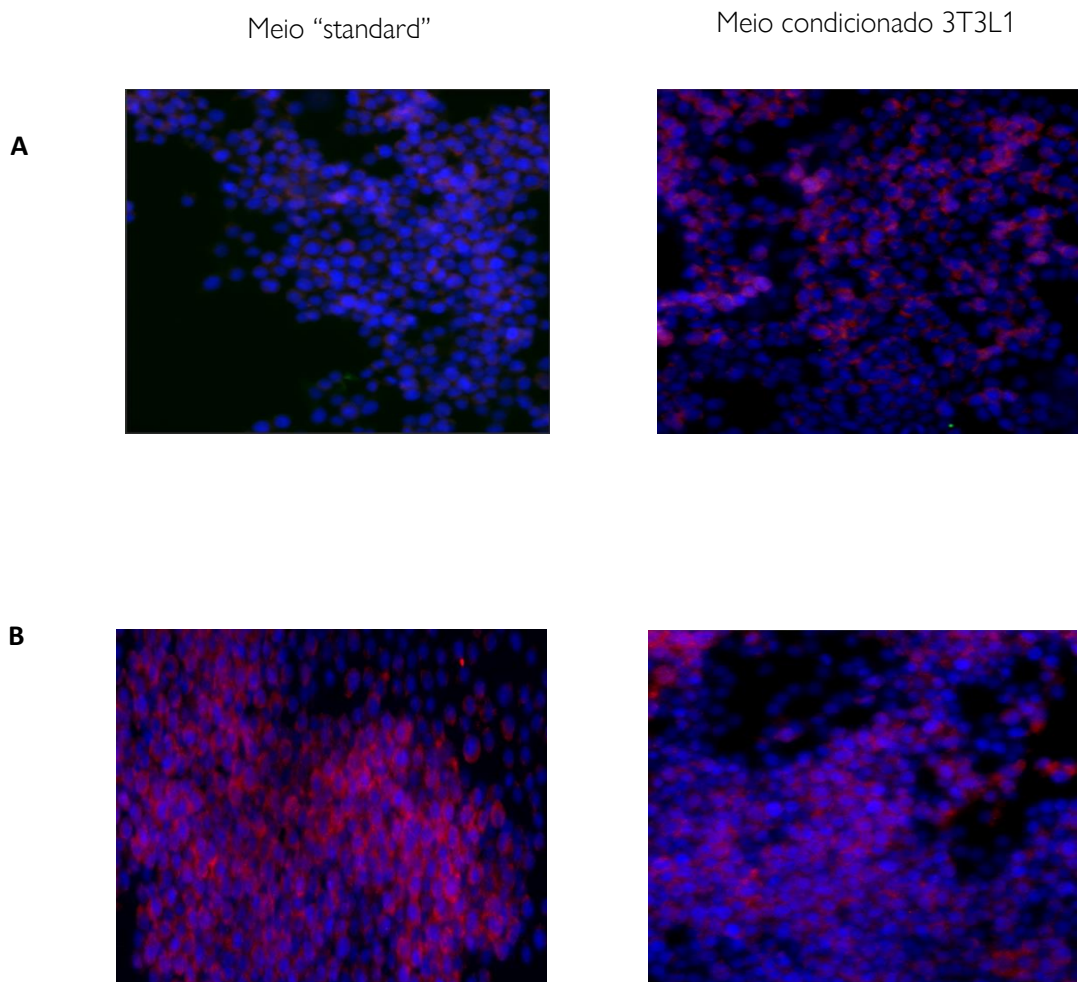


Figura 7. Na presença de RAW 264.7 não ativadas, em meio condicionado de 3T3L1, a viabilidade das B16F10 está reduzida. Os valores de viabilidade são expressos em percentagem média +/- S.E.M. (n=3).

3.4 As B16F10 induzem o fenótipo M2 nas RAW 264.7, na presença do meio condicionado de 3T3L1.

O passo seguinte foi quantificar a modulação fenotípica das RAW 264.7 pelas B16F10, na presença de meio condicionado de 3T3L1 através da imunocitoquímica de fluorescência (figura 8 A e B).

Os resultados sugerem que as B16F10 apresentam a capacidade de modular o fenótipo das RAW 264.7, em meio condicionado de 3T3L1, estimulando o fenótipo M2 ou pró-tumoral, havendo diferenças estatisticamente significativas relativamente ao meio "standard" (figura 8 C e D).



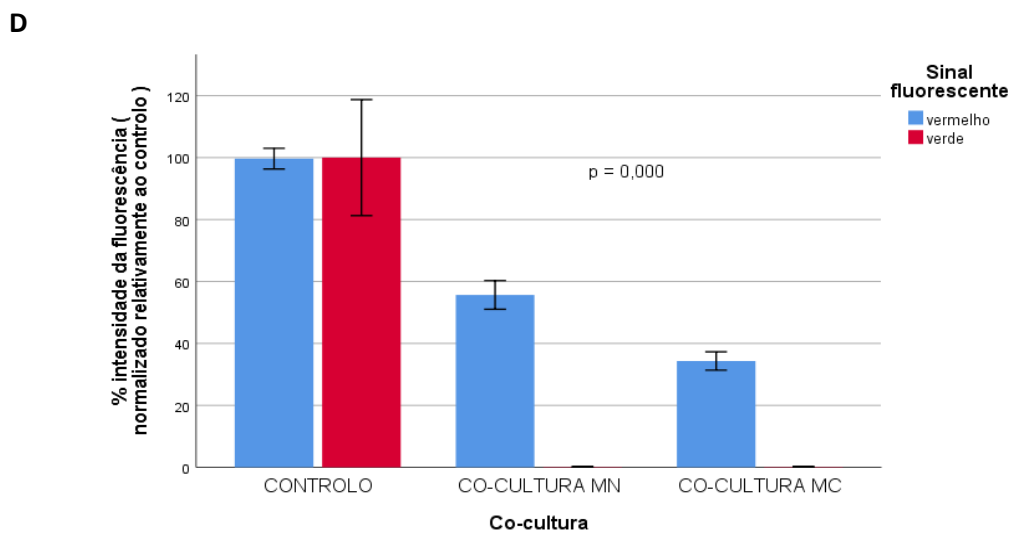
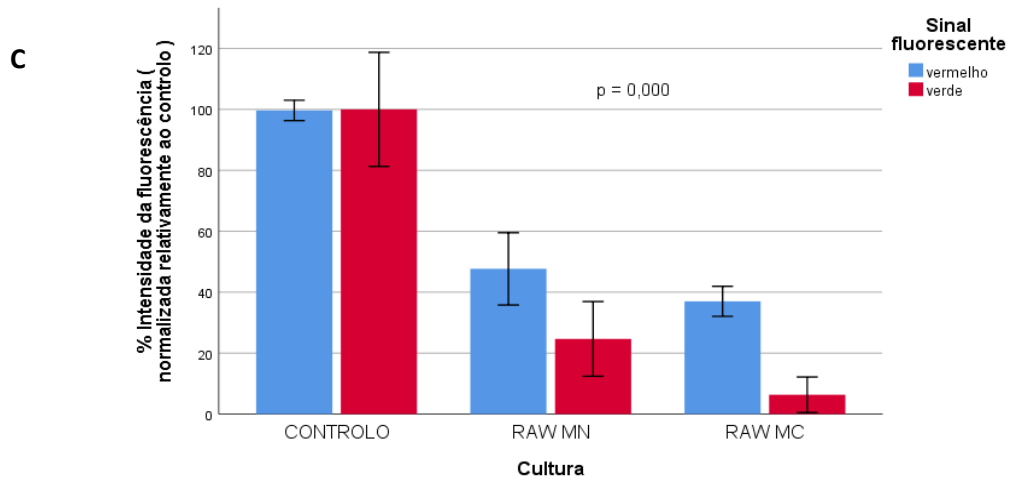


Figura 8. As B16F10 promovem o fenótipo M2 nas RAW 264.7 na presença do meio condicionado de 3T3L1. A) Imagens representativas da imunocitoquímica de fluorescência na monocultura das RAW 264.7, 400x. B) Imagens representativas da imunocitoquímica de fluorescência na co-cultura com B16F10, 400x. C) Quantificação da intensidade do sinal fluorescente na monocultura das RAW 264.7. Os valores da intensidade da fluorescência são expressos em percentagem média +/- S.E.M. (n=3). D) Quantificação da intensidade do sinal fluorescente na co-cultura das RAW 264.7 com as B16F10. Os valores da intensidade da fluorescência são expressos em percentagem média +/- S.E.M. (n=3).

3.5 As B16F10 não revertem a polarização macrofágica induzida pelo LPS de *E.coli*, na presença do meio condicionado de 3T3L1.

Por último, o objetivo do ensaio de culturas celulares seguinte foi verificar se as B16F10 têm a capacidade de provocar a reversão da polarização macrofágica previamente definida pelo meio condicionado de 3T3L1 e pelo ativador específico LPS de *E.coli*. Resumidamente, os macrófagos RAW 264.7, cultivados em meio "standard" e em meio condicionado de 3T3L1, foram ativados pelo LPS de *E.coli* (promotor do fenótipo M1) e após 24h, co-cultivados com as B16F10.

Os resultados sugerem que o fenótipo macrofágico induzido pelo LPS não consegue ser revertido pelas B16F10, na presença de meio condicionado de 3T3L1 (figura 9).

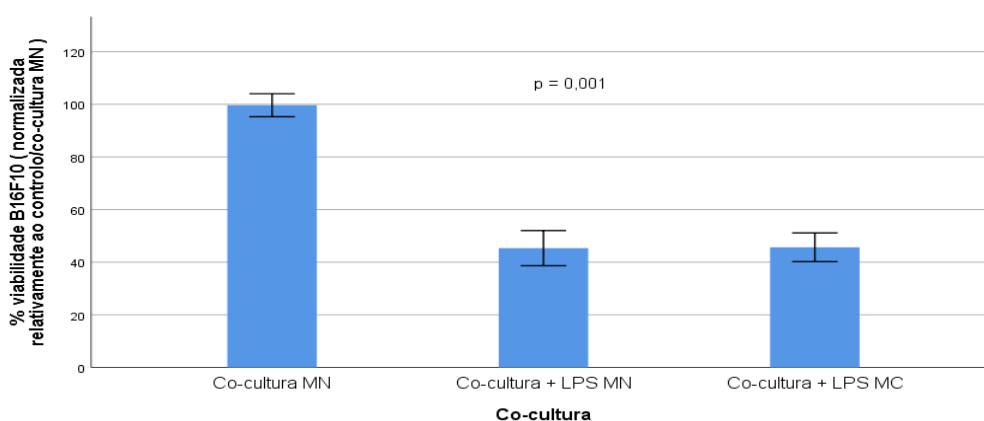


Figura 9. As B16F10 não revertem o fenótipo macrofágico estimulado pelo LPS, na presença de meio condicionado de 3T3L1. Os valores da viabilidade das B16F10 são expressos em percentagem média +/- S.E.M. (n=3).

4. Discussão:

Investigações recentes do nosso grupo de trabalho sobre a influência da obesidade na metastização do melanoma revelaram que ratinhos obesos, de uma forma geral, apresentam metástases pulmonares mais pequenas e que estão presentes num menor número de animais, comparativamente com os não obesos (dados ainda não publicados). Coloca-se a hipótese da obesidade poder diminuir o grau de metastização pulmonar do melanoma, tendo sido esta a questão de investigação definida para o estudo realizado. Sabendo que a obesidade induz um estado de inflamação crónica gradual em vários órgãos (12) e que o ambiente pró-inflamatório local pode influenciar a resposta do sistema imunológico à invasão tumoral (2), achou-se muito pertinente investigar a influência de elementos inflamatórios e imunitários sobre o crescimento das metástases de melanoma no pulmão, em condições de ausência e presença de obesidade.

4.1 A obesidade parece promover um estado de latência metabólica nos melanócitos tumorais, mediada pela inflamação pulmonar instalada previamente à metastização.

Nas metástases de melanoma de animais obesos, a ausência de apoptose e a ocorrência de proliferação nos melanócitos, paralelamente à latência, em menor extensão que nos animais não obesos, sugere que o sistema imunitário pulmonar local exerce um efeito preferencialmente anti-tumoral nestes animais, impedindo, conseqüentemente, o rápido crescimento dos melanócitos tumorais. De notar que é na zona supraalveolar do pulmão que se registou uma maior taxa de proliferação dos melanócitos, o que pode dever-se à presença de uma maior quantidade de tecido adiposo característica dessa região. (8) O aumento da proliferação observada nos melanócitos adjacentes ao tecido adiposo sugere que o metabolismo destas células tumorais pode ser dependente da beta-oxidação dos lípidos acumulados nos adipócitos hipertróficos, o que corrobora os resultados apresentados por Lazar et al (8) (27).

A contribuir, igualmente, para a menor taxa de proliferação está, possivelmente, a inflamação local, de maior extensão, presente no parênquima pulmonar dos animais obesos, previamente à inoculação tumoral, como se observou através da quantificação dos focos inflamatórios

pulmonares, o que corrobora a relação entre a obesidade e a inflamação crônica já referida por Clement et al. (9) (12). Analisando a distribuição dos focos inflamatórios de acordo com a ausência e presença de melanócitos tumorais inoculados, as variações observadas, na condição de obesidade, sugerem que o melanoma exerce um efeito endócrino de preparação do nicho metastático, tal como observou Clement et al (9), induzindo uma redução da inflamação local para poder colonizar o pulmão (24). Esta observação é verificada, comparando a variação entre animais não inoculados e inoculados por via intravenosa. De notar que esta variação também é registada para os animais não obesos, com a diferença de que, havendo menor quantidade de componentes pró-inflamatórios, as células tumorais conseguem progredir mais rápida e extensamente.

Estando os melanócitos em proliferação e não em apoptose significa que o sistema imunológico pulmonar está a permitir essa proliferação, não estando a exercer o seu papel antitumoral eficazmente. No entanto, não há um tamanho amostral estatisticamente significativo no grupo de animais obesos para poder inferir-se se a obesidade influencia a extensão da proliferação metastática pulmonar. Relativamente aos ratinhos obesos, visto que não houve um seguimento cronológico da circulação das B16F10, não se sabe que tipo de ambiente pulmonar estas células encontraram quando atingiram o órgão, se este tinha o seu sistema imunológico semissaturado pela existência de uma condição inflamatória prévia à inoculação, o que terá permitido o crescimento do melanoma e não a sua morte – o tamanho observado das metástases pode corresponder ao seu estado de crescimento máximo; dependendo do grau da inflamação prévia, como referido, o pulmão pôde apresentar o seu sistema imunológico residente mais ativo do que o referido atrás, não deixando as B16F10 instalarem-se com facilidade, mas, à medida que a inflamação foi aumentando, tal como a saturação das células imunitárias, as metástases puderam crescer mais livremente e o estado de crescimento observado no momento do sacrifício corresponde ao estado inicial, daí o tamanho das metástases ser pequeno. Estudar o comportamento sanguíneo das B16F10 é muito importante, igualmente, pois a diferença observada na metastização pulmonar nos ratinhos obesos pode ser devida à influência celular pelas citocinas libertadas pelo tecido adiposo, nomeadamente as adipocinas (8), que podem modular a capacidade de adesão dos melanócitos, bem como a de

migração, de opsonização, de proteção imunológica, de combate aos radicais livres (28) de produção da melanina protetora, etc.

Tendo em consideração todas as hipóteses avaliadas para explicar a ocorrência de proliferação em menor extensão nos animais obesos, há que focar no fato de que os restantes melanócitos apenas apresentarem um estado de crescimento que é o da latência ou quiescência, em maior extensão que a proliferação, e nenhum estar em apoptose. Poder-se-ia sugerir que, estando o sistema imunitário aparentemente mais ativo nos animais obesos, este pudesse induzir um fenômeno apoptótico nos melanócitos não proliferativos, em maior grau relativamente aos animais não obesos, mas não foi o constatado pelos resultados obtidos. Contrariamente ao esperado, sugere-se que há quiescência nos melanócitos não proliferativos, em maior grau nas metástases dos animais obesos. Sendo a quiescência um estado de supressão tumoral (29), parece que os melanócitos metastáticos protegem-se da inflamação pulmonar parenquimal envolvente, evitando a sua morte, sobretudo em contexto de obesidade, e/ou que este estado metabólico induz esta ausência de proliferação. Poder-se-á sugerir que este estado de quiescência pode ser um estado inicial de adaptação dos melanócitos tumorais ao ambiente pulmonar adverso, sobretudo nos animais obesos, mantendo a sobrevivência, e um nível basal de proliferação para garantir a colonização, o que corrobora com a comprovada capacidade de resistência do melanoma, segundo Clement et al.(8). Será interessante conhecer os mecanismos moleculares que medeiam a interação entre o ambiente pulmonar pro-inflamatório e os genes supressores do crescimento dos melanócitos, na presença das alterações fisiológicas características da obesidade, bem como investigar a presença e a evolução de um possível estado epitélíomesenquimal num estudo cronologicamente controlado, em condições idênticas às obtidas nos animais obesos em termos de inflamação pulmonar.

4.2 A obesidade parece induzir uma maior concentração de mastócitos no parênquima pulmonar e uma redução do recrutamento destas células imunitárias para o microambiente das metástases.

Observou-se que os mastócitos são um tipo de população imunológica com um papel importante na progressão do melanoma metastático pulmonar, tal como constatou Varrichi et al. (26), embora o seu papel permaneça ainda controverso na tumorigênese. Efetivamente, os animais não obesos são os que apresentam metástases com maior concentração de mastócitos, sobretudo as que se localizam na zona alveolar periférica. Curiosamente, foi na zona supraalveolar pulmonar que se observou maior taxa de proliferação dos melanócitos tumorais; esta condição pode dever-se ao fato de as metástases com localização alveolar periférica estarem mais limitadas na sua proliferação e necessitarem de recrutar mais mastócitos para progredirem, visto estarem mais afastadas do tecido adiposo supraalveolar – uma fonte de energia muito importante – e sofrerem maior pressão oxidativa naquela região pulmonar – maior permeabilidade dos capilares alveolares ao oxigênio e aos radicais livres. Assim, os resultados sugerem que as metástases recrutam mastócitos para co-adjuvarem o seu crescimento (26).

Analisando a distribuição dos mastócitos no parênquima pulmonar, esta inverte-se relativamente à das metástases, pois os animais obesos são os que apresentam maior quantidade destas células imunitárias (25). Esta observação parece corroborar a relacionada com a distribuição dos focos inflamatórios (12), contribuindo estes mastócitos para reduzirem a colonização do pulmão pelo melanoma, através de uma resposta anti-tumoral eficaz (26). A mesma variação da distribuição dos mastócitos de acordo com a ausência e presença de inoculação tumoral, comparativamente com a distribuição dos focos inflamatórios, sugere que estas células imunitárias são alvo de modulação à distância pelo melanoma, de modo a que o nicho metastático seja eficientemente implantado no pulmão (14) (30). Uma teoria da modulação do fenótipo mastocitário, à semelhança do que se preconiza para os macrófagos, parece ser pertinente, e corrobora com o papel controverso que os mastócitos assumem relativamente ao melanoma (26), de acordo com esta diferença na distribuição dos mastócitos a nível das metástases e do parênquima pulmonar nos obesos. Considerando possível esta modulação, uma possível explicação para o menor crescimento das metástases nos animais obesos pode relacionar-se com dificuldades que os melanócitos tumorais encontrem para estimular um fenótipo pró-tumoral nos mastócitos, devido ao ambiente pro-inflamatório local, estando estas células imunitárias mais suscetíveis a um fenótipo anti-tumoral.

Uma observação interessante feita, aquando do estudo da apoptose nas metástases, foi a probabilidade de existirem mastócitos marcados pela técnica TUNEL, emitindo autofluorescência dos grânulos e não de eventuais fragmentos nucleares em apoptose. Seria necessário proceder à confirmação da sua identidade e distinguir um eventual fenómeno de indução da desgranulação mastocitária através da apoptose. Paivandy et al constatou que esse fenómeno ocorre em contexto de inflamação pulmonar na asma (31). Seria pertinente verificar se os melanócitos induzem esse fenómeno para recrutarem, eficazmente, mastócitos no seu ambiente peritumoral, para uma ação pró-tumoral.

4.3 Em cultura, os macrófagos e os melanócitos tumorais parecem tornar-se menos viáveis na presença de meio condicionado de 3T3L1, bem como a polarização macrofágica estimulada é a M2 predominantemente.

A obesidade parece induzir uma deterioração imunológica (2) e isto é o que parece acontecer com os macrófagos alveolares representados pela linha RAW 264.7 (2). Assim, esperar-se-ia, conseqüentemente, que as metástases, nos obesos, crescessem mais rapidamente por diminuição da imunovigilância. Simultaneamente, observou-se, pela imunocitoquímica de fluorescência, que os macrófagos tornam-se mais pró-tumorais na presença do meio adipocitário, pela aquisição de um fenótipo maioritariamente M2, o que mais contribui para a maior progressão tumoral (23). No entanto, observou-se o contrário, o que pode dever-se à maior inviabilização dos melanócitos tumorais pelo meio condicionado adipocitário, reduzindo a capacidade de colonização do pulmão. A co-cultura dos dois tipos celulares segue a mesma tendência de variação da viabilidade para a monocultura das B16F10, havendo uma menor redução da viabilidade das B16F10 na co-cultura, muito provavelmente devido ao fato de existirem RAW 264.7 a co-adjuvarem o crescimento dos melanócitos tumorais (18)(32). Há que não esquecer que uma cultura celular não mimetiza a interação melanoma-macrófagos alveolares na sua integridade, faltando elementos fundamentais para compreender melhor esta interação.

No entanto, usar este modelo biológico permite verificar a reprodutibilidade dos ensaios e tornar a avaliação estatística mais rigorosa para uma melhor análise dos resultados.

4.4 A ativação específica com LPS, indutora de um fenótipo anti-tumoral, parece sobrepor-se ao efeito modulador da obesidade, minimizando a potencialidade dos melanócitos tumorais de reverterem o fenótipo macrofágico para um pró-tumoral.

Os melanócitos tumorais, por estarem presentes em menor quantidade em condições de obesidade e por poderem ter a sua capacidade modulatória limitada pelos factores adipocitários, não conseguem reverter, com facilidade, a polarização macrofágica M1, estimulada pelo LPS de *E.coli* (33), não conseguindo progredir, rápida e eficazmente, no parênquima pulmonar, justificando, assim, o menor desenvolvimento das metástases (21) na presença de obesidade. Desta forma, o resultado obtido sugere que uma modulação *in vitro* de macrófagos, com ativadores mais “personalizados” para as B16F10, de modo a definir um fenótipo anti-B16F10 mais específico, poderá ser ainda mais eficaz para desenhar uma estratégia anti-tumoral em condições de obesidade instalada.

5. Conclusões e perspectivas futuras:

A análise integrada dos resultados sugere que o menor crescimento das metástases pulmonares de melanoma, em condições de obesidade, é devido a uma redistribuição das populações imunológicas, nomeadamente dos mastócitos e dos macrófagos alveolares, essencialmente, e não a fenómenos de repolarização macrofágica, e ao efeito do estado inflamatório local latente.

Tendo em conta todas as limitações inerentes à investigação feita e devidamente referidas, os ensaios realizados elucidaram para possíveis tendências de interação que existe entre o sistema imunitário e o melanoma metastático pulmonar, em contexto metabólico de obesidade: a) a inflamação pulmonar, mediada pela obesidade, adquirida previamente à metastização, pode dificultar a colonização do melanoma, pois a defesa inata constituída pelos mastócitos parece estar mais ativa nos animais obesos; b) o ambiente adipocitário, característico da obesidade, pode diminuir a viabilidade das células de melanoma que invadem o parênquima pulmonar; c) a obesidade não tem um papel preponderante na modulação do fenótipo macrofágico; e d) os melanócitos tumorais podem modular os mastócitos para estes exercerem um efeito pró-tumoral.

Aprofundar o estudo destes dois elementos – obesidade e melanoma – e a sua interação, num período de tempo devidamente definido e controlado, na vertente imunológica, em relação aos tipos celulares já estudados neste trabalho e a outros, permitirá compreender melhor a forma como ocorre a tumorização primária e metastática do melanoma maligno e delinear novas formas de abordagem preventiva e terapêutica, complementares às já existentes em indivíduos com obesidade crónica.

Como perspetivas futuras de estudo, considera-se pertinente estudar os mecanismos moleculares subjacentes à inflamação pulmonar, em contexto de obesidade, que afetam o recrutamento dos mastócitos pelas metástases de melanoma, bem como investigar os mecanismos que medeiam a reversão da polarização dos macrófagos alveolares, estando estes sujeitos a um ambiente pro-inflamatório predominante, igualmente em contexto de obesidade. Uma outra perspetiva é aprofundar o papel dos mastócitos em todo o processo de iniciação,

progressão e metastização do melanoma, em contexto de obesidade, nomeadamente verificar se existem fenótipos mastocitários e moduláveis pelos melanócitos tumorais, tal como acontece com os macrófagos. Estando descrita uma ação reguladora dos macrófagos pelos mastócitos (24), pode ser interessante investigar esta interação no pulmão colonizado pelo melanoma e conhecer a influência da obesidade sobre esta interação. Com o objetivo de compreender melhor a redução da metastização pulmonar do melanoma em animais obesos, considera-se, igualmente válido, testar as seguintes hipóteses: a) as B16F10 inoculadas por via IV aumentam a sua migração, preferencialmente e em primeiro lugar, para os nódulos linfáticos (34) na presença de obesidade, e destes para os órgãos para os quais têm mais tropismo, como o pulmão (35). Assim, o grau de metastização é menor no pulmão do ratinho obeso. Num estudo posterior, recolher-se-á os nódulos linfáticos dos C57Bl6/J inoculados por via IV, não obesos e obesos, bem como dos não inoculados, fazendo-se um estudo cronológico simultaneamente, de modo a avaliar quanto tempo demora a colonização pulmonar a ocorrer; b) como o modelo de metastização usado não é o de uma verdadeira metastização, não há a necessária estimulação da preparação do nicho pré-metastático pelo tumor primário, através de uma comunicação endócrina, promovida por vesículas extracelulares, entre o tumor primário e o pulmão, neste caso (30). Assim, a possível estimulação à distância que terá ocorrido foi promovida pelas adipocinas circulantes no soro dos ratinhos obesos, apenas. Tendo em conta isto, e visto que a concentração de substâncias pró-inflamatórias é maior no soro dos ratinhos obesos, e obedecendo à lei da difusão segundo o gradiente de concentração, as B16F10 ficam “retidas” no soro dos ratinhos obesos, reduzindo a quantidade de células que chegam ao pulmão; c) tendo sido observado, num caso de ratinho obeso, células B16F10 na pele, pode pensar-se que a migração e invasão do melanoma nos órgãos alvo seja influenciada por um gradiente de concentração de agentes pró-inflamatórios, havendo tropismo natural para locais onde haja maior predominância de inflamação; como o tecido adiposo de obesos está incrementado em agentes inflamatórios, estes atraem mais facilmente do que o pulmão - se estiver menos inflamado que o TA subcutâneo - as B16F10. Realça-se, ainda, a importância de se fazer um seguimento cronológico, desde o momento da inoculação intravenosa das B16F10, dos parâmetros inflamatórios e imunológicos pulmonares, bem como a sua distribuição na corrente sanguínea, nos dois grupos de ratinhos, havendo uma oportunidade de repetir o procedimento laboratorial integralmente.

6. Referências bibliográficas:

- (1) APALLA, Z. et al – Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 7 (Supl 1), (2017), 5–19
- (2) KARIMI, K. et al – Obesity as a risk factor for malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Rev Endocr Metab Disord*, 17 (Supl 3), (2016), 389-403
- (3)
- (4) PITCOVSKI, J. et al - Melanoma antigens and related immunological markers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 115, (2017), 36-49
- (5) JIANG, AJ., RAMBHATLA, PV., EIDE MJ. - Socioeconomic and lifestyle factors and melanoma: a systematic review. *Br J Dermatol.*, 172(4), (2015), 885-891
- (6) HOSSEINI, M., KASRAIAN, Z., REZVANI, H. - Energy metabolism in skin cancers: A therapeutic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858, (2017) 712–722
- (7) COELHO, P. et al - Effect of Adipocyte Secretome in Melanoma Progression and Vasculogenic Mimicry. *J Cell Biochem*, 117(7), (2016),1697-1706
- (8) KUSHIRO, K. et al - Adipocytes Promote B16BL6 Melanoma Cell Invasion and the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Microenvironment*, 5, (2012), 73–82
- (9) CLEMENT, E et al – Obesity and melanoma: Could fat be fueling malignancy?. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 30(3), (2017), 294-306
- (10) NIEMAN, KM. et al - Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metástasis. *Biochim Biophys Acta*, 1831(10), (2013), 1533-1541
- (10)MALVI, P. et al – “Obesity induced rapid melanoma progression is reversed by orlistat treatment and dietary intervention: role of adipokines”. *Mol Oncol*, 9, (2015), 689-703
- (11) KUSHIRO,K., NUNEZ, N.P. – “Ob/ob serum promotes a mesenchymal cell phenotype in B16BL6 melanoma cells”. *Clin Exp Metastasis*, 28,(2011), 877-86.
- (12) GUZIK, T. et al - The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovascular Research*, 113, (2017),1009–1023

- (13) NTIKOUDI, E. et al - Hormones of adipose tissue and their biologic role in lung cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 40(1), (2014), 22-30
- (14) AA, K. et al - Modulation of tissue tropism and biological activity of exosomes and other extracellular vesicles: new nanotools for cancer treatment. *Pharmacological Research*, 111, (2016), 487-500
- (15) BIGI, L. et al - Electrochemotherapy induces apoptotic death in melanoma metastases: a histologic and immunohistochemical investigation. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 9, (2016), 451–459
- (16) LANDSBERG, J. et al - The Role of Neutrophilic Inflammation, Angiotropism, and Pericytic Mimicry in Melanoma Progression and Metastasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 136, (2016), 372-377
- (17) RAJABI, P., BAGHERI, A., HANI, M. - Intratumoral and Peritumoral Mast Cells in Malignant Melanoma: An Immunohistochemical Study. *Adv Biomed Res*, 6, (2017), 39.
- (18) ALMATROODI, S., MCDONALD, C., POUNIOTIS, D. – Alveolar Macrophage Polarisation in Lung Cancer. *Lung Cancer International*, vol 2014, (2014), 1-9
- (19) LEY, K. et al - How Mouse Macrophages Sense what is Going On. *Front. Immunol.*, 7, (2016), 204.
- (20) MA, B. et al – “RIG-like Helicase Regulation of Chitinase 3-like 1 Axis and Pulmonary Metastasis”. *Sci Rep*, 6, (2016), 26299.
- (21) YUAN, R. et al - Reversing the polarization of tumor-associated macrophages inhibits tumor metastasis. *International Immunopharmacology*, 49, (2017), 30–37
- (22) WANG, H. et al - Pro-tumor activities of macrophages in the progression of melanoma. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13 (7), (2017), 1556-1562
- (23) ARAS, S., ZAIDI, M. - TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *British Journal of Cancer*, 117(11), (2017), 1583-1591
- (24) MIGNOGNA, C. et al - Innate immunity in cutaneous melanoma. *Clinical and Experimental Dermatology*, 42 (3), (2017), 243-250

- (25) ŹELECHOWSKA, P. et al - Mast cells participate in chronic low-grade inflammation within adipose tissue. *Obes Rev*, 19(5), (2018), 686-697
- (26) VARRICCHI, G. et al – Controversial role of mast cells in skin cancers. *Experimental Dermatology*, 26(1), (2016), 11-17
- (27) LAZAR, I. et al - Adipocyte Exosomes Promote Melanoma Aggressiveness through Fatty Acid Oxidation: A Novel Mechanism Linking Obesity and Cancer. *Cancer Research*, 76(14), (2016), 4051-4057
- (28) PISKOUNOVA, E. et al - Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* , 527(7577), (2015), 186–191.
- (29) TORRANO, B., CARRACEDO, A. – Quiescence-like metabolism to push cancer out of the race. *Cell Metabolism*, 25(5), (2017), 997-999
- (30) ROBADO DE LOPE, L. et al – Tumor-adipose tissue crosstalk: fuelling tumor metastasis by extracellular vesicles. *Phil Trans R Soc B*, 373, (2017), 20160485.
- (31) PAIVANDY, A. et al - Induction of Human Lung Mast Cell Apoptosis by Granule Permeabilization: A Novel Approach for Targeting Mast Cells. *Front. Immunol.*, 8 (2017), 1645.
- (32) BARDI, G., SMITH, M., HOOD, J. – Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization. *Cytokine*, 105, (2018), 63-72
- (33) SEO, J. et al – Ginseng marc-derived low-molecular weight oligosaccharide inhibits the growth of skin melanoma cells via activation of RAW 264.7 cells. *International Immunopharmacology*. 29(2), (2015), 344-353
- (34) JUNG, JI et al - β -Caryophyllene potently inhibits solid tumor growth and lymph node metastasis of B16F10 melanoma cells in high-fat diet-induced obese C57BL/6N mice. *Carcinogenesis*, 36(9), (2015), 1028-1039
- (35) JUNG, J. et al - High-fat diet-induced obesity increases lymphangiogenesis and lymph node metastasis in the B16F10 melanoma allograft model: Roles of adipocytes and M2-macrophages. *International Journal of Cancer*, 136, (2015), 258-270

