

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Gabriela Coelho Floriano

Papel das vesículas extracelulares derivadas da linhagem de câncer de mama triplo-negativo 4T1 na modulação fenotípica e funcional de macrófagos

Juiz de Fora

2026

Gabriela Coelho Floriano

Papel das vesículas extracelulares derivadas da linhagem de câncer de mama triplo-negativo 4T1 na modulação fenotípica e funcional de macrófagos

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Profa. Dra. Jacy Gameiro

Coorientador (a): Antônio Clemente de Oliveira Neto

Juiz de Fora

2026

Floriano, Gabriela .

Papel das vesículas extracelulares derivadas da linhagem de câncer de mama triplo-negativo 4T1 na modulação fenotípica e funcional de macrófagos / Gabriela Floriano. -- 2026.

46 f.

Orientador: Jacy Gameiro

Coorientador: Antônio Clemente

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas, 2026.

1. Câncer de mama. 2. Vesículas Extracelulares . 3. Sistema Imunológico . 4. Microambiente tumoral . 5. Comunicação Intercelular . I. Gameiro, Jacy, orient. II. Clemente , Antônio , coorient. III. Título.

Gabriela Coelho Floriano

Papel das vesículas extracelulares derivadas da linhagem de câncer de mama triplo-negativo 4T1 na modulação fenotípica e funcional de macrófagos

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Aprovada em 17 de julho de 2026

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente
JACY GAMEIRO
Data: 22/07/2026 13:33:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Doutora. Jacy Gameiro - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado digitalmente
ANTONIO CLEMENTE DE OLIVEIRA NETO
Data: 22/07/2026 11:40:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Antônio C. de O. Neto - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado digitalmente
MAYARA KAREN CARVALHO FERNANDES
Data: 22/07/2026 13:07:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mayara Karen Carvalho Fernandes
Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado digitalmente
LUAN CRISTIAN DA SILVA
Data: 22/07/2026 12:33:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Doutor Luan Cristian da Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meus pais, que, com amor, dedicação e sacrifícios, transformaram meus sonhos em possibilidades. A eles que nunca economizaram em demonstrar seu amor, dedico essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, verdadeira fonte da luz e princípio supremo da sabedoria, por conceder-me a graça de aprender. A Ele, que, pela intercessão da Virgem Maria, sustentou meus passos no começar e no perseverar, concedendo-me saúde, fortaleza e incontáveis graças ao longo de toda esta caminhada.

Aos meus pais, José Ricardo e Maria Adriana, por terem acreditado nos meus sonhos com a mesma intensidade com que eu aprendi a sonhá-los, tornando possível cada passo que me trouxe até aqui. Aos meus irmãos, Mariana e Miguel, por serem parte inseparável de quem sou, da minha história e de tudo o que levo comigo.

Ao meu namorado, Julio Cesar, por acolher, com paciência, carinho e muito bom humor, tanto os dias leves quanto os difíceis. Obrigada por sustentar meus sonhos, acalmar meus pensamentos e por dar ainda mais sentido à caminhada ao compartilhá-la comigo.

Às minhas amigas Luiza, Silvia e Thais, por crescerem ao meu lado e permanecerem presentes em mais um capítulo da minha vida. Obrigada por mostrarem que a amizade não conhece a distância nem o tempo. De maneira especial, agradeço à Clarinha que, com sua chegada, nos deu ainda mais motivos para sorrir.

Às minhas amigas Ana Alice, Ana Carolina, Giovana, Leticia e Maria Clara, por serem a minha parte favorita da Biologia e por transformarem Juiz de Fora e a UFJF em um verdadeiro lar. Com vocês vivi os melhores aprendizados da graduação e construí memórias que levarei comigo por toda a vida.

Aos meus amigos de laboratório Alex, Antônio, Letícia, Luiza, Maju Borges, Maju Torres, Mara, Otto, Sara e Thais, por compartilharem comigo muito mais do que a rotina da pesquisa. Obrigada pelas conversas, pelas risadas que ecoam entre e durante os experimentos, e por transformarem o laboratório em uma segunda casa.

À minha orientadora, Jacy Gameiro, que tive a felicidade de encontrar na ciência e o privilégio de levar para a vida. Sou profundamente grata por cada ensinamento que moldou minha formação científica e, sobretudo, pela forma como, sem perceber, também me ensinou sobre coragem, dedicação e humanidade.

“Quanto mais o homem conhece a realidade e o mundo, tanto mais se conhece a si mesmo na sua unicidade, ao mesmo tempo que nele se torna cada vez mais premente a questão do sentido das coisas e da sua própria existência. O que chega a ser objeto do nosso conhecimento, torna-se por isso mesmo parte da nossa vida.”

João Paulo II, Carta Encíclica Fides et Ratio

RESUMO

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) representa um dos subtipos mais agressivos do câncer de mama, caracterizado por alta taxa proliferativa, maior potencial invasivo e elevada propensão à disseminação metastática. Nesse contexto, a comunicação entre células tumorais e componentes do microambiente tumoral exerce papel fundamental na progressão da doença, destacando-se as vesículas extracelulares (VEs) como importantes mediadoras desse processo. Assim, encontram-se os macrófagos, células altamente plásticas cuja atividade funcional influencia diretamente a dinâmica tumoral. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das VEs derivadas da linhagem murina de TNBC 4T1 sobre o fenótipo e a viabilidade de macrófagos RAW 264.7. As VEs foram isoladas por centrifugação diferencial e ultracentrifugação e caracterizadas quanto ao tamanho, concentração proteica e morfologia por espalhamento dinâmico de luz (DLS), ensaio de BCA e microscopia eletrônica de transmissão. A viabilidade celular foi avaliada pelos ensaios de MTT e citometria de fluxo. A modulação fenotípica foi investigada por citometria de fluxo utilizando a expressão de iNOS, a produção de IL-6, IL-10 e TNF- α foi determinada por ELISA e a produção de NO pelo método de Griess. As VEs apresentaram características compatíveis com a literatura, evidenciadas pela morfologia esférica e por tamanhos médios de 203,2 nm 151,7 nm para MVs e Exos. Além disso, não exerceram efeito citotóxico significativo sobre os macrófagos nas condições experimentais avaliadas. Quanto à modulação fenotípica, as VEs promoveram alterações dependentes do estado basal de ativação dos macrófagos. Em M0, aumentaram a expressão de iNOS e a secreção de IL-6, com redução de TNF- α . Em M1, reduziram a produção IL-10, sem alterações adicionais na expressão de iNOS. Em M2, promoveram aumento da expressão de iNOS, acompanhado por redução de IL-10. Apesar do aumento da expressão de iNOS em M0 e M2, não foram detectadas alterações significativas na produção de NO. Em conjunto, esses achados indicam que as VEs derivadas da linhagem 4T1 modulam o estado funcional dos macrófagos de maneira dependente do fenótipo basal de ativação dos macrófagos. Esses resultados reforçam o conceito atual de que a ativação macrofágica ocorre ao longo de um espectro contínuo de estados funcionais, no qual fenótipos intermediários podem coexistir e desempenhar funções distintas no microambiente tumoral.

Palavras-chave: microambiente tumoral; comunicação intercelular; plasticidade macrofágica

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) represents one of the most aggressive subtypes of breast cancer, characterized by a high proliferative rate, great invasive potential, and increased propensity for metastatic dissemination. In this context, the communication between tumor cells and components of the tumor microenvironment plays a major role in disease progression, a process in which extracellular vesicles (EVs) stand out as important mediators. In this scenario, macrophages are highly plastic cells whose functional activity directly influences tumor dynamics. Thus, this study aimed to evaluate the effects of EVs derived from the murine TNBC 4T1 cell line on the phenotype and viability of RAW 264.7 macrophages. EVs were isolated by differential centrifugation and ultracentrifugation and characterized by size, protein concentration, and morphology through dynamic light scattering (DLS), BCA assay, and transmission electron microscopy. Cellular viability was assessed by both MTT and flow cytometry techniques. Phenotypic modulation was evaluated through iNOS expression by flow cytometry, while the cytokines IL-6, IL-10 and TNF- α were measured by ELISA, and NO production by the Griess method, respectively. EVs exhibited features compatible with the literature, evidenced by spherical morphology and average sizes of 203.2 nm and 151.7 nm for MVs and Exos. In addition, they did not exert a significant cytotoxic effect on macrophages under the evaluated experimental conditions. Regarding phenotypic modulation, EV-treated M0 macrophages exhibited increased iNOS expression and IL-6 secretion, although TNF- α levels decreased. Concerning the M1 macrophages, EV-treatment reduced IL-10 production, without additional changes in iNOS expression; whereas in M2 macrophages, an increase in iNOS expression associated with reduced IL-10 was observed. Despite the increased iNOS expression in M0 and M2 macrophages, no significant changes in NO production were detected. Overall, these findings indicate that EVs derived from the 4T1 cell line modulate the functional state of macrophages on the dependency of their basal activation phenotype. These results reinforce the current concept that macrophage activation occurs along a continuous spectrum of functional states, in which intermediate phenotypes may coexist performing distinct functions within the tumor microenvironment.

Keywords: tumor microenvironment; intercellular communication; macrophage plasticity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Biogênese das Vesículas Extracelulares

FIGURA 2: Polarização de macrófagos

FIGURA 3: Fluxograma do desenho experimental proposto.

FIGURA 4: Distribuição de tamanho das vesículas extracelulares isoladas da linhagem celular 4T1 por espalhamento dinâmico de luz (DLS).

FIGURA 5: Concentração proteica média das vesículas extracelulares, expressa em albumina ($\mu\text{g/mL}$), determinada por meio do ensaio *BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific).

FIGURA 6. Caracterização morfológica das vesículas extracelulares isoladas da linhagem de câncer de mama 4T1 por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

FIGURA 7. Avaliação da viabilidade metabólica de macrófagos RAW 264.7 após tratamento com diferentes concentrações de microvesículas e exossomos derivados da linhagem 4T1 por 24 e 48 horas. Análise estatística realizada por One-way ANOVA. Diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

FIGURA 8. Avaliação da viabilidade metabólica de macrófagos RAW 264.7 após tratamento com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1 ($20 \mu\text{g/mL}$) nos períodos de 24 e 48 horas, por meio do ensaio de MTT. Análise estatística realizada por One-way ANOVA. Diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

FIGURA 9. Estratégia de *gating* aplicada na análise por citometria de fluxo para seleção da população de macrófagos RAW 264.7 e avaliação da viabilidade celular e da expressão intracelular de iNOS após tratamento com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1

FIGURA 10. Avaliação da viabilidade de macrófagos RAW 264.7 não polarizados (M0) e previamente polarizados para os fenótipos M1 e M2 após tratamento com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1, por citometria de fluxo utilizando o marcador de viabilidade LIVE/DEAD (B510). Análise estatística realizada por teste t de Student paramétrico. Diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

FIGURA 11. Avaliação da modulação da expressão de iNOS em macrófagos RAW 264.7 não polarizados (M0) e previamente polarizados para os fenótipos M1 e M2 após tratamento com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1, por citometria de fluxo. Análise estatística realizada por teste t de Student. Diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

FIGURA 12. Dosagem de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 previamente polarizados e tratados com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1. Análise estatística realizada por One-way ANOVA. Diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

FIGURA 13. Quantificação da citocina IL-6 no sobrenadante de macrófagos previamente polarizados e tratados com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1. Análise estatística realizada por teste t de Student. Diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

FIGURA 14. Quantificação da citocina TNF- α no sobrenadante de macrófagos previamente polarizados e tratados com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1. Análise estatística realizada por teste t de Student. Diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

FIGURA 15. Quantificação da citocina IL-10 no sobrenadante de macrófagos previamente polarizados e tratados com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1. Análise estatística realizada por teste t de Student. Diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DP	Desvio padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
ER	Receptor hormonal de estrogênio
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Exos	Exossomos
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ISEV	Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MISEV	Informações mínimas para estudos de vesículas extracelulares
mRNA	RNA mensageiro
MVs	Microvesículas
NaNO ₂	Nitrito de sódio .
NO	Óxido Nítrico
OD	Densidade Óptica
PR	Receptor hormonal de progesterona
PTA	Ácido fosfotúngstico
SFB	Soro fetal bovino
TAMs	Macrófagos associados ao tumor
TLRs	Receptores do tipo Toll
TME	Microambiente tumoral
TNBC	Câncer de mama triplo-negativo

TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEs	Vesículas extracelulares
LPS	Lipopolissacarídeo
LIP	Laboratório Integrado de Pesquisa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 CÂNCER DE MAMA.....	15
1.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	16
1.3 MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR.....	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. DESENHO EXPERIMENTAL.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 CULTURA CELULAR.....	24
4.2 ISOLAMENTO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SOBRENADANTE CELULAR.....	24
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	24
4.3.1 ZETASIZER.....	24
4.3.2 DOSAGEM PROTEICA.....	25
4.3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	25
4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT.....	25
4.5 POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS RAW 264.7.....	26
4.6 TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	26
4.7 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	26
4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS ANTI E PRÓ INFLAMATÓRIAS.....	27
4.9 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	27
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5. RESULTADOS.....	28
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	28
5.1.1 ZETASIZER.....	28
5.1.2 BCA.....	28
5.1.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	29
5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT.....	29
5.3 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO FENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	31
5.4 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO.....	33
5.5 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA.....	34
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama corresponde a uma neoplasia maligna caracterizada pela proliferação descontrolada de células mamárias, com capacidade de invadir tecidos adjacentes e disseminar-se para órgãos distantes por meio do processo metastático (WHO, 2026). No Brasil, excluindo-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama constitui o tipo de câncer mais incidente na população feminina, sendo também uma das principais causas de morte por neoplasias malignas. Em 2023, foram registrados mais de 20 mil óbitos relacionados à doença no país (INCA, 2025).

Além de sua elevada incidência e impacto na mortalidade, o câncer de mama caracteriza-se por apresentar acentuada heterogeneidade biológica, sendo composta por subtipos moleculares distintos que apresentam diferenças marcantes em comportamento clínico, prognóstico e resposta terapêutica (Perou et al., 2000). Sua classificação molecular e clínica baseia-se, principalmente, na expressão dos receptores hormonais de estrogênio (ER) e progesterona (PR), bem como do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), permitindo a estratificação em subtipos luminal, HER2-positivo e câncer de mama triplo-negativo (TNBC) (Perou et al., 2000; Denkert et al., 2017).

Entre os diferentes subtipos moleculares, o TNBC destaca-se por apresentar comportamento biológico particularmente agressivo (Stevens; Vachon; Couch, 2013). Esse subtipo é definido pela ausência de expressão dos ER e PR, bem como pela ausência de superexpressão de HER2 (Derakhshan; Reis-Filho, 2022). Clinicamente, o TNBC está associado a alta taxa proliferativa, maior potencial invasivo e elevada propensão à disseminação metastática, particularmente para pulmões e cérebro, além de apresentar pior prognóstico quando comparado a outros subtipos de câncer de mama (Heitz et al., 2009). Além da elevada agressividade biológica, a ausência de alvos terapêuticos específicos faz com que esse subtipo apresente opções terapêuticas limitadas e elevada taxa de recaída precoce (Foulkes et al., 2004; Savas; Loi, 2020).

Embora parte dessa agressividade esteja relacionada às características intrínsecas das células tumorais, evidências demonstram que a progressão do câncer também depende da intensa interação entre o tumor e o microambiente tumoral (Hanahan, 2022). A malignidade tumoral está associada à intensa interação das células tumorais com o microambiente tumoral,

dependendo, em grande parte, da capacidade dessas células de remodelar o microambiente imunológico tumoral (TIME), promovendo um estado imunossupressor que favorece proliferação, invasão, metástase e evasão da vigilância imunológica (Labani-Motlagh; Ashja-Mahdavi; Loskog, 2020; Kim; Cho, 2022).

Além de favorecer a progressão tumoral, as alterações induzidas no TIME também comprometem a eficácia das estratégias terapêuticas (Bai et al., 2020). Mecanismos como ativação de vias associadas a *checkpoints* imunológicos, recrutamento de células imunossupressoras e modulação funcional de células infiltrantes favorecem a manutenção de um ambiente permissivo ao crescimento tumoral (Bai et al., 2020; Pan et al., 2020). Nesse cenário, compreender os processos de comunicação entre células tumorais e células do sistema imune tornou-se essencial para elucidar novos mecanismos de escape tumoral e identificar potenciais alvos terapêuticos. Dentre os principais mediadores dessa comunicação destacam-se as vesículas extracelulares, reconhecidas como importantes transportadoras de sinais biológicos no microambiente tumoral (Marar; Starich; Wirtz, 2021).

1.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES

As vesículas extracelulares (VEs) constituem um grupo heterogêneo de nanopartículas delimitadas por bicamada lipídica, secretadas de forma evolutivamente conservada por praticamente todos os tipos celulares, desde organismos procarióticos até eucariontes superiores (Stahl et al., 2018; Boomgarden; Sheehan; D'Souza-Schorey, 2020; Kong et al., 2025). Seu conteúdo molecular inclui uma ampla variedade de biomoléculas, como proteínas, lipídios, glicoproteínas, glicolipídios e ácidos nucleicos, como DNA, mRNA e RNAs não codificantes (Abels; Breakefield, 2016; Mir; Goettsch, 2020), cuja composição reflete tanto a identidade quanto o estado fisiológico da célula de origem (Yáñez-Mó et al., 2015).

Embora inicialmente descritas apenas como subprodutos do metabolismo celular envolvidos na eliminação de componentes intracelulares, as vesículas extracelulares são atualmente reconhecidas como importantes mediadoras da comunicação intercelular (Peinado et al., 2012; Hoshino et al., 2015; Sergazy et al., 2025). Por meio da transferência horizontal de seu conteúdo molecular para células receptoras, essas vesículas são capazes de modular vias de sinalização, alterar perfis de expressão gênica e induzir mudanças fenotípicas e funcionais em diferentes populações celulares, participando tanto de processos fisiológicos quanto patológicos (van Niel; D'Angelo; Raposo, 2018; Boomgarden; Sheehan; D'Souza-Schorey, 2020).

Em razão da heterogeneidade estrutural e funcional das vesículas extracelulares, a International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) publicou as diretrizes *Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles* (MISEV), que recomendam sua classificação com base em características como tamanho, biogênese e composição molecular (Théry et al., 2018; Saint-Pol; Culot, 2025). Entre as principais subpopulações encontram-se as pequenas vesículas extracelulares, tradicionalmente denominadas exossomos, e as grandes vesículas extracelulares, também conhecidas como microvesículas, as quais apresentam mecanismos distintos de biogênese (Raposo; Stoorvogel, 2013; van Niel; D'Angelo; Raposo, 2018).

As pequenas vesículas, geralmente compreendidas na faixa de 50 a 150 nm, originam-se predominantemente da via endossomal, na qual a invaginação da membrana de endossomos tardios leva à formação de vesículas intraluminais e de corpos multivesiculares, que posteriormente se fundem à membrana plasmática para liberar seu conteúdo no meio extracelular (Colombo; Raposo; Théry, 2014; Kowal et al., 2016). Em contraste, as microvesículas apresentam dimensões maiores, variando aproximadamente entre 200 e 1.000 nm, e são formadas por brotamento direto da membrana plasmática, processo que envolve reorganização do citoesqueleto, redistribuição de lipídios de membrana e remodelação da superfície celular (Muralidharan-Chari et al., 2010; Tricarico; Clancy; D'Souza-Schorey, 2017; Sedgwick; D'Souza-Schorey, 2018).

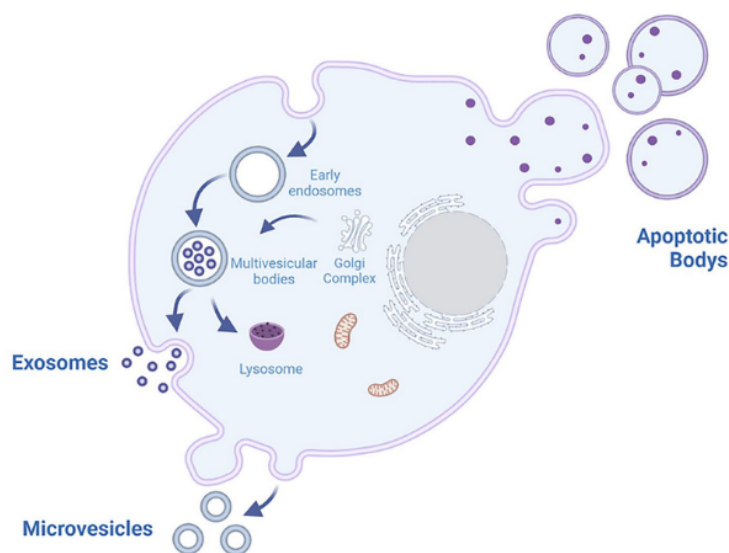


Figura 1: Biogênese das Vesículas Extracelulares (Lima; Januzzi; Gameiro, 2025).

Apesar das diferenças em tamanho e mecanismos de biogênese, ambas as subpopulações participam da comunicação intercelular por meio da transferência de moléculas bioativas, influenciando processos fisiológicos e patológicos (van Niel; D'Angelo; Raposo, 2018). No contexto do câncer, essa capacidade de comunicação assume papel central na progressão tumoral (Lopes et al., 2022). Estudos demonstram que células tumorais apresentam secreção aumentada de vesículas extracelulares em comparação com células não transformadas, e que essa produção pode aumentar conforme a progressão da doença (Ginestra et al., 1998; Bebelman et al., 2018). As VEs derivadas de tumores participam ativamente da remodelação do microambiente tumoral ao transferirem moléculas associadas à malignidade para células do estroma e do sistema imunológico, contribuindo para proliferação tumoral, angiogênese, invasão estromal, formação de nichos pré-metastáticos e colonização metastática (Peinado et al., 2012; Hoshino et al., 2015; Broekman et al., 2018; Wortzel et al., 2019; Li et al., 2024).

Nesse contexto, a capacidade de remodelação do microambiente tumoral pelas células cancerígenas depende, em grande parte, de mecanismos de comunicação intercelular capazes de alterar funcionalmente células infiltrantes (Sheehan; D'Souza-Schorey, 2019). Entre esses mecanismos, as vesículas extracelulares destacam-se como importantes mediadoras da sinalização tumoral, promovendo a transferência de material oncogênico e modulando a resposta imune local (Sedgwick; D'Souza-Schorey; Schorey, 2018). Evidências recentes demonstram que essas vesículas podem induzir reprogramação funcional de diferentes populações celulares, especialmente de macrófagos, cuja elevada plasticidade os torna altamente responsivos aos sinais derivados do tumor (Wang et al., 2014; Marar; Starich; Wirtz, 2021; Reed; Schorey; D'Souza-Schorey, 2021).

1.3 MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR

Os macrófagos são células do sistema imune inato que podem ter origem tanto em precursores embrionários quanto em monócitos derivados da medula óssea. Durante o desenvolvimento embrionário, populações residentes são estabelecidas em diferentes tecidos, onde adquirem características específicas do microambiente local e desempenham funções relacionadas à manutenção da homeostase tecidual (Davies et al., 2013; Gomez Perdiguero et al., 2015). Paralelamente, monócitos circulantes podem ser recrutados da corrente sanguínea

para tecidos periféricos em resposta a estímulos inflamatórios ou lesões, diferenciando-se em macrófagos de acordo com os sinais presentes no microambiente (Bai et al., 2025).

Como importantes efetores da imunidade inata, os macrófagos exercem papel central na vigilância imunológica por meio da fagocitose de patógenos e detritos celulares, da apresentação de antígenos às células do sistema imune adaptativo e da secreção de mediadores inflamatórios que coordenam a resposta imune (Ruiz-Baca et al., 2021). Dessa forma, essas células participam ativamente tanto da defesa contra agentes infecciosos quanto da resolução da inflamação, do reparo tecidual e da manutenção da homeostase (Bai et al., 2025).

Uma das principais características dos macrófagos é sua elevada plasticidade funcional, que lhes permite responder dinamicamente aos estímulos presentes no microambiente (Mantovani et al., 2004). Em decorrência dessa capacidade adaptativa, diferentes estados de ativação podem ser adquiridos conforme os sinais recebidos. Embora a classificação em macrófagos classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2) represente uma simplificação dos fenótipos observados *in vivo*, esse modelo permanece amplamente empregado para descrever os extremos funcionais da ativação macrofágica (Murray, 2017; Atri; Guerfali; Laouini, 2018).

Os macrófagos M1 apresentam perfil predominantemente pró-inflamatório e são induzidos principalmente por produtos microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), além de citocinas como o interferon- γ (IFN- γ) (Murray, 2017; Bai et al., 2025). Caracterizam-se pela elevada expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II), receptores Toll-like (TLR2 e TLR4), moléculas coestimulatórias, como CD80 e CD86, e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), importante marcador da ativação inflamatória (Boutillier; Elsawa, 2021). Funcionalmente, esses macrófagos apresentam elevada capacidade microbicida e tumoricida, produzindo citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-23, IL-1 β e IL-6, além de óxido nítrico (NO), moléculas essenciais para a eliminação de patógenos e células transformadas (Mantovani et al., 2004; Verreck et al., 2004; Boutillier; Elsawa, 2021).

À medida que os estímulos inflamatórios ou os agentes patogênicos são eliminados, a resposta inflamatória tende a ser resolvida, favorecendo a transição dos macrófagos para um perfil funcional predominantemente anti-inflamatório, correspondente ao fenótipo M2 (Sindrilaru et al., 2011). Esses macrófagos apresentam menor capacidade de apresentação de

antígenos e são induzidos principalmente por citocinas como IL-4 e IL-13, caracterizando-se pela produção de mediadores anti-inflamatórios, especialmente IL-10, que lhes conferem propriedades imunorreguladoras (Allavena et al., 2008). Funcionalmente, os macrófagos M2 participam do reparo tecidual, da remodelação da matriz extracelular, da angiogênese e da fagocitose de detritos celulares, contribuindo para a resolução da inflamação e para o restabelecimento da homeostase tecidual (Bouhlef et al., 2007; Wynn; Chawla; Pollard, 2013; Wang; Liang; Zen, 2014; Yeung et al., 2015).

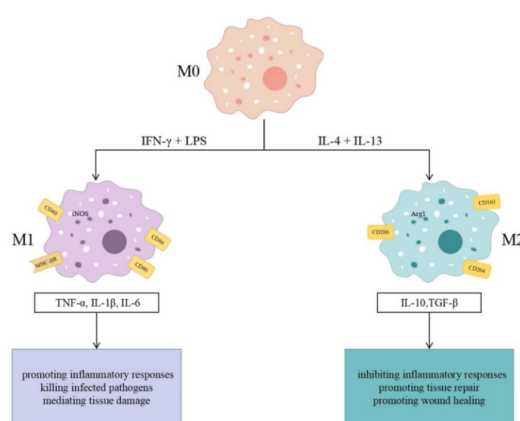


Figura 2: Polarização de macrófagos (Xia et al., 2023).

No microambiente tumoral, os macrófagos infiltrantes são coletivamente denominados macrófagos associados ao tumor (tumor-associated macrophages, TAMs) e constituem uma das populações imunes mais abundantes presentes no estroma tumoral (Cohen; Mosser, 2013; Lavin et al., 2014). O fenótipo destas células é continuamente moldado por citocinas, fatores de crescimento, metabólitos e outros mediadores produzidos pelas células tumorais e pelos componentes do estroma, conferindo-lhes elevado dinamismo funcional ao longo da progressão da doença (Sica; Mantovani, 2012).

Nos estágios iniciais da tumorigênese, os TAMs podem apresentar características semelhantes às dos macrófagos M1, contribuindo para a resposta antitumoral por meio da apresentação de antígenos, ativação de linfócitos T citotóxicos e produção de citocinas inflamatórias (Hadrup; Donia; Thor Straten, 2013; Susek et al., 2018). Entretanto, com a progressão tumoral, sinais imunomoduladores presentes no microambiente favorecem a aquisição de características funcionais semelhantes às do fenótipo M2, promovendo imunossupressão, remodelação da matriz extracelular, angiogênese e disseminação

metastática, processos frequentemente associados ao pior prognóstico clínico (Sica; Mantovani, 2012; Komohara et al., 2016; Han et al., 2017).

Contudo, evidências recentes demonstram que a dicotomia entre os fenótipos M1 e M2 não representa adequadamente a complexidade dos macrófagos presentes no microambiente tumoral (Reed; Schorey; D'Souza-Schorey, 2021). Em vez de estados de ativação mutuamente exclusivos, os TAMs frequentemente apresentam fenótipos intermediários ou híbridos, capazes de coexpressar marcadores e funções características de ambos os extremos de polarização, em resposta aos múltiplos estímulos presentes no tumor (Murray, 2017; Strizova et al., 2023). Essa elevada plasticidade funcional permite que os macrófagos desempenhem simultaneamente atividades inflamatórias e imunorregulatórias, contribuindo para a dinâmica do microambiente tumoral e para a evolução da doença.

Nesse contexto, as vesículas extracelulares destacam-se como importantes mediadoras da comunicação entre células tumorais e células do sistema imune. Evidências demonstram que vesículas extracelulares derivadas de células de câncer de mama, especialmente do subtipo triplo-negativo, transportam proteínas, lipídios, mRNAs e microRNAs capazes de modular funcionalmente células do estroma e do sistema imune (Green et al., 2015; Marar; Starich; Wirtz, 2021). Entre seus principais alvos encontram-se os macrófagos, cuja elevada plasticidade os torna particularmente suscetíveis à reprogramação induzida por esses sinais, favorecendo a aquisição de fenótipos associados à progressão tumoral (Reed; Schorey; D'Souza-Schorey, 2021).

Diante desse cenário, compreender como as vesículas extracelulares derivadas da linhagem murina de câncer de mama triplo-negativo 4T1 influenciam o fenótipo e a função de macrófagos representa um passo importante para elucidar os mecanismos de comunicação entre células tumorais e o sistema imune. Além de contribuir para o entendimento da remodelação do microambiente tumoral, essa investigação poderá fornecer evidências sobre os mecanismos pelos quais as vesículas extracelulares modulam a resposta imune inata e favorecem a progressão do câncer de mama.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade das vesículas extracelulares derivadas da linhagem murina de câncer de mama triplo-negativo 4T1 em modular o fenótipo e a viabilidade de macrófagos RAW 264.7.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as vesículas extracelulares isoladas da linhagem 4T1 quanto ao rendimento, tamanho e morfologia.
- Avaliar a influência das vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1 sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7.
- Investigar a capacidade das vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1 de induzir modulação fenotípica em macrófagos não polarizados.
- Avaliar a influência das vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1 sobre a estabilidade fenotípica de macrófagos previamente polarizados para os perfis M1 e M2.
- Avaliar a modulação funcional dos macrófagos após exposição às vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1 por meio da expressão de iNOS e da produção de mediadores inflamatórios, incluindo óxido nítrico, IL-6, TNF- α e IL-10.

3. DESENHO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental do estudo está representado na Figura 3. Inicialmente, vesículas extracelulares foram isoladas do sobrenadante da cultura da linhagem murina de câncer de mama triplo-negativo 4T1 e caracterizadas quanto ao tamanho por espalhamento dinâmico de luz (DLS/Zetasizer) e à concentração proteica pelo método BCA. Em uma etapa preliminar, a viabilidade celular das VEs foram avaliadas em macrófagos RAW 264.7 não polarizados (M0) por meio dos ensaios de MTT. Posteriormente, macrófagos RAW 264.7 foram polarizados para os fenótipos M0, M1 e M2, e tratados com VEs derivadas da linhagem 4T1, formando assim os seguintes grupos experimentais: M0, M0 + VE, M1, M1 + VE, M2 e M2 + VE. Após o tratamento, foram realizadas análises de modulação fenotípica por citometria de fluxo, dosagem de citocinas pró- e anti-inflamatórias pelo método de ELISA e pela mensuração da produção de óxido nítrico.

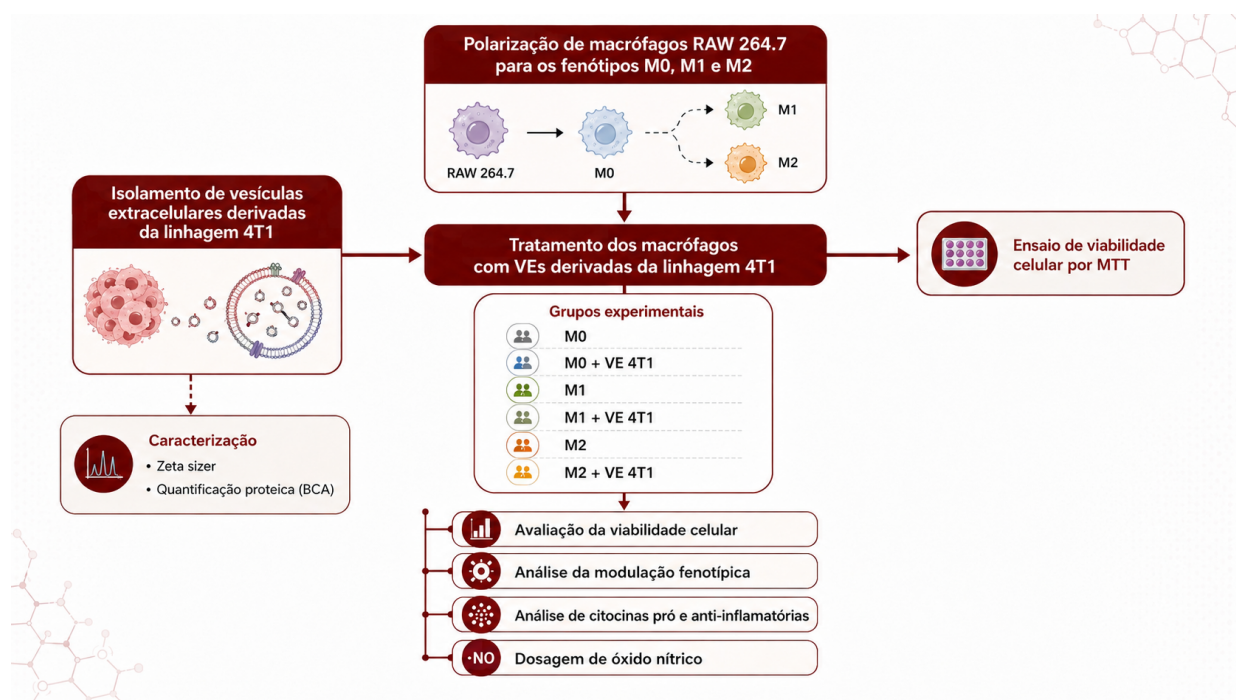


Figura 3: Fluxograma do desenho experimental proposto.
Fonte: Elaboração própria, com auxílio do ChatGPT (OpenAI), 2026.

4. METODOLOGIA

4.1 CULTURA CELULAR

As linhagens celulares murinas RAW 264.7 e 4T1 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) previamente depletado de exossomos e 2% de solução de penicilina/estreptomicina. sob incubação a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ (estufa ThermoFisher). Após a linhagem 4T1 atingir a confluência adequada, foi realizada a coleta do meio de cultura condicionado, o qual foi congelado e armazenado a -80°C, até sua utilização no ensaio de isolamento de VEs.

4.2 ISOLAMENTO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DO SOBRENADANTE CELULAR

O isolamento das vesículas extracelulares foi realizado a partir do meio condicionado da linhagem murina de câncer de mama triplo-negativo 4T1. Para obtenção das réplicas biológicas, foram utilizados sobrenadantes provenientes de seis passagens celulares independentes. O sobrenadante da cultura celular foi coletado em tubos Falcon de 15 mL e submetido a um protocolo de centrifugação diferencial para remoção de células e detritos celulares. Inicialmente, as amostras foram centrifugadas a $800 \times g$ por 10 minutos, seguidas de uma segunda centrifugação a $2.000 \times g$ por 20 minutos, ambas realizadas à temperatura ambiente (18 °C). Após cada etapa de centrifugação, os pellets foram descartados e os sobrenadantes transferidos para novos tubos. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a $18.000 \times g$ por 30 minutos, a 4 °C, para obtenção da fração enriquecida em microvesículas. Ao término da centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em 200 µL de PBS 1×, constituindo a suspensão final de microvesículas. O sobrenadante remanescente foi então filtrado por meio de filtro de seringa com membrana de 0,22 µm e transferido para tubos de ultracentrifugação. As amostras foram submetidas à ultracentrifugação a $100.000 \times g$ por 1 hora e 20 minutos, a 4 °C. Ao final do procedimento, o pellet obtido foi ressuspensionado em 200 µL de PBS 1×, constituindo a fração enriquecida em exossomos, utilizada nos experimentos subsequentes.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

4.3.1 ZETASIZER

O tamanho das vesículas extracelulares isoladas foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS), utilizando o equipamento Zetasizer. Para a análise, as amostras foram diluídas 1:400 em PBS 1× e analisadas a 25 °C, após calibração do equipamento de acordo com as recomendações do fabricante. Cada amostra foi submetida a aproximadamente 30 leituras consecutivas, distribuídas em três corridas independentes. Os

resultados foram expressos como diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*) e índice de polidispersidade (*Polydispersity Index* – PDI), parâmetro utilizado para avaliar a homogeneidade da população de partículas.

4.3.2 DOSAGEM PROTEICA

A quantificação proteica das amostras de vesículas extracelulares foi realizada utilizando o ensaio colorimétrico *BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific), conforme as recomendações do fabricante. A absorbância foi medida a 562 nm em espectrofotômetro, e o teor de proteínas foi calculado com base em uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

4.3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A caracterização morfológica das vesículas extracelulares foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando a técnica de contraste negativo. Para o preparo das amostras, as alíquotas da suspensão de vesículas foram depositadas sobre grades de cobre revestidas com filme de carbono e contrastadas com ácido fosfotúngstico (PTA) a 2% (pH 7,0). Após secagem à temperatura ambiente, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão operando entre 80 e 120 kV. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sob supervisão técnica de Eduardo José Lopes Torres.

4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

A viabilidade celular dos macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 após tratamento com vesículas extracelulares foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Para o ensaio, as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^3 células por poço, em meio RPMI, e incubadas por 24 horas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂, para permitir a adesão celular. Em seguida, foram tratadas com microvesículas ou exossomos derivadas da linhagem 4T1, nas concentrações de 10, 15 e 20 µg, permanecendo em incubação por 24 ou 48 horas. Ao final de cada período experimental, foram adicionados 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL), seguindo-se incubação por aproximadamente 2 horas a 37 °C. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e os cristais de formazan formados foram solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 540 nm, sendo a viabilidade celular expressa em porcentagem em relação ao grupo controle não tratado, considerado como 100% de viabilidade.

4.5 POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

Para avaliar o efeito das vesículas extracelulares na modulação fenotípica de macrófagos, células da linhagem RAW 264.7 foram previamente polarizadas para os fenótipos M0, M1 e M2. As células foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 1×10^5 células por poço e incubadas por 24 horas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂, para permitir a adesão celular. Em seguida, os protocolos de polarização foram realizados por 24 horas. O fenótipo M1 foi induzido por meio de meio de cultura suplementado com lipopolissacarídeo (LPS; 1 µg/mL) e interferon-gama (IFN-γ; 5 ng/mL), enquanto a polarização para o fenótipo M2 foi obtida mediante suplementação com interleucina-4 (IL-4; 20 ng/mL). As células do grupo M0 permaneceram sem estímulo, sendo submetidas apenas à substituição do meio de cultura.

4.6 TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES

Concluída a etapa de polarização, as células foram distribuídas em seis grupos experimentais: M0, M0 + VE, M1, M1 + VE, M2 e M2 + VE. As culturas destinadas ao tratamento receberam microvesículas isoladas da linhagem murina de câncer de mama triplo-negativo 4T1, na concentração final de 100 µg/mL, enquanto os respectivos grupos controle receberam apenas meio de cultura fresco suplementado com SFB previamente depletado de vesículas extracelulares. As células permaneceram incubadas por mais 24 horas nas mesmas condições de cultivo. Ao término desse período, foram coletados tanto o sobrenadante quanto as células de cada condição experimental para a realização das análises subsequentes.

4.7 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após os tratamentos experimentais, as células foram coletadas e ressuspensas em solução tampão, em volume final de 30 µL, para marcação com anticorpos fluorescentes destinados à análise por citometria de fluxo. A viabilidade celular foi determinada utilizando o corante LIVE/DEAD conjugado ao fluorocromo BV510 (1:1000), enquanto a expressão intracelular de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), empregada como marcador do perfil inflamatório dos macrófagos, foi avaliada com anticorpo conjugado a PE-Cy7 (1:200). As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter), disponível no Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). A análise dos dados foi realizada no software FlowJo, utilizando estratégia de *gating* para exclusão de *debris*, seleção de células viáveis e

determinação da frequência de células positivas para iNOS.

4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS ANTI E PRÓ INFLAMATÓRIAS

Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados após 24 horas de tratamento e armazenados a -80°C até a realização do ensaio imunoenzimático de captura (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA). A quantificação das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α foi realizada utilizando kits OptEIA™ (BD Biosciences), conforme as recomendações do fabricante. As amostras foram diluídas de acordo com a faixa de detecção de cada citocina, e a absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 450 nm. Por fim, os resultados foram expressos em densidade óptica (OD).

4.9 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A fim de quantificar o óxido nítrico presente no meio de cultura celular após o tratamento com vesículas extracelulares e avaliar a produção de mediadores associados à resposta inflamatória, a dosagem de óxido nítrico foi realizada pelo método colorimétrico de Griess. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e armazenados a -80°C até o momento da análise. Para o ensaio, as alíquotas de 100 μL dos sobrenadantes celulares foram incubadas com volume equivalente de reagente de Griess por 10 minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. A quantificação foi realizada com base em curva padrão construída a partir de diluições seriadas de nitrito de sódio (NaNO_2).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), e a distribuição das amostras foi avaliada por testes de normalidade. Para comparações entre dois grupos independentes, foi utilizado o teste *t* de Student paramétrico não pareado. Nas análises envolvendo múltiplos grupos empregou-se análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*). Em todas as análises, foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

5.1.1 ZETASIZER

A análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS) demonstrou diferenças na distribuição de tamanho entre as populações de vesículas extracelulares isoladas da linhagem 4T1. As grandes vesículas (microvesículas) apresentaram pico de tamanho predominante em 203,2 nm. Já as pequenas vesículas extracelulares (exossomos) apresentaram pico predominante em 151,7 nm.

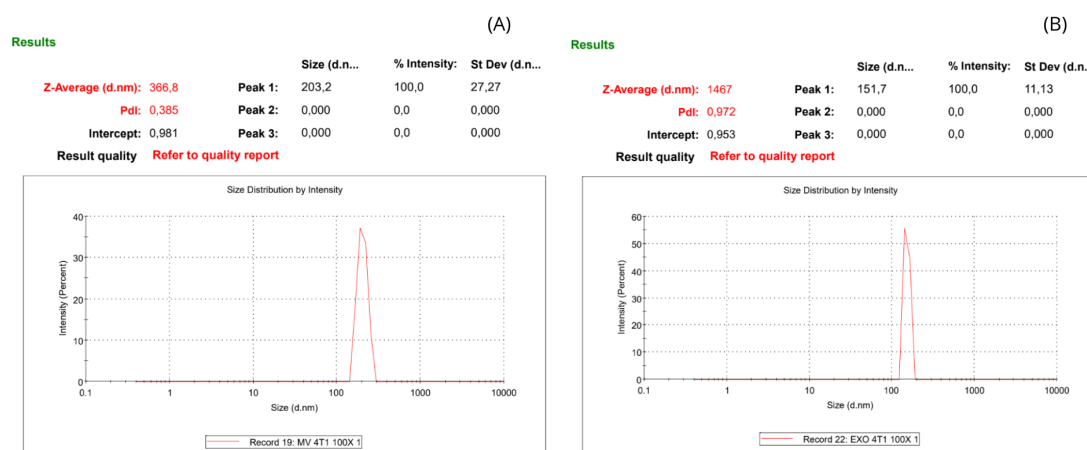


Figura 4: Distribuição de tamanho das vesículas extracelulares isoladas da linhagem celular 4T1 por espalhamento dinâmico de luz (DLS). (A) Distribuição de tamanho por intensidade das microvesículas (MVs). (B) Distribuição de tamanho por intensidade das pequenas vesículas extracelulares (exossomos) isoladas da mesma linhagem celular.

5.1.2 BCA

A partir do ensaio de BCA foi possível observar que o grupo de MVs apresentou concentração proteica média de aproximadamente 2.700 µg/mL, enquanto o grupo de Exos apresentou aproximadamente 1.800 µg/mL, conforme demonstrado na Figura 5.

Microvesículas 4T1	2.701,593
Exossomos 4T1	1.813,675

Figura 5: Concentração proteica média das vesículas extracelulares, expressa em albumina (µg/mL), determinada por meio do ensaio *BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific).

5.1.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A análise por microscopia eletrônica de transmissão permitiu identificar partículas membranosas com morfologia aproximadamente esférica e dimensões nanométricas, compatíveis com vesículas extracelulares isoladas (Figura 6). Observou-se a presença de estruturas delimitadas por membrana, com diâmetro compatível com pequenas vesículas extracelulares, corroborando a obtenção de partículas com características morfológicas esperadas após o processo de isolamento.

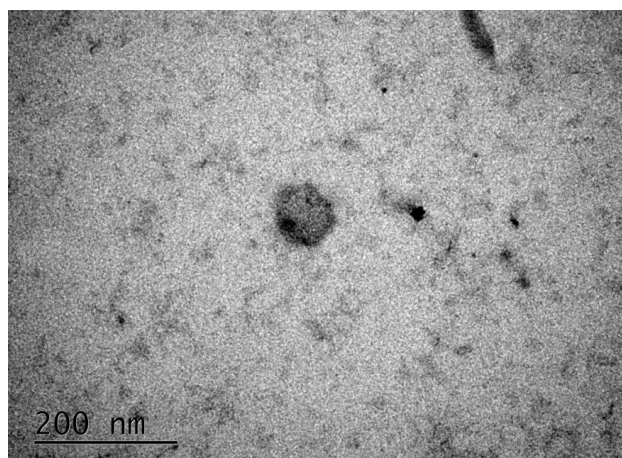


Figura 6. Caracterização morfológica das vesículas extracelulares isoladas da linhagem de câncer de mama 4T1 por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT

Conforme demonstrado na Figura 7, após 24 horas de tratamento, as concentrações de 10 e 15 μg , tanto de MV quanto de Exo, mantiveram valores de viabilidade próximos ao grupo controle, sugerindo ausência de alterações significativas na atividade metabólica celular. Em contrapartida, a concentração de 20 μg promoveu redução significativa da viabilidade metabólica tanto em tratamentos com MVs ($p = 0,0027$) como com Exos ($p = 0,0028$).

Entretanto, esse efeito mostrou-se dependente do tempo de exposição. Após 48 horas, observou-se aumento da atividade metabólica celular na maioria dos grupos experimentais em comparação ao controle, sendo esse efeito mais pronunciado no grupo tratado com 20 μg de exossomos derivados da linhagem 4T1. Esses achados sugerem que a exposição inicial a maiores concentrações de vesículas extracelulares promoveu uma redução transitória da viabilidade metabólica dos macrófagos. No entanto, após 48 horas, observou-se restabelecimento e até aumento da atividade metabólica celular, indicando possível adaptação fisiológica dos macrófagos ao estímulo vesicular ao longo do tempo.

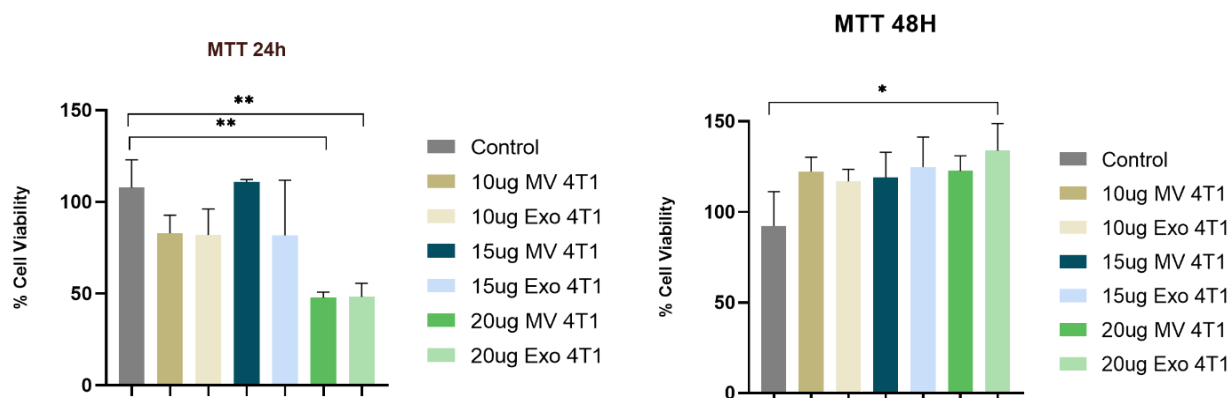


Figura 7. Avaliação da viabilidade metabólica de macrófagos RAW 264.7 após tratamento com diferentes concentrações de microvesículas e exossomos derivados da linhagem 4T1 por 24 e 48 horas. Análise estatística realizada por One-way ANOVA. Diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

Com o objetivo de confirmar os achados observados no ensaio inicial de MTT, foram realizados três experimentos independentes adicionais utilizando 20 μg de MVs e Exos derivados da linhagem 4T1 em macrófagos RAW 264.7, nos períodos de 24 e 48 horas. Conforme demonstrado na Figura 8, as alterações observadas no primeiro ensaio não foram reproduzidas nos experimentos subsequentes, não sendo identificadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o controle em nenhum dos tempos avaliados. Dessa forma, não foi possível confirmar um efeito consistente das vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1 sobre a viabilidade metabólica de macrófagos.

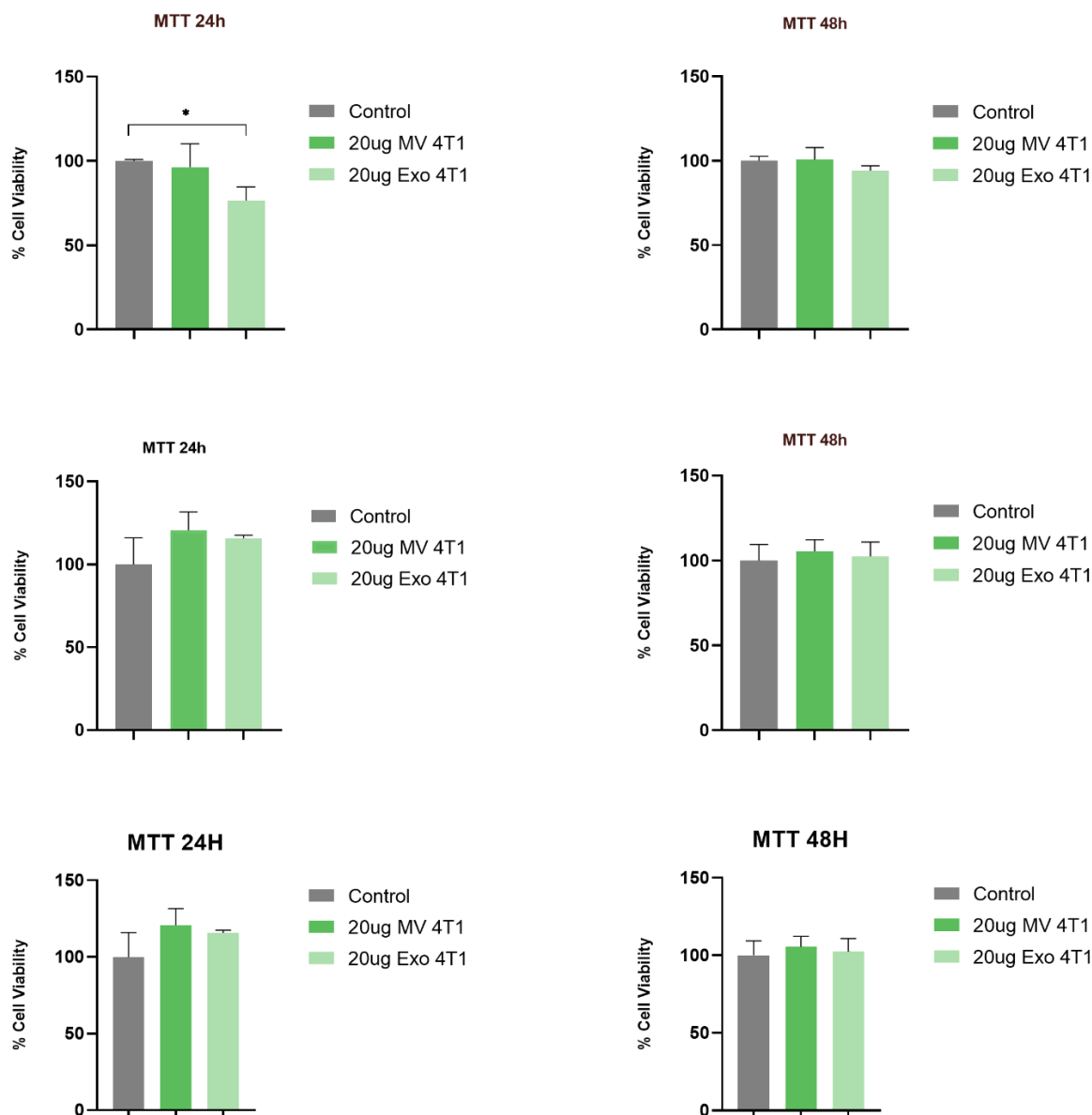


Figura 8. Avaliação da viabilidade metabólica de macrófagos RAW 264.7 após tratamento com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1 (20 $\mu\text{g/mL}$) nos períodos de 24 e 48 horas, por meio do ensaio de MTT. Análise estatística realizada por One-way ANOVA. Diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

5.3 AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO FENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Com o objetivo de avaliar os efeitos das vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1 sobre macrófagos não polarizados (M0) e previamente polarizados para os fenótipos M1 e M2, foi realizada análise por citometria de fluxo para investigação simultânea da viabilidade celular e da modulação fenotípica dessas populações. Para isso, foram utilizados o marcador de viabilidade celular LIVE/DEAD e o marcador intracelular inflamatório iNOS, permitindo a avaliação tanto da integridade celular quanto de alterações no perfil funcional dos macrófagos após o tratamento com as vesículas extracelulares.

Na Figura 9, está ilustrada a estratégia de gate aplicada para a análise por citometria de fluxo. Inicialmente, foi delimitada a população principal de macrófagos com base em seus parâmetros de tamanho e complexidade celular, permitindo a exclusão de eventos inespecíficos. Em seguida, foi aplicado o gate referente ao marcador de viabilidade. Por fim, dentro da população de células viáveis, foi realizada a análise da expressão intracelular de iNOS

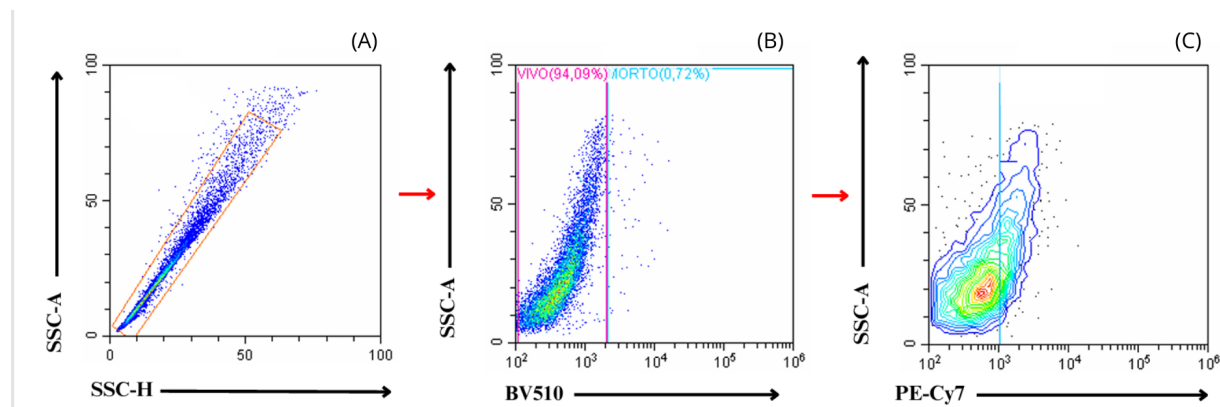


Figura 9. Estratégia de *gating* aplicada na análise por citometria de fluxo para seleção da população de macrófagos RAW 264.7 e avaliação da viabilidade celular e da expressão intracelular de iNOS após tratamento com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1. (A) Exclusão de *doublets* por meio da relação SSC-H $\times$ SSC-A. (B) Seleção das células viáveis utilizando o marcador LIVE/DEAD (BV510). (C) Avaliação da expressão intracelular de iNOS (PE-Cy7) na população de células viáveis.

Conforme demonstrado na Figura 10, não foram observadas alterações significativas na viabilidade celular após o tratamento com as vesículas extracelulares em nenhum dos grupos avaliados. Esses resultados corroboram os achados obtidos nos ensaios de MTT, reforçando que, nas condições experimentais analisadas, as vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1 não promoveram comprometimento da viabilidade de macrófagos RAW 264.7.

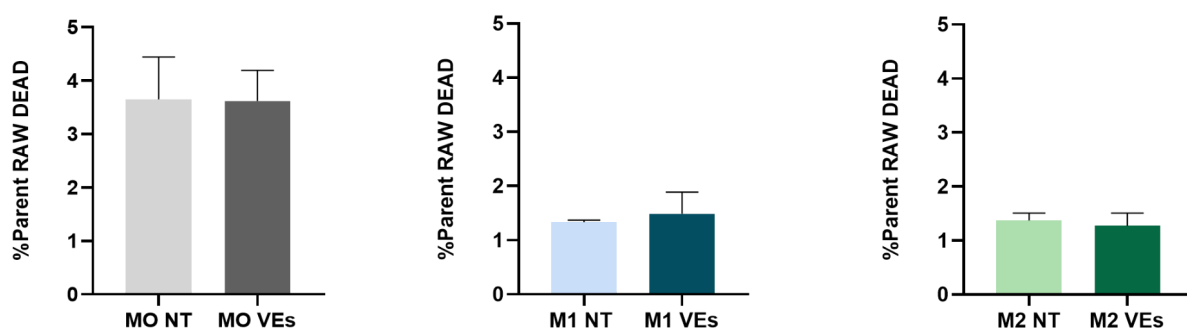


Figura 10. Avaliação da viabilidade de macrófagos RAW 264.7 não polarizados (M0) e previamente polarizados para os fenótipos M1 e M2 após tratamento com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1, por citometria de fluxo utilizando o marcador de viabilidade LIVE/DEAD. Análise estatística realizada por teste *t* de Student paramétrico. Diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

No grupo de macrófagos M0, as vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1 promoveram aumento significativo da expressão de iNOS após 24 horas de tratamento ($p < 0,0001$) (Figura 11A). Esse aumento também foi observado na população de macrófagos M2, embora em menor magnitude ($p = 0,0072$) (Figura 11C). Em contrapartida, os macrófagos M1, previamente polarizados para um perfil pró-inflamatório, não apresentaram alterações significativas na expressão de iNOS após o tratamento com as vesículas extracelulares (Figura 11B). Em conjunto, esses resultados sugerem que as vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1 promovem modulação funcional dos macrófagos, induzindo um perfil mais pró-inflamatório principalmente em macrófagos M0 e M2.

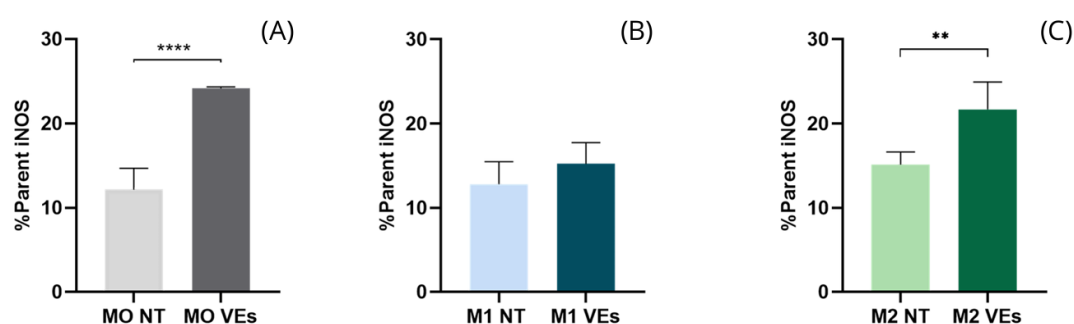


Figura 11. Avaliação da modulação da expressão de iNOS em macrófagos RAW 264.7 não polarizados (M0) e previamente polarizados para os fenótipos M1 e M2 após tratamento com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1, por citometria de fluxo. Análise estatística realizada por teste *t* de Student. Diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

5.4 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

A dosagem de NO foi realizada com o objetivo de complementar a análise da expressão de iNOS e investigar possível modulação pró-inflamatória. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na quantidade de NO secretado em nenhuma das populações celulares avaliadas, tanto antes quanto após o tratamento com as vesículas extracelulares. Esses resultados indicam que, embora as vesículas extracelulares tenham promovido modulação da expressão de iNOS, essa alteração não se refletiu em aumento detectável da secreção de óxido nítrico nas condições experimentais analisadas.

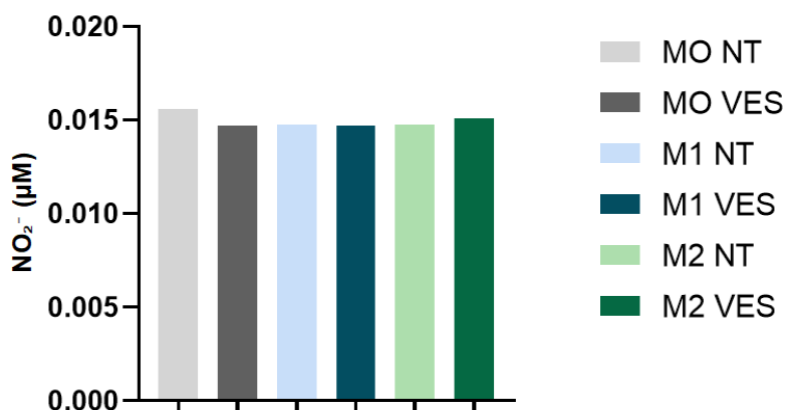


Figura 12. Dosagem de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 previamente polarizados e tratados com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1. Análise estatística realizada por One-way ANOVA. Diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

5.5 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA

A análise do perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias demonstrou aumento significativo ($p = 0,0163$) da secreção de IL-6 exclusivamente em macrófagos M0 após o tratamento com vesículas extracelulares (Figura 13A), sugerindo uma modulação inflamatória parcial em células não polarizadas. Por outro lado, os macrófagos previamente polarizados para os fenótipos M1 e M2 não apresentaram alterações significativas nos níveis desta citocina após a exposição às VEs (Figuras 13B e 13C).

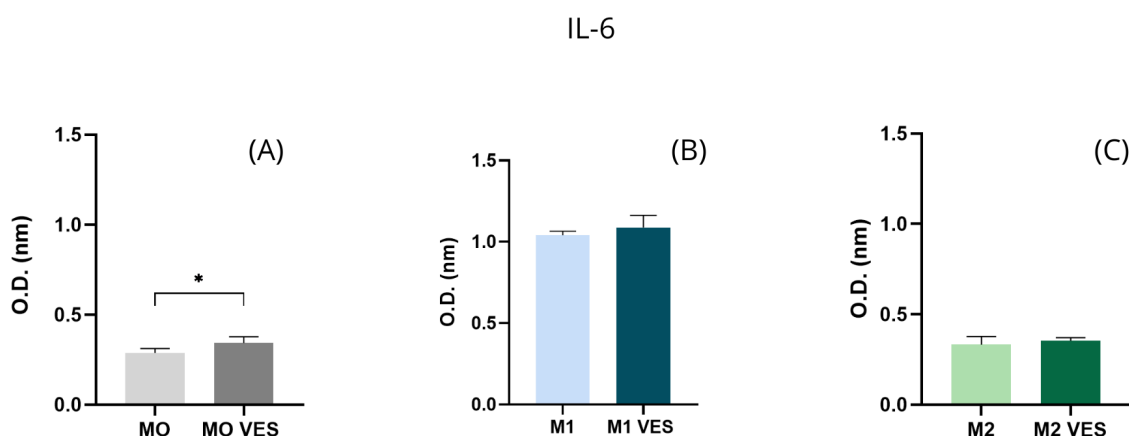


Figura 13. Quantificação da citocina IL-6 no sobrenadante de macrófagos previamente polarizados e tratados com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1. Análise estatística realizada por teste t de Student. Diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

De forma semelhante, também foi verificada, em M0, redução nos níveis de TNF- α após tratamento com VEs ($p = 0,0070$) (Figura 15A), sugerindo um possível efeito

imunomodulador dessas vesículas sobre mediadores pró-inflamatórios.

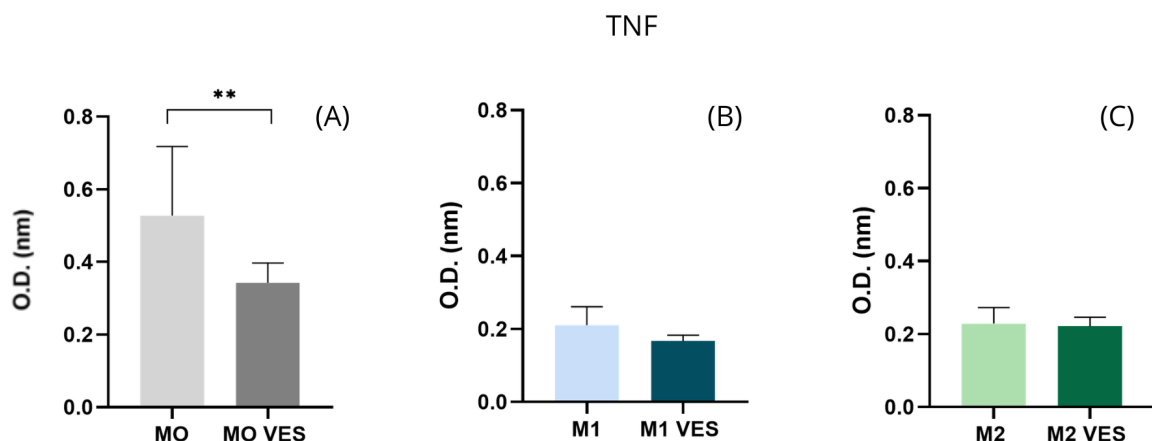


Figura 14. Quantificação da citocina TNF- α no sobrenadante de macrófagos previamente polarizados e tratados com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1. Análise estatística realizada por teste *t* de Student. Diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

Por fim, a IL-10 apresentou redução em macrófagos M1 e M2 após exposição às VEs (Figuras 16B e C), indicando que o tratamento também interfere em vias associadas à regulação anti-inflamatória e controle da resposta imune.

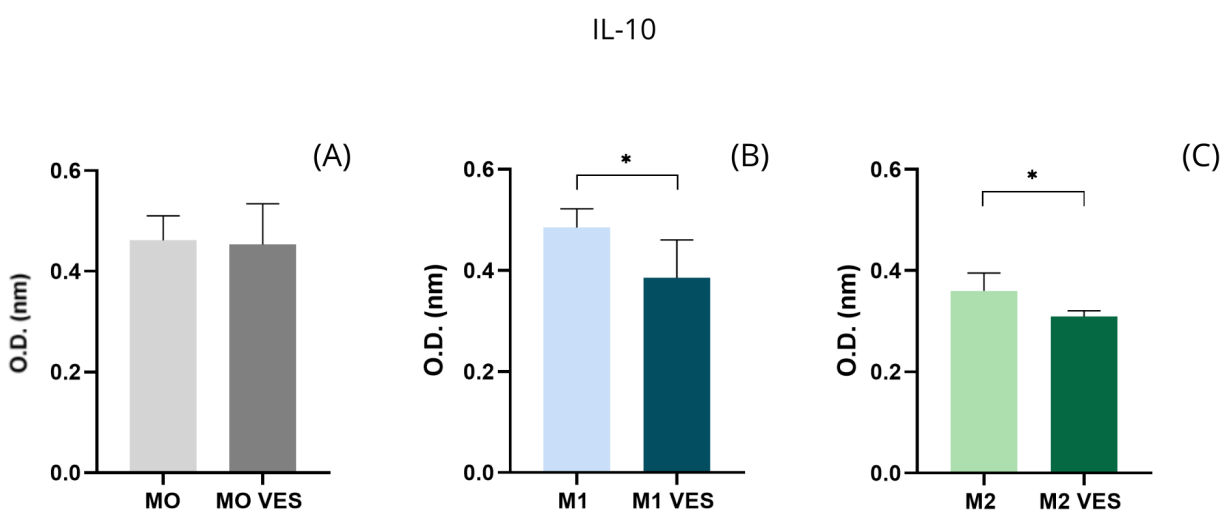


Figura 15 Quantificação da citocina IL-10 no sobrenadante de macrófagos previamente polarizados e tratados com vesículas extracelulares derivadas da linhagem 4T1. Análise estatística realizada por teste *t* de Student. Diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigou-se o efeito de VEs derivadas da linhagem de câncer de mama triplo-negativo murino 4T1 sobre macrófagos RAW264.7, não polarizados e previamente polarizados, com o objetivo de avaliar possíveis alterações fenotípicas associadas ao microambiente tumoral e efeitos citotóxicos sobre essas células.

O isolamento por centrifugação diferencial resultou em bom rendimento de vesículas extracelulares, evidenciado pela quantificação proteica por BCA (aproximadamente 2.700 µg/mL para microvesículas e 1.800 µg/mL para exossomos). Embora a quantificação proteica e a análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS), isoladamente, não sejam suficientes para confirmar a pureza das amostras, conforme estabelecido pelas diretrizes do MISEV (Théry et al., 2018), os diâmetros hidrodinâmicos observados (203,2 nm e 151,7 nm) mostraram-se compatíveis com faixas descritas na literatura para diferentes subpopulações de vesículas extracelulares (Kowal et al., 2016), sugerindo enriquecimento adequado das frações isoladas. Além disso, a caracterização morfológica por MET permitiu a visualização de estrutura vesicular com morfologia aproximadamente esférica e dimensões nanométricas, compatíveis com o perfil estrutural esperado para vesículas extracelulares. Em conjunto, esses achados sugerem que o protocolo baseado em centrifugação diferencial e ultracentrifugação foi eficiente para obtenção de frações enriquecidas em vesículas extracelulares.

No entanto, a ausência de caracterização por marcadores específicos recomendados pela ISEV limita a confirmação da identidade das vesículas, sendo necessária a complementação com técnicas como Western blot ou citometria de fluxo. Além disso, a quantificação baseada em proteína total não permite estimar com precisão o número de vesículas administradas, o que pode influenciar a padronização das doses e contribuir para a variabilidade observada em alguns resultados. Apesar dessas limitações metodológicas, os achados do presente estudo permanecem alinhados a evidências da literatura que descrevem as vesículas extracelulares tumorais como importantes mediadoras da comunicação no microambiente tumoral, capazes de modular funcional e fenotipicamente células imunes, incluindo macrófagos (Wortzel et al., 2019; Reed; Schorey; D'Souza-Schorey, 2021).

As vesículas extracelulares derivadas de células de câncer de mama não exerceram impacto significativo sobre a viabilidade dos macrófagos RAW264.7, sem alterações relevantes em parâmetros de proliferação ou redução de viabilidade celular após 24 ou 48 horas de estímulo. Esse achado indica que, apesar de sua origem tumoral e da potencial presença de carga oncogênica, tanto grandes quanto pequenas VEs não apresentam efeito

citotóxico sobre os macrófagos nas condições experimentais avaliadas. Os resultados obtidos sugerem que as VEs tumorais não comprometem a viabilidade dos macrófagos, mas podem atuar predominantemente na modulação funcional dessas células. Esse padrão é consistente com a literatura, a exemplo do estudo de Tkach et al. (2022), que demonstra que VEs derivadas de câncer de mama triplo-negativo são capazes de preservar a viabilidade celular ao mesmo tempo em que promovem reprogramação funcional de macrófagos, incluindo a entrega de sinais de sobrevivência, como CSF-1 de superfície, e indução de alterações fenotípicas associadas ao microambiente tumoral. Adicionalmente, é importante destacar que a dose de vesículas extracelulares utilizada representa uma variável experimental relevante e pode ter contribuído para a ausência de resultados significativos. Nesse contexto, não se pode descartar a possibilidade de que a concentração utilizada de VEs não tenha sido suficiente para induzir alterações detectáveis na viabilidade dos macrófagos, de modo que concentrações mais elevadas poderiam resultar em respostas distintas.

A enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é amplamente utilizada como marcador de ativação funcional de macrófagos, por catalisar a produção de NO a partir da L-arginina (Otto; Baumgardner, 2001). Em células mieloides, sua expressão é classicamente induzida por estímulos pró-inflamatórios, como LPS e IFN- γ , estando associada a respostas inflamatórias, atividade microbicida e potencial antitumoral. De forma geral, níveis elevados de iNOS são característicos de macrófagos com perfil M1, enquanto macrófagos alternativamente ativados (M2) tendem a expressar arginase-1, associada a processos de reparo tecidual, angiogênese e imunossupressão (Murphy; Weaver, 2022). No presente estudo, o aumento da expressão de iNOS em macrófagos M0 e M2 após tratamento com vesículas extracelulares sugere que essas vesículas foram capazes de induzir reprogramação funcional dessas células em direção a um estado mais inflamatório. No entanto, esse achado deve ser interpretado com cautela, uma vez que a indução de um perfil semelhante a M1 não necessariamente se traduz em atividade antitumoral efetiva (Jiang et al., 2024).

Nesse sentido, embora macrófagos associados ao tumor sejam frequentemente descritos como M2-like, estudos recentes demonstram que vesículas extracelulares tumorais podem induzir a expressão de marcadores inflamatórios sem reversão funcional completa do fenótipo. Xiao et al. (2018), por exemplo, observaram que exossomos derivados de carcinoma espinocelular oral promovem aumento de marcadores associados à inflamação, mas simultaneamente favorecem processos pró-tumorais, como migração celular. Esses dados reforçam a elevada plasticidade dos macrófagos associados ao tumor, que podem assumir estados híbridos ou intermediários, nos quais a expressão de marcadores clássicos M1/M2 não reflete necessariamente sua função biológica final no microambiente tumoral.

A ausência de aumento adicional de iNOS no grupo M1 após exposição às vesículas extracelulares pode ser interpretada à luz da forte ativação transcricional induzida pelo estímulo inicial com LPS e IFN- γ . Barish et al. (2005) demonstraram que a ativação por LPS promove uma indução massiva do gene *Nos2* (iNOS), com aumentos que podem atingir milhares de vezes em relação ao basal, refletindo uma intensa atividade da maquinaria transcricional. Nesse contexto, é plausível que o sistema já se encontre em um estado de saturação funcional, no qual estímulos adicionais não resultam em aumento mensurável da expressão de iNOS.

Além disso, o conceito de tolerância à endotoxina descrito na literatura (Cohen; Mosser, 2013) indica que a exposição prévia ao LPS pode levar a um estado de hiporresponsividade a reestimulações subsequentes, caracterizado pela redução da capacidade de indução de mediadores inflamatórios clássicos, como iNOS. Assim, o grupo M1 pode ter apresentado um estado de responsividade limitada, no qual as vesículas extracelulares não foram capazes de amplificar adicionalmente essa via. Esses dados reforçam que a resposta de macrófagos às vesículas extracelulares depende do estado funcional basal da célula, sendo mais evidente em condições de baixa ou intermediária ativação inflamatória, como M0 e M2.

Adicionalmente, o aumento da expressão de iNOS observado nos macrófagos tratados com vesículas extracelulares da linhagem 4T1 não foi acompanhado por maior produção de NO, evidenciando uma dissociação entre a expressão da enzima e sua atividade funcional. Embora a iNOS seja reconhecida como a principal enzima responsável pela síntese de NO em macrófagos ativados, sua expressão proteica não constitui, isoladamente, um indicativo de sua capacidade catalítica. Nesse contexto, Otto e Baumgardner (2001) demonstraram que os níveis intracelulares de iNOS são regulados não apenas por mecanismos transcricionais, mas também por processos pós-traducionais, como a degradação proteica mediada pela calpaína, evidenciando que a disponibilidade da enzima resulta do equilíbrio dinâmico entre sua síntese e degradação. Embora esse mecanismo tenha sido descrito em condições específicas e não tenha sido avaliado no presente estudo, esses achados reforçam que a regulação da iNOS é complexa e envolve múltiplos mecanismos celulares, de modo que a maior expressão da proteína nem sempre se traduz em aumento da produção de NO.

A análise do ELISA demonstrou que as VEs promoveram alterações distintas na produção de citocinas conforme o estado basal de polarização dos macrófagos, sugerindo que sua ação imunomodulatória é dependente do contexto funcional prévio da célula. Em vez de induzir polarização clássica para fenótipos M1 ou M2, os resultados indicam modulação seletiva de vias inflamatórias, o que é compatível com a elevada plasticidade funcional dos macrófagos no microambiente tumoral.

Em macrófagos M0, observou-se aumento significativo de IL-6 acompanhado de redução de TNF- α , indicando uma modulação para um perfil inflamatório associado à progressão tumoral. Segundo Jiang et al. (2024), no carcinoma de células escamosas oral (OSCC), a proteína HMGB1 secretada pelas células tumorais promove o aumento da secreção de IL-6. Essa citocina, por sua vez, favorece a progressão tumoral ao induzir a transição epitelial-mesenquimal (EMT), aumentar a capacidade migratória e invasiva das células tumorais e ativar a via IL-6/STAT3, amplamente associada à proliferação, metástase e pior prognóstico clínico. Nesse contexto, o aumento de IL-6 sugere que as VEs podem contribuir para um estado inflamatório crônico associado à progressão tumoral, enquanto a redução de TNF- α indica que não houve o estabelecimento de uma resposta citotóxica clássica.

Nos macrófagos M1, a ausência de alterações significativas em IL-6, sugere alteração no perfil inflamatório, demonstrando a limitada capacidade de reprogramação pelas VEs nessa população. Esse achado corrobora a hipótese previamente discutida de tolerância ao LPS, na qual a ativação inflamatória prévia com LPS e IFN- γ induz um estado de hiporresponsividade a estímulos subsequentes.

Já no grupo M2, embora não tenha sido observado aumento de citocinas pró-inflamatórias clássicas, a redução de IL-10, somada ao aumento previamente observado de iNOS, sugere modulação funcional parcial sem conversão completa para um fenótipo M1. Esse perfil reforça a hipótese de estados fenotípicos híbridos, nos quais macrófagos podem co-expressar características inflamatórias e regulatórias. Esse resultado corrobora com evidências da literatura recente, que questiona a dicotomia clássica entre macrófagos M1 e M2 e propõe que, no microambiente tumoral, essas células ocupam um espectro contínuo de estados de ativação, caracterizado por assinaturas moleculares sobrepostas e plasticidade funcional (Strizova et al., 2023). Nesse contexto, a coexpressão de marcadores associados a diferentes estados de polarização observada neste estudo sugere a indução de um fenótipo intermediário M1-like/M2-like, no qual características inflamatórias são parcialmente adquiridas sem o estabelecimento de um programa efetor citotóxico completo.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo atingiu o objetivo proposto ao demonstrar que as vesículas extracelulares derivadas da linhagem murina de câncer de mama triplo-negativo 4T1 são capazes de modular funcionalmente macrófagos RAW264.7 sem comprometer sua viabilidade celular. Os resultados evidenciam que, embora as vesículas extracelulares não tenham induzido uma polarização completa para os fenótipos clássicos M1 ou M2, foram capazes de promover alterações tanto na expressão de iNOS, quanto em relação ao perfil de citocinas, demonstrando que sua ação é dependente do estado basal de ativação dos macrófagos. Deste modo, esses achados reforçam que a interação entre VEs tumorais e macrófagos não resulta em uma resposta uniforme, mas sim, em uma modulação funcional específica, influenciada pelas características funcionais prévias dessas células.

Sendo assim, o presente trabalho contribui para ampliar o entendimento das interações entre células tumorais e componentes do sistema imune, fornecendo evidências de que as VEs participam da remodelação do microambiente tumoral induzindo fenótipos intermediários nos macrófagos. Considerando a elevada plasticidade dessas células e sua importância na progressão do câncer de mama triplo-negativo, os resultados obtidos reforçam a necessidade de estudos adicionais que permitam elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nessa interação, bem como identificar os componentes bioativos das vesículas responsáveis pelos efeitos observados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELS, E. R.; BREAKFIELD, X. O. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. **Cellular and Molecular Neurobiology**, New York, v. 36, n. 3, p. 301-312, abr. 2016.

ALLAVENA, P.; SICA, A.; SOLINAS, G.; PORTA, C.; MANTOVANI, A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 1-9, abr. 2008.

ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 6, p. 1801, jun. 2018

BAI, R.; CHEN, N.; LI, L.; DU, N.; BAI, L.; LV, Z.; TIAN, H.; CUI, J. Mechanisms of cancer resistance to immunotherapy. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 10, p. 1290, jul. 2020.

BAI, X.; GUO, Y. R.; ZHAO, Z. M.; LI, X. Y.; DAI, D. Q.; ZHANG, J. K.; LI, Y. S.; ZHANG, C. D. Macrophage polarization in cancer and beyond: from inflammatory signaling pathways to potential therapeutic strategies. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 625, p. 217772, jan. 2025

BARISH, G. D.; DOWNES, M.; ALAYNICK, W. A.; YAMAMOTO, K. R.; FITZGERALD, M. L.; ESKEW, C.; BENOIT, S. C.; KAHN, C. R.; HAYASHI, T.; ROSENFELD, M. G.; EVANS, R. M. A nuclear receptor atlas: macrophage activation transcriptional cascades. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v. 19, n. 10, p. 2466-2477, out. 2005.

BEBELMAN, M. P.; SMIT, M. J.; PEGTEL, D. M.; BAGLIO, S. R. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 188, p. 1-11, ago. 2018.

BOOMGARDEN, A. C.; SHEEHAN, C.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Extracellular vesicles in the tumor microenvironment: various implications in tumor progression. In: BIRBRAIR, A. (ed.). **Tumor Microenvironment**. Cham: Springer, 2020. p. 113-134. (Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 1259).

BOUTILIER, A. J.; ELSAWA, S. F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 13, p. 6995, jul. 2021.

BROEKMAN, M. L.; MAAS, S. L. N.; ABELS, E. R.; MEMPEL, T. R.; KRICHEVSKY, A. M.; BREAKFIELD, X. O. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. **Nature Reviews Neurology**, London, v. 14, n. 8, p. 482-495, ago. 2018.

COHEN, H. B.; MOSSER, D. M. Extrinsic and intrinsic control of macrophage inflammatory responses. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 94, n. 5, p. 913-919, nov. 2013.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 30, p. 255-289, out. 2014.

DAVIES, L.; JENKINS, S.; ALLEN, J. et al. Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology**, London, v. 14, n. 10, p. 986-995, out. 2013.

DENKERT, C.; LIEDTKE, C.; TUTT, A.; VON MINCKWITZ, G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer: the road to new treatment strategies. **The Lancet**, London, v. 389, n. 10087, p. 2430-2442, jun. 2017.

DERAKHSHAN, F.; REIS-FILHO, J. S. Pathogenesis of triple-negative breast cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, Palo Alto, v. 17, p. 181-204, jan. 2022.

DUAN, L.; MUKHERJEE, E. Janeway's immunobiology, ninth edition. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 89, n. 3, p. 424-425, set. 2016.

FOULKES, W. D. et al. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 64, n. 3, p. 830-835, fev. 2004.

GINESTRA, A.; LA PLACA, M. D.; SALADINO, F.; CASSARÀ, D.; NAGASE, H.; VITTORELLI, M. L. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. **Anticancer Research**, Athens, v. 18, n. 5A, p. 3433-3437, set./out. 1998.

GOMEZ PERDIGUERO, E.; KLAPPROTH, K.; SCHULZ, C.; BUSCH, K.; AZZONI, E.; CROZET, L.; GARNER, H.; TROUILLET, C.; DE BRUIJN, M. F.; GEISSMANN, F.; RODEWALD, H. R. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. **Nature**, London, v. 518, n. 7540, p. 547-551, fev. 2015

GREEN, T. M.; ALPAUGH, M. L.; BARSKY, S. H.; RAPPA, G.; LORICO, A. Breast cancer-derived extracellular vesicles: characterization and contribution to the metastatic phenotype. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. 634865, 2015. .

HADRUP, S.; DONIA, M.; THOR STRATEN, P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. **Cancer Microenvironment**, Dordrecht, v. 6, n. 2, p. 123-133, ago. 2013.

HAN, W.; JACKSON, D. A.; MATISSEK, S. J.; MISURELLI, J. A.; NEIL, M. S.; SKLAVANITIS, B.; AMARSAIKHAN, N.; ELSAWA, S. F. Novel molecular mechanism of regulation of CD40 ligand by the transcription factor GLI2. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 198, n. 11, p. 4481-4489, jun. 2017.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 31-46, jan. 2022.

HEITZ, F.; HARTER, P.; LUECK, H. J.; FISSLER-ECKHOFF, A.; LORENZ-SALEHI, F.; SCHEIL-BERTRAM, S.; TRAUT, A.; DU BOIS, A. Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 45, n. 16, p. 2792-2798

HOSHINO, A. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. **Nature**, London, v. 527, n. 7578, p. 329-335, nov. 2015.

JIANG, M.; LIU, L.; HUANG, W.; QI, Y.; LI, Y.; LI, B. HMGB1-activated tumor-associated macrophages promote migration and invasion via NF- κ B/IL-6 signaling in oral squamous cell carcinoma. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 126, p. 111200, jan. 2024.

JIN, Y.; MA, L.; ZHANG, W. et al. Extracellular signals regulate the biogenesis of extracellular vesicles. **Biological Research**, Santiago, v. 55, p. 35, out. 2022.

KIM, S. K.; CHO, S. W. The evasion mechanisms of cancer immunity and drug intervention in the tumor microenvironment. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 13, p. 868695, mar. 2022

KOMOHARA, Y.; FUJIWARA, Y.; OHNISHI, K.; TAKEYA, M. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 99, pt. B, p. 180-185, abr. 2016.

KONG, G.; LIU, J.; WANG, J.; YU, X.; LI, C.; DENG, M.; LIU, M.; WANG, S.; TANG, C.; XIONG, W.; FAN, J. Engineered extracellular vesicles modified by Angiopep-2 peptide promote targeted repair of spinal cord injury and brain inflammation. **ACS Nano**, Washington, v. 19, n. 4, p. 4582-4600, fev.

2025.

KOWAL, J.; ARRAS, G.; COLOMBO, M.; JOUVE, M.; MORATH, J. P.; PRIMDAL-BENGTSON, B.; DINGLI, F.; LOEW, D.; TKACH, M.; THÉRY, C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 113, n. 8, p. E968-E977, fev. 2016.

LABANI-MOTLAGH, A.; ASHJA-MAHDAVI, M.; LOSKOG, A. The tumor microenvironment: a milieu hindering and obstructing antitumor immune responses. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 11, p. 940, maio 2020.

LAVIN, Y.; WINTER, D.; BLECHER-GONEN, R.; DAVID, E.; KEREN-SHAUL, H.; MERAD, M.; JUNG, S.; AMIT, I. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell**, Cambridge, v. 159, n. 6, p. 1312-1326, dez. 2014.

LI, Y.; ZHENG, Y.; TAN, X.; DU, Y.; WEI, Y.; LIU, S. Extracellular vesicle-mediated pre-metastatic niche formation via altering host microenvironments. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 15, p. 1367373, fev. 2024.

LIMA, MARIA JULIA TÔRRES; JANUZZI, LUIZA LOPES RICARDO; GAMEIRO, JACY. Plasma-derived extracellular vesicles as biomarkers and modulators in human disease. **Bratislava Medical Journal**, Bratislava, 2025.

LOPES, R. et al. Multiple myeloma-derived extracellular vesicles modulate the bone marrow immune microenvironment. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 13, p. 909880, jun. 2022.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 25, n. 12, p. 677-686, dez. 2004.

MARAR, C.; STARICH, B.; WIRTZ, D. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. **Nature Immunology**, London, v. 22, n. 5, p. 560-570, maio 2021.

MIR, B.; GOETTSCHE, C. Extracellular vesicles as delivery vehicles of specific cellular cargo. **Cells**, Basel, v. 9, n. 7, p. 1601, jul. 2020.

MURALIDHARAN-CHARI, V.; CLANCY, J. W.; SEDGWICK, A.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 123, n. 10, p. 1603-1611, maio 2010.

MURRAY, P. J. Macrophage polarization. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 79, p. 541-566, fev. 2017.

OTTO, C. M.; BAUMGARDNER, J. E. Effect of culture PO₂ on macrophage (RAW 264.7) nitric oxide production. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, Bethesda, v. 280, n. 2, p. C280-C287, fev. 2001.

PEINADO, H. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature Medicine**, New York, v. 18, n. 6, p. 883-891, jun. 2012.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, London, v. 406, n. 6797, p. 747-752, ago. 2000.

PAN, Y.; YU, Y.; WANG, X.; ZHANG, T. Tumor-associated macrophages in tumor immunity. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 11, p. 583084, nov. 2020.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 200, n. 4, p. 373-383, fev. 2013.

REED, T.; SCHOREY, J.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Tumor-derived extracellular vesicles: a means of co-opting macrophage polarization in the tumor microenvironment. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 9, p. 746432, out. 2021.

RUIZ-BACA, E.; PÉREZ-TORRES, A.; ROMO-LOZANO, Y.; CERVANTES-GARCÍA, D.; ALBA-FIERRO, C. A.; VENTURA-JUÁREZ, J.; TORRIELLO, C. The role of macrophages in the host's defense against *Sporothrix schenckii*. **Pathogens**, Basel, v. 10, n. 7, p. 905, jul. 2021.

SAINT-POL, J.; CULOT, M. Minimum information for studies of extracellular vesicles (MISEV) as toolbox for rigorous, reproducible and homogeneous studies on extracellular vesicles. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 106, p. 106049, jan. 2025.

SAVAS, P.; LOI, S. Metastatic breast cancer: TIL it is too late. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 526-528, fev. 2020.

SEDGWICK, A. E.; D'SOUZA-SCHOREY, C. The biology of extracellular microvesicles. **Traffic**, Copenhagen, v. 19, n. 5, p. 319-327, maio 2018.

SERGAZY, S.; SEYDAHMETOVA, R.; GULYAYEV, A.; SHULGAU, Z.; ALJOFAN, M. The role of exosomes in cancer progression and therapy. **Biology**, Basel, v. 14, n. 1, p. 27, jan. 2025.

SHEEHAN, C.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Tumor-derived extracellular vesicles: molecular parcels that enable regulation of the immune response in cancer. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 132, n. 20, p. jcs235085, out. 2019.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 122, n. 3, p. 787-795, mar. 2012.

SINDRILARU, A.; PETERS, T.; WIESCHALKA, S.; BAICAN, C.; BAICAN, A.; PETER, H.; HAINZL, A.; SCHATZ, S.; QI, Y.; SCHLECHT, A.; WEISS, J. M.; WLASCHEK, M.; SUNDERKÖTTER, C.; SCHARFFETTER-KOCHANKE, K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 121, n. 3, p. 985-997, mar. 2011.

STAHL, P.; RAPOSO, G.; D'SOUZA-SCHOREY, C.; SCHOREY, J. S. Regulation and mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and secretion. **Essays in Biochemistry**, London, v. 62, n. 2, p. 125-133, maio 2018.

STEVENS, K. N.; VACHON, C. M.; COUCH, F. J. Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 73, n. 7, p. 2025-2030, abr. 2013.

STRIZOVA, Z.; BENESOVA, I.; BARTOLINI, R.; NOVYSEDLAK, R.; CECRDLOVA, E.; FOLEY, L. K.; STRIZ, I. M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? **Clinical Science**, London, v. 137, n. 15, p. 1067-1093, ago. 2023.

SUSEK, K. H.; KARVOUNI, M.; ALICI, E.; LUNDQVIST, A. The role of CXC chemokine receptors 1–4 on immune cells in the tumor microenvironment. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, p. 2159, set. 2018.

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

TKACH, M.; THALMENSI, J.; TIMPERI, E.; GUEGUEN, P.; NÉVO, N.; GRISARD, E.; SIRVEN, P.; COCOZZA, F.; GOURONNEC, A.; MARTIN-JAULAR, L.; JOUVE, M.; DELISLE, F.; MANEL, N.; ROOKHUIZEN, D. C.; GUERIN, C. L.; SOUMELIS, V.; ROMANO, E.; SEGURA, E.; THÉRY, C. Extracellular vesicles from triple negative breast cancer promote pro-inflammatory macrophages associated with better clinical outcome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 119, n. 17, p. e2107394119, abr. 2022.

TRICARICO, C.; CLANCY, J.; D'SOUZA-SCHOREY, C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. **Small GTPases**, Austin, v. 8, n. 4, p. 220-232, out./dez. 2017.

VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 19, n. 4, p. 213-228, abr. 2018.

VERRECK, F. A. W.; DE BOER, T.; LANGENBERG, D. M. L.; HOEVE, M. A.; KRAMER, M.; VAISBERG, E.; KASTELEIN, R.; KOLK, A.; DE WAAL-MALEFYT, R.; OTTENHOFF, T. H. M. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 101, n. 13, p. 4560-4565, mar. 2004.

WANG, N.; LIANG, H.; ZHEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 5, p. 614, nov. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Breast cancer*. Geneva: World Health Organization, 2026. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.

WORTZEL, I.; DROR, S.; KENIFIC, C. M.; LYDEN, D. Exosome-mediated metastasis: communication from a distance. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 49, n. 3, p. 347-360, maio 2019.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 445-455, abr. 2013.

XIAO, M.; ZHANG, J.; CHEN, W.; CHEN, W. M1-like tumor-associated macrophages activated by exosome-transferred THBS1 promote malignant migration in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 37, p. 143, jul. 2018.

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

YEUNG, O. W.; LO, C. M.; LING, C. C.; QI, X.; GENG, W.; LI, C. X.; NG, K. T.; FORBES, S. J.; GUAN, X. Y.; POON, R. T.; FAN, S. T.; MAN, K. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, Amsterdam