

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**FERNANDA TURAÇA**

**AVALIAR O EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO NA  
PROGRESSÃO TUMORAL: AÇÃO SOBRE A RESPOSTA IMUNE E  
PROLIFERAÇÃO TUMORAL**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2021**

FERNANDA TURAÇA

**AVALIAR O EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO NA  
PROGRESSÃO TUMORAL: AÇÃO SOBRE A RESPOSTA IMUNE E  
PROLIFERAÇÃO TUMORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso à  
apresentado ao Curso de Ciências  
Biomédicas da Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
como requisito à obtenção de título de  
bacharel em Ciências Biomédicas com Ênfase  
em Ciências Básicas da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz  
Cunha

Coorientadores: Carlos Wargner de Souza  
Wanderly e Paula Barbim Donate Yabuta

RIBEIRÃO PRETO

2021

## FERNANDA TURAÇA

Trabalho de Conclusão de Curso à apresentado ao Curso de Ciências Biomédicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito à obtenção de título de bacharel em Ciências Biomédicas com Ênfase em Ciências Básicas da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Coorientadores: Carlos Wargner de Souza Wanderly e Paula Barbim Donate Yabuta

"Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte."

"A inclusão deste trabalho foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 57ª Sessão Ordinária, realizada em 04/10/2021".

## BANCA EXAMINADORA

*Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha (Orientador)*  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

*Prof. Dr.(a). Enilza Maria Espreafico (Presidente da Banca examinadora)*  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

*Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida (Banca examinadora)*  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

*Dr.(a). Luciana Benevides (Banca examinadora)*  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Ribeirão Preto

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus pais José Orlando e Bernadete por tudo suporte emocional e financeiro

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família: meu irmão (Orlando), minha tia Raquel, minha vó Maria Emília, meus tios, minha tia Eloísa, Lucina, aos meus primos pelas aventuras. Amo muito vocês

Aos meus amigos de infância: João Victor, Rodrigo, Déborah, Ester, Michele, Fabiano, Damianne, Fernando, Bruna, Lorena, Maísa, Geovanne, Giroldo. Obrigada pelas aventuras

Aos meus colegas da C. B das turmas :1,2,3,4.

Aos meus amigos de graduação: Felipe, Mariana, Alef, Carol, Grazi, Stéphanie.

Aos membros da banca pela disponibilidade

Aos membros COC do curso de Ciências Biomédicas por todo suporte

Ao grupo FQC em especial à Paula e o Wagner .....pela paciência e por todos os ensinamentos. Agradeço muito o Professor Fernando por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório. Agradeço também os membros do grupo FQC.

Ao Professor Fausto Bruno dos Reis Almeida

Aos alunos e aos técnicos do Laboratório de Inflamação e Dor

À todos os funcionários da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Ao Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID), ao CNPq e à Fapesp, Programa de Bolsas Unificados da Universidade de São Paulo, Centro de Apoio Educacional e Psicológico.

“Todos os nossos sonhos podem se tornar realidade se tivermos coragem de  
perseguir-los “- Walt Disney

## RESUMO

No câncer, o escape da resposta imune é essencial para a progressão dos tumores. A imunomodulação no microambiente tumoral envolve o contato célula-célula, a liberação de mediadores solúveis, como as citocinas e a participação de vesículas extracelulares (VEs). A liberação de VEs é um mecanismo de comunicação celular conservado. A habilidade dessas nanopartículas em transferir seu conteúdo para células alvo estabelece uma rede de comunicação que resulta em uma reprogramação celular capaz de modular o microambiente tumoral. É bem conhecido que o tabagismo desempenha um papel chave na indução de mutações que levam células a transformação neoplásica maligna. No entanto, sabe-se que o tabagismo também é um potente modificador do sistema imune, influenciando a função e ativação de diferentes subtipos celulares e a produção de mediadores inflamatórios. Neste contexto, considerando que o efeito imunomodulador do tabagismo no microambiente tumoral e sua importância na progressão dos tumores ainda não é completamente conhecida o presente projeto foi desenvolvido com o objetivo de investigar os efeitos da exposição à fumaça do cigarro na liberação de VEs pelas células tumorais e suas funções imunomodulatórias na fase de progressão do câncer. Utilizando o modelo experimental de melanoma murino (linhagem B16), após o aparecimento de tumores palpáveis, os animais foram expostos ou não à fumaça do cigarro por 7 dias. Observamos que o grupo exposto à

fumaça do cigarro apresentou um maior crescimento tumoral em relação aos animais que não foram expostos. Para investigar os mecanismos envolvidos com o aumento da progressão tumoral, as células tumorais B16 foram cultivadas *in vitro* na presença ou ausência de um meio de cultura enriquecido com componentes da fumaça do cigarro, descrito como CSEM (*Cigarette Smoke Enriched Medium*), por 48 horas. A adição desse meio nas células B16 resultou em um aumento na expressão e ativação do receptor de hidrocarboneto arila (AHR), um importante sensor intracelular de poluentes como os presentes na fumaça do cigarro. Por citometria de fluxo observamos também o aumento do ligante do receptor de morte programada 1 (PD-L1), um importante marcador envolvido na supressão da resposta imune. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para obtenção das vesículas através de ultracentrifugação. O tamanho e quantidade das VEs foram determinados e a presença dos marcadores CD63 e da proteína Argonauta 2 foram avaliados por Western Blot. Observamos que a presença do CSEM não influenciou a quantidade de vesículas liberadas pelas células B16, bem como o tamanho delas. Além da caracterização, investigamos também o efeito da exposição à fumaça de cigarro no conteúdo e nas funções dessas vesículas. Neste sentido, nossos dados demonstram que a exposição a componentes da fumaça do cigarro foi capaz de aumentar a expressão dos microRNAs, miR-16, miR-320a e miR-210 liberados pelas células tumorais B16. Além disso, as vesículas liberadas por essas células foram capazes de alterar a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> do perfil Th9, conhecidas por sua função antitumoral, para um perfil regulador (T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>). Esse aumento foi ainda mais significativo na presença de vesículas liberadas por células cultivadas com meio CSEM. Acreditamos que essa função seja mediada em parte pela ação de microRNAs, como o miR-16, contidos no interior dessas vesículas. Este microRNA é reconhecido por controlar a expressão de IL-9 quando expresso em células Th9. Assim, no presente estudo demonstramos que a exposição de células de melanoma à fumaça do cigarro aumenta a expressão de PD-L1 e modula a expressão de microRNAs nas vesículas extracelulares liberadas por essas células, podendo favorecer o crescimento tumoral. Em conjunto, nossos dados sugerem que o hábito



de fumar pode promover a progressão tumoral, através da exacerbação do escape da resposta imune.

## ABSTRACT

In cancer, the escape of immune response is essential for tumor progression. Immunomodulation in the tumor microenvironment involves cell-cell contact, the release of soluble mediators such as cytokines and the participation of extracellular vesicles (EVs). The release of EVs is a conserved cellular communication mechanism. The ability of these nanoparticles to transfer their content to target cells establishes a communication network that results in cellular reprogramming capable of modulating the tumor microenvironment. It is well known that smoking plays a key role in inducing mutations that lead cells to malignant neoplastic transformation. Additionally, smoking is also described as a potent modifier of the immune response, influencing the function and activation of different cell subtypes and the production of inflammatory mediators. In this context, considering that the immunomodulatory effect of smoking in the tumor microenvironment and its importance in the progression of tumors is not yet fully known, this project was developed with the aim of investigating the effects of exposure to cigarette smoke on the release of EVs by tumor cells and its immunomodulatory functions in the stage of cancer progression. Using the experimental model of murine melanoma (B16 strain), after the appearance of palpable tumors, the animals were exposed or not to cigarette smoke for 7 days. We observed that the group exposed to cigarette smoke showed greater tumor growth compared to animals that were not exposed. To investigate the mechanisms involved with increased tumor progression, B16 tumor cells were cultured in vitro in the presence or absence of a Cigarette Smoke Enriched Medium (CSEM), for 48 hours. The addition of CSEM in B16 cell culture resulted in a significant increase in the expression and activation of the aryl hydrocarbon receptor (AHR), an important intracellular sensor for pollutants such as those present in cigarette smoke. By flow cytometry we also observed an increase in the programmed death receptor ligand 1 (PD-L1), an important marker involved in the suppression of the immune response. Culture supernatants were also collected to obtain EVs through ultracentrifugation. The size and quantity of EVs were determined and the presence of CD63 markers and Argonauta 2 protein were evaluated by Western Blot. We observed that in the presence of CSEM the amount of EVs released by B16 cells,

as well as their size, were not altered. In addition, we also investigated the effect of exposure to cigarette smoke on the content and functions of these EVs. In this sense, our data demonstrate that exposure to cigarette smoke components was able to increase the expression of microRNAs, miR-16, miR-320a and miR-210 released by B16 tumor cells. Furthermore, the EVs released by these cells were able to affect the differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells from a Th9 profile, known for its antitumor function, to a regulatory profile (T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>). This increase was even more significant in the presence of EVs released by cells cultivated with CSEM. We believe that this function is mediated in part by the action of microRNAs, such as miR-16, released into the EVs. This microRNA is recognized for controlling the expression of IL-9 when expressed in Th9 cells. Thus, in the present study, we demonstrate that exposure of melanoma cells to cigarette smoke components increases the expression of PD-L1 and modulates the expression of microRNAs in the EVs released by these cells, which may favor tumor growth. Taken together, our data suggest that smoking can promote tumor progression by exacerbating immune response escape.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ago2 – Proteína Argonauta 2

AUC - *Area under the curve* (área sob a curva)

AhR- *Ary hydrocarbon receptor*

cDNA - Fita de DNA complementar

CSEM - *Cigarette Smoke Enriched Medium*

Cyp1a1– *Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1*

FoXP3 - *Forkhead box P3*

Gapdh - *glyceraldehyde – 3 phosphate dehydrogenase*

IL-9 - Interleucina 9

IL-4 – Interleucina 4

NTA - *Nano Tracking Analysis*

miRNA – microRNA

PDL1 - Programmed cell death ligand 1

RT-qPCR - PCR de Transcrição Reversa Quantitativa

SOCS5 *supressor of cytokine signaling 5*

TEM - *Tumor Microenvironment*

Tregs – Células T - reguladoras

TP53 - *tumor protein p53*

VEs – Vesículas extracelulares

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** "As marcas registradas do câncer" .....15

**Figura 2.** "Esquema ilustrativo da contribuição das Vesículas extracelulares e seu conteúdo na progressão tumoral .....16

**Figura 3.** Exposição à fumaça do cigarro promove aumento do crescimento tumoral.....29

**Figura 4.** Exposição a componentes da fumaça do cigarro promove aumento da expressão de PD-L1 em células B16 .....30

**Figura 5.** Caracterização das Vesículas Extracelulares liberadas pelas células B16.....33

**Figura 6.** Exposição à fumaça do cigarro modula a expressão de microRNAs liberados pelas células tumorais B16.....35

**Figura 7.** Efeito das vesículas extracelulares liberadas pelas células tumorais B16 na plasticidade de células T CD4+.....37

**Figura 8.** A exposição de células B16 ao meio enriquecido com a fumaça do cigarro aumenta a expressão de Ahr e Cyp1a1.....39

**Figura 9.** Exposição à fumaça do cigarro promove crescimento de tumor de mama 4T1.....40

**Fig.10.** Exposição à fumaça do cigarro promove a progressão tumoral .....44

## SUMÁRIO

1 Introdução	15
1.1 Câncer aspectos gerais	15
1.2 Vesículas Extracelulares	17
1.3 Tabagismo e câncer	18
1.4 Hipótese	19
2.0 Objetivos	20
2.1 Objetivos específicos	20
3. Materiais e métodos	20
3.1 Indução do modelo experimental murino	20

3.2 Modelo experimental de exposição à fumaça do cigarro	21
3.3 Isolamento das EVs	22
3.4 Extração de RNA	23
3.5 Análise de PCR em tempo real	25
3.6 Diferenciação de células Th9	26
3.7 Análise de citometria de fluxo	26
3.8 Análise Estatística	27
4. RESULTADOS	28
4.1 A exposição à fumaça do cigarro acelera o crescimento do melanoma B16.	28
4.2 A exposição a componentes da fumaça do cigarro aumenta a expressão de PD-L1 nas células de melanoma B16	30
4.3 A exposição à fumaça do cigarro não altera o tamanho e concentração de vesículas liberadas por células B16	31
4.4 Exposição à componentes da fumaça do cigarro modula a expressão de microRNAs intra e extracelulares em células de melanoma B16	34
4.5 Vesículas extracelulares liberadas pelas células B16 expostas a componentes da fumaça do cigarro regulam a diferenciação de células Th9	36
4.6 A exposição à fumaça do cigarro aumenta a expressão e ativação do receptor AhR	38
4.7 A exposição à fumaça do cigarro acelera o crescimento do câncer de mama murino	39
5. Discussão	40
6. Conclusão	44
7. Referências	45

## **1 Introdução**

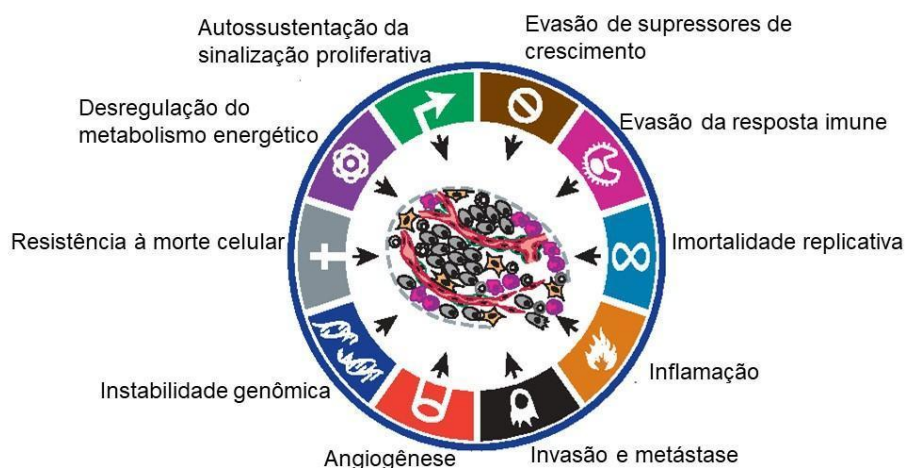
### **1.1 Câncer aspectos gerais**

O câncer é responsável por cerca de 8 milhões de mortes por ano e até 2030 estima-se que ocorra uma expansão de 50% no número de casos (GLOBOCAM – *global cancer observatory*). Os tumores possuem origens hereditárias e esporádicas.

O câncer hereditário é caracterizado pela presença de mutações em células germinativas (Rahner, N., & Steinke, V., 2008). Os tumores esporádicos são caracterizados pela presença de mutações induzidas por agentes carcinógenos. Esses agentes mutagênicos possuem origem biológica, química, física (presença do vírus papiloma humano, do gênero *Papillomavirus*, conhecido como HPV, componentes da fumaça do cigarro – benzopireno, exposição à radiação U.V) (BRÜCHER; JAMALL, 2014).

A exposição à carcinógenos ao longo de décadas promovem mutações e quando acumuladas contribuem para a origem de novas características adquiridas pelas células, conhecidas como as marcas registradas do câncer: (I) autossuficiência em sinais de crescimento, (II) insensibilidade a sinais antiproliferativos, (III) resistência à morte celular, (IV) potencial replicativo ilimitado, (V) atividade pró-angiogênese e (VI) comportamento invasivo e metastático, (VII) alterações no metabolismo energético, (VIII) promoção da inflamação, (IX) escape da resposta imune, (X) instabilidade genômica (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011) (Figura 1).



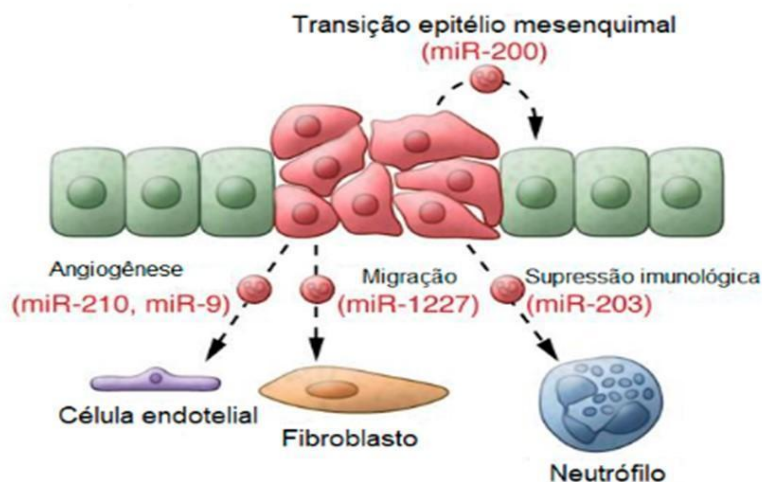


**Figura 1. " As marcas registradas do câncer".** Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

À medida que uma célula adquire as marcas registradas do câncer, ocorre a transformação neoplásica. No entanto, sabe-se que os tumores não são compostos apenas de células neoplásicas e que os cânceres são considerados tecidos complexos compostos por populações heterogêneas de células malignas, fibroblastos, células endoteliais e células imunológicas que coletivamente compõem o microambiente tumoral (TME, do inglês *Tumor Microenvironment*) (HUI; CHEN, 2015). Na última década, tornou-se claro que a interação molecular e celular heterotípica entre o tumor e as células circundantes no TME molda o escape imunológico e a progressão tumoral. Neste contexto, a comunicação celular no TME é um processo importante. Há diferentes mecanismos de comunicação celular no TME, que podem envolver o contato célula-célula e a liberação de moléculas mediadoras, como as vesículas extracelulares (EVs, do inglês - *extracellular vesicles*).

## 1.2 Vesículas Extracelulares

Dentre os RNAs, é bem conhecido a capacidade das EVs em carregar microRNAs (GIBBINGS et al., 2009). Os microRNAs são pequenos RNAs não codificadores que se ligam, por complementaridade de bases, aos RNAs mensageiros, geralmente na porção 3' não-traduzida (3'UTR) (Bartel et al, 2004). A importância dos microRNAs liberados em EVs no câncer foi demonstrada por exemplo por Alfonse e colaboradores (ALFONSI et al., 2018). Foi observado que EVs liberadas por células tumorais carregam o microRNA miR-9 que possui como alvo a proteína SOCS5 (do inglês *suppressor of cytokine signaling 5*). A regulação desse alvo contribui para a angiogênese e crescimento tumoral. (KOSAKA, N. et al., 2016; ALFONSI et al., 2018)



**Figura 2.” Esquema ilustrativo da contribuição das Vesículas extracelulares e seu conteúdo na progressão tumoral.** Célula vermelha = célula tumoral liberando microRNAs que contribuem: angiogênese – miR-210, miR-9; migração – miR-1227; Supressão imunológica – miR-203. Adaptado. Fonte: Adaptado de KOSAKA, N. et al al 2016

Em outro estudo Yin e colaboradores (YIN et al., 2014) observaram a associação da liberação de EVs tumorais contendo miR-214 e a indução de células T-reguladoras, contribuindo para o escape tumoral. Dessa forma as vesículas possuem um importante papel no TME, e entender fatores que influenciam esse processo de comunicação celular poderá auxiliar no melhor entendimento da biologia dos tumores e identificação de novos alvos terapêuticos.

Dados epidemiológicos têm evidenciado a associação entre os fatores ambientais como radiação ultravioleta (UV), dietas alimentares e tabagismo e o desenvolvimento de câncer (AKTIPIIS et al., 2013). Dentre esses, o tabagismo é descrito como importante agente promotor de câncer não apenas pela sua

capacidade de induzir mutações, mas também por seu potencial efeito imunomodulador. No entanto, estudos acerca dos efeitos específicos do tabagismo no processo de comunicação celular no TME e as consequências para a progressão tumoral não são completamente compreendidas. (GROSSO et al., 2017)

### **1.3 Tabagismo e câncer**

O hábito de fumar foi correlacionado pela primeira vez com o desenvolvimento de neoplasias em meados de 1950, pois foi observado um aumento na incidência de câncer de pulmão na população com histórico tabagista (DOLL et al., 2004). Em 1977 Jayant, K. e colaboradores realizaram uma pesquisa clínica que avaliou o risco relativo do paciente fumante desenvolver neoplasias nas seguintes estruturas: cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, laringe, esôfago (JAYANT et al, 1977). Dessa forma, o tabagismo é considerado um importante fator ambiental para o desenvolvimento dessas neoplasias.

Em pacientes tabagistas, os tumores do trato respiratório e trato digestório alto (boca, faringe e esôfago), possuem uma alta frequência de mutações nos seguintes genes de reparo: proteína que codifica a proteína p53 (TP53), Reparo de DNA associado (do inglês – Breast cancer 2 – BRCA2, atualmente referido como 'DNA repair-associated), Reparo de excisão de bases (do inglês - *base excision repair* – BER) (ALEXANDROV et al., 2016; HALL et al., 2007; PARRY et al., 2017). Dessa maneira, os efeitos do tabagismo não estão limitados a tumores do trato respiratório e digestório superior. Por exemplo, pacientes tabagistas com melanoma apresentam pior prognóstico clínico (RANDOLPH, et al., 2011]). Importante destacar

que o desenvolvimento do melanoma não está ligado diretamente à ação mutagênica do cigarro, o que sugere que a influência no pior desfecho clínico desses pacientes estaria associada a efeitos indiretos do tabagismo.

Foi descrito que componentes da fumaça do cigarro, como a nicotina, possuem importantes funções imunossupressoras promovendo a inibição da ativação de linfócitos T através da ligação à receptores nicotínicos nessas células (ARNSON; SHOENFELD; AMITAL, 2010). Além disso, recentemente foi descrito que a exposição à fumaça do cigarro foi capaz de alterar o perfil de microRNAs presentes em EVs liberadas por células epiteliais brônquio alveolares (HÉLIOT et al., 2017).

Apesar de atualmente o cigarro ser caracterizado como agente mutagênico, ainda são pouco explorados os efeitos imunomoduladores sobre a comunicação celular no TME em tumores que não possuem uma correlação direta com o histórico de exposição ao cigarro (SATO et al., 2020).

#### **1.4 Hipótese**

É bem conhecido que o tabagismo desempenha um papel chave na indução de mutações que levam células à transformação neoplásica maligna. Sabe-se que o tabagismo também é um potente modificador do sistema imune, influenciando a função de células e a produção de mediadores inflamatórios. No entanto, a

influência do tabagismo na comunicação célula/célula e modulação da resposta imune no microambiente tumoral ainda é pouco conhecida. Considerando que as EVs constituem um importante mecanismo de comunicação celular no microambiente tumoral, podendo influenciar o escape imune, nossa hipótese é que a exposição à fumaça do cigarro promove alterações nas EVs liberadas pelas células tumorais, que por sua vez são capazes de contribuir para a progressão tumoral.

## **2.0 Objetivos**

O presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos da exposição à fumaça do cigarro na progressão tumoral e nas EVs liberadas por células tumorais.

### **2.1 Objetivos específicos**

- a. Avaliar a influência da exposição à fumaça do cigarro no crescimento tumoral *in vivo* no modelo experimental de melanoma murino (B16);
- b. Avaliar o efeito da exposição à fumaça do cigarro na expressão de PD-L1, MKi-67 e liberação de EVs por células B16 *in vitro*;
- c. Caracterizar as EVs liberadas pelas células tumorais B16 expostas a componentes presentes na fumaça do cigarro;
- d. Avaliar o efeito da exposição à fumaça de cigarro nas funções imunomoduladoras das EVs liberadas pelas células tumorais B16;

## **3. Materiais e métodos**

### 3.1 Indução do modelo experimental murino

Foram utilizados camundongos machos C57bL/6, de 6 semanas de idade e pesando em torno de 25g, obtidos do Serviço de Biotério PUSP-RP. Foram injetadas  $5 \times 10^4$  células tumorais da linhagem B16, cultivadas na presença ou ausência de CSEM (do inglês - *Cigarette Smoke Enriched Medium*) no subcutâneo dos animais. O crescimento tumoral foi monitorado desde o dia 0 da inoculação até o dia 15 utilizando o paquímetro. Foram realizadas duas medidas do diâmetro tumoral e a estimativa do volume tumoral foi realizada utilizando a seguinte fórmula (diâmetro menor)<sup>2</sup>\*(diâmetro maior) /2.

### 3.2 Modelo experimental de exposição à fumaça do cigarro

O modelo de exposição à fumaça do cigarro é constituído de uma câmara de acrílico, onde os animais são alocados, que recebe fumaça de cigarro (50-100ml/min) e ar comprimido (2,5L/min) para manter uma concentração de monóxido de carbono entre 45-55 ppm no seu interior. Os ciclos de fumaça consistiram em 15 segundos de fumaça ativa de cigarro seguidos por 30 segundos de ar limpo forçado controlado por um temporizador de válvula bidirecional. Para os experimentos *in vivo*, após a indução do modelo experimental de melanoma, os animais foram expostos à fumaça de cigarros comerciais da marca Marlboro (Phillip Morris, 0.8 mg de nicotina e 10 mg de alcatrão por cigarro). Os animais foram expostos a 2 cigarros por dia (4,5 min por cigarro, 5 animais/câmara) durante uma semana começando no dia 7 após a injeção das células B16. Os animais descansaram por pelo menos 3 horas entre um cigarro e outro.

Para os ensaios *in vitro* a fumaça do cigarro foi borbulhada em 10 ml de meio de cultura RPMI (Gibco Roswell) com uma bomba de vácuo mecânica. O extrato foi filtrado através de um filtro de 0,22  $\mu$ m (Millipore) para remover bactérias, em seguida diluímos para um volume final de 400 mL (5 cigarros/L). Este meio enriquecido com componentes da fumaça do cigarro é denominado CSEM (do inglês - *Cigarette Smoke Enriched Medium*). As células da linhagem tumoral B16 foram cultivadas em garrafas de 125cm<sup>2</sup> da BD Falcon em meio RPMI completo (contendo 10% de SFB, 1% de penicilina e estreptomicina, 1% de HEPES, 1% de L-glutamina e 1% de piruvato de sódio). As células foram acondicionadas em estufas nas seguintes condições: 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após quatro passagens e quando as células B16 atingirem uma confluência de 70%, foi adicionado o meio CSEM na concentração de 5 cigarros/L e as células ficaram expostas por 48 horas.

### 3.3 Isolamento das EVs

As células B16 foram cultivadas em garrafas de 125cm<sup>2</sup> da BD Falcon em meio RPMI completo (contendo 10% de SFB, 1% de penicilina e estreptomicina, 1% de HEPES, 1% de L-glutamina e 1% de piruvato de sódio). As células foram acondicionadas em estufas nas seguintes condições: 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após quatro passagens e quando as células B16 atingirem uma confluência de 70%, foi adicionado o meio CSEM na concentração de 5 cigarros/L e as células ficaram expostas por 48 horas. O sobrenadante das culturas foi coletado e centrifugado a 450 x g por 5 minutos para remoção de células. O sobrenadante livre de células passou por centrifugação a 2000 x g por 10 minutos e posteriormente a 10 000 x g por 30



minutos para remoção de células mortas e debris. Após essas etapas de centrifugação o sobrenadante foi coletado e filtrado através de um filtro de 0,22 µm (Millipore) para remoção de partículas contaminantes. Em seguida, as EVs foram isoladas através de ultracentrifugação à 100.000 x g por 2 hora para separação das EVs. Todas as culturas foram realizadas utilizando-se soro bovino fetal depletado de vesículas (exosomes - depleted fetal bovine serum - Thermo Fisher Scientific).

(THÉRY et al,2006)

As EVs também foram caracterizadas pela expressão das proteínas CD63, Ago2 por western blot. Após a determinação da quantidade de EVs por NTA, a mesma quantidade de EVs foi utilizada em todos os grupos para as análises. As proteínas foram isoladas utilizando-se RIPA buffer (Sigma – Aldrich-cod. R0278) e inibidor de protease (Roche 11697498001). Foi realizada uma eletroforese em gel SDS-Page (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) utilizando um sistema vertical de eletroforese (Bio-Rad, USA) durante 1h30, a 110 V, seguida de transferência para uma membrana Amerham Protran Premium 0.2 de nitrocelulose utilizando o sistema transblot. Em seguida, a membrana foi corada com Ponceau para confirmar que as proteínas foram devidamente transferidas.

A próxima etapa foi realizar o bloqueio da membrana utilizando leite 5% (*Nonfat Dry Milk - Cell Signaling*) em TBST por 1 hora para impedir interações inespecíficas. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-Ago2 / eIF2C2 (na diluição 1: 200, Abcam, ab32381), anti-CD63 (H-193, na diluição 1: 200, Santa Cruz Biotechnology, sc-15363), com incubação *overnight* da membrana. Os anticorpos secundários foram utilizados na diluição de 1:3000 também. Após as marcações as

membranas foram lavadas 3x em TBT 1X e a leitura realizada no *software Imagelab* (Versão 6.0.1)

### **3.4 Extração de RNA**

Para a extração do RNA total proveniente das células da linhagem tumoral B16 cultivadas na presença ou ausência do meio CSEM, foi utilizado TRIzol Reagent (Qiagen Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. As preparações de RNA foram selecionadas quanto à pureza e concentração em um espectrofotômetro Nanodrp (Thermo, Scientific, Waltham, MA, EUA).

Para as análises de expressão dos microRNAs provenientes das EVs, o RNA total foi isolado usando o Kit de isolamento mirVana total (Ambion, NY, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Em cada amostra foram adicionados 300 µl de solução de lise agitando-se vigorosamente. Em seguida, adicionou-se 30 µl de miRNA Homogenate Additive, e após agitação por 15 segundos, as amostras ficaram em gelo picado por 10 minutos.

O passo seguinte incluiu a adição de 300 µl de fenol: clorofórmio ácido e agitação vigorosa no vórtex por 60 segundos. O lisado foi então centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente para a formação de uma fase aquosa contendo os RNAs em solução. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 1,25x do volume recuperado, de etanol 100% a temperatura ambiente.

Para cada amostra foi utilizada uma coluna em um tubo coletor no qual 700 µl da mistura lisado/etanol foram pipetados na coluna e centrifugados por 15 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e o procedimento repetido até que toda a mistura fosse filtrada. Em seguida, aplicou-se 700 µl de miRNA Wash Solution 1 a coluna e centrifugou-se por 10 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e 500 µl de miRNA Wash Solution 2/3 foram aplicados a coluna e centrifugados por 10 segundos a 10.000 x g. Repetiu-se o último passo, e após descartar o líquido, centrifugou-se 1 minuto para remover resíduos líquidos no filtro. A coluna foi transferida para um tubo novo coletor, e a ela foram adicionados 40 µl de água DEPC pré-aquecida (95°C). Centrifugou-se 30 segundos para eluição do RNA o qual foi então conservado a – 80°C.

### 3.5 Análise de PCR em tempo real

Para a detecção dos microRNAs provenientes da EVs, as reações de transcrição reversa foram realizadas usando o Kit *Taqman advanced MicroRNA cDNA synthesis kit* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Ensaios de microRNAs Taqman: miR-181a – 5p; miR- 125a-3p (477883); miR-16(477860); 125a-3p (477883); miR-16-5p (477860); miR-361 (478056); miR-320a-3p (478594); miR-190a-5p (478358). Os dados foram normalizados para valores de controle interno: miR-191-5p (477952); miR-30a-5p (479448); miR-132 (477900), miR-181c (477934); miR210 (477970).

Para a análise da expressão gênica, a síntese de cDNA (100ng de RNA total) foi realizada utilizando o kit de transcrição reversa High-Capacity (Invitrogen Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). Em seguida as amostras de cDNA foram

submetidas ao RT-PCR, utilizando o SyGreen Mix Lo-ROX (PCR Biosystems, London, UK) ou *Taqman Gene Expression Master Mix* no equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System, em placas de 96 poços. Todos os dados foram normalizados para valores de Gapdh, e o método do ciclo de limiar comparativo foi usado para determinar os níveis de expressão relativa.

Por meio de PCR quantitativo avaliamos a expressão dos genes: Ahr, Cyp1a1, Gapdh. As sequências dos primers estão descritas na Tabela 1

Os Ahr e Cyp1a1 foram avaliados através de ensaio Taqman. AhR (Mm00478932\_m1), Cyp1a1 (Mm00487218\_m1)

**Tabela 1. Lista de *primers*.**

Gene	Foward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
Gaph	GTGGTTCACCCCATCACAA	AGGAGCGAGACCCCACTAAC
CD274	GCATTATATTCACAGCCTGC	CCCTTCAAAAGCTGGTCCTT

### 3.6 Diferenciação de células Th9

Para o ensaio de diferenciação de células para o perfil Th9, células T CD4<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> (naives) foram isoladas do baço e linfonodos drenantes de camundongos C57BL/6 utilizando-se BD FACSAria III Cell Sorter. Foi utilizada a quantidade de 1x10<sup>5</sup> células/ poço, em placa de 96 poços (Costar), para diferenciação *in vitro* das células para o perfil Th9. As células foram cultivadas em meio IMDM completo nas seguintes condições experimentais: meio, EVs de B16, EVs de B16 + CSEM por um período de 72 horas. Concomitante a presença de anti-CD3 (2ug/ml) e anti-CD28 (2ug/ml) foram adicionados IL-4 (10ng/ml) e TGF-β (1

ng/ml). No primeiro dia de cultura foram adicionadas ou não EVs provenientes das linhagens de células tumorais cultivadas ou não na presença do meio CSEM.

### **3.7 Análise de citometria de fluxo**

As células da linhagem tumoral B16 foram cultivadas por um período de 48 horas na presença ou ausência de CSEM. Células foram retiradas do meio e contadas. Após esse período 250.000 células foram incubadas em 100 µL de tampão de FACs contendo os seguintes anticorpos de superfície: anti-PD-L1-APC (BD. Biosciences , 1:300) e LIVE/DEAD – BV421 (Termo Fisher Scientific, 1:1000), durante 15 minutos a 4°C. Para a detecção de Ki-67, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando-se o kit, seguindo as recomendações do fabricante. Para a marcação intracelular foi utilizado o anticorpo anti-Ki-67-PECy7 ((BD. Biosciences, 1:300).

Para a marcação das células Th9, as células foram previamente estimuladas por 4 h com PMA (formol 12-miristato 13-aceato, 50 ng / ml, Sigma-Aldrich), ionomicina (500 ng / ml, Sigma-Aldrich) e um inibidor de transporte de proteína contendo Brefeldina (1,5 uL / mL GolgiPlug, BD Bosnienses) antes da detecção com anticorpos. Os marcadores de superfície foram marcados por 10 min em temperatura ambiente, as células foram fixadas Cytoperm / Cytofix (BD Bosnienses),

permeabilizados com Perm / Wash Buffer (BD Biosciences) e marcadas com anticorpos intracelulares diluídos em Perm / tampão de lavagem. Os dados foram coletados com um FACSVerse™ (BD Biosciences) e, em seguida, analisados com o software FlowJo 10.0.7 (Treestar). As células foram marcadas com os seguintes anticorpos: anti-CD4 conjugado com FITC (BD Pharmingen, Clone: RM4-5, 1:300), anti-IL9 PE (BD Horizon, 1:200), anti-Foxp3 APC (1:200), LIVE/DEAD – BV421 (Termo Fisher Scientific, 1:1000)

### **3.8 Análise Estatística**

O software GraphPad Prism v8.0 foi usado para realizar todas as análises estatísticas. Todos os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM e são representativos de 2-3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste t Student para comparar dois diferentes grupos, ou área sob a curva seguida por teste t Student (Figuras 3,8). Valores com  $p < 0.05$  foram considerados significativos.

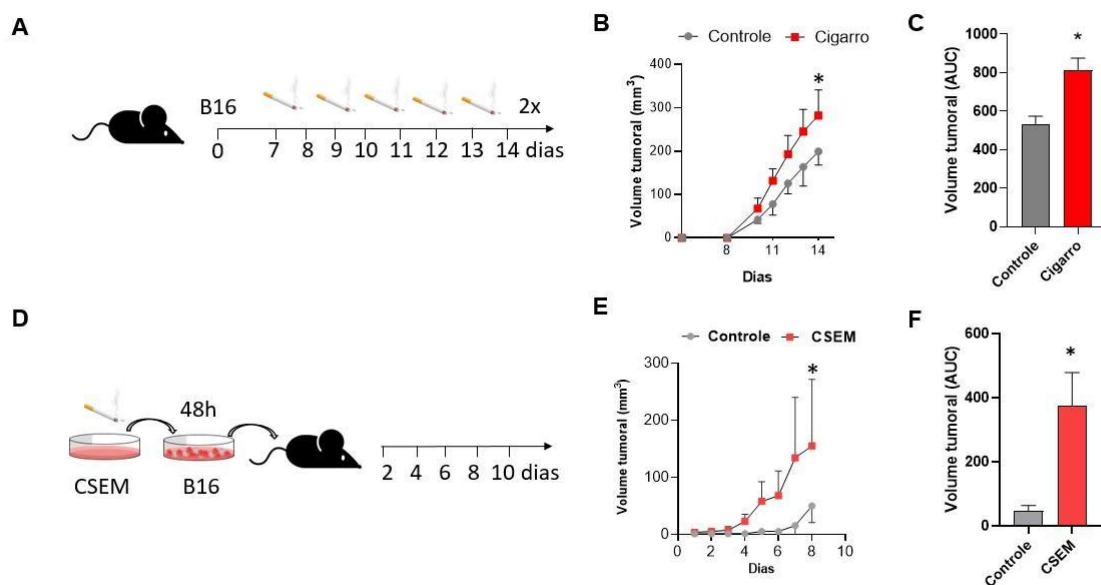
## **4. RESULTADOS**

### **4.1 A exposição à fumaça do cigarro acelera o crescimento do melanoma B16.**

Com a finalidade de avaliar o efeito da exposição à fumaça do cigarro na progressão tumoral foram utilizadas duas abordagens experimentais. Primeiro, 500 mil células de melanoma B16 foram injetados em camundongos da linhagem C57BL/6 e sete dias após a injeção quando ocorre o aparecimento de tumores palpáveis, uma parte dos animais foram expostos à fumaça de cigarro de acordo com o protocolo representado na **figura 3 A**. A exposição dos animais à fumaça foi realizada utilizando uma bomba que força a liberação da fumaça no interior de uma câmara onde os animais são alocados. Ciclos intermitentes de ar do ambiente e fumaça de cigarro foram realizados para mimetizar os ciclos de sopro de tabagistas e para evitar asfixia induzida por CO<sub>2</sub>. Nestes ciclos, os animais são expostos à fumaça do cigarro por 15 segundos seguidos de 30 segundos de ar do ambiente dentro câmara controlado por uma bomba mecânica. Como observado na **figura 3 B e C**, a exposição dos animais à fumaça do cigarro resultou em aumento significativo no crescimento tumoral, em relação aos animais controle.

Considerando os efeitos observados pela fumaça do cigarro no modelo experimental de melanoma descrito anteriormente, decidimos investigar se a exposição aos componentes do cigarro causa alguma alteração fenotípica nas células B16. Para cumprir com esse objetivo utilizamos um sistema para borbulhar a fumaça do cigarro em um recipiente contendo meio de cultura RPMI. Após o procedimento, este meio enriquecido com a fumaça do cigarro (CSEM) foi filtrado e adicionado às células B16 durante seu cultivo *in vitro*. O CSEM, utilizado a uma concentração de 5 cigarros/L, é adicionado quando as células apresentam uma confluência de 70% na garrafa de cultura. Após 48 horas 1x10<sup>6</sup> células expostas ou não ao CSEM foram injetadas nos animais C57BL/6 para indução do modelo de

melanoma (**Fig. 3 D**). De maneira similar, observamos que os animais que receberam as células expostas ao meio CSEM apresentaram aumento significativo do crescimento tumoral (**Fig. 3 E e F**). Esses resultados sugerem que a exposição à fumaça do cigarro é capaz de promover alterações nas células da linhagem B16 que contribuem para promover o crescimento tumoral.



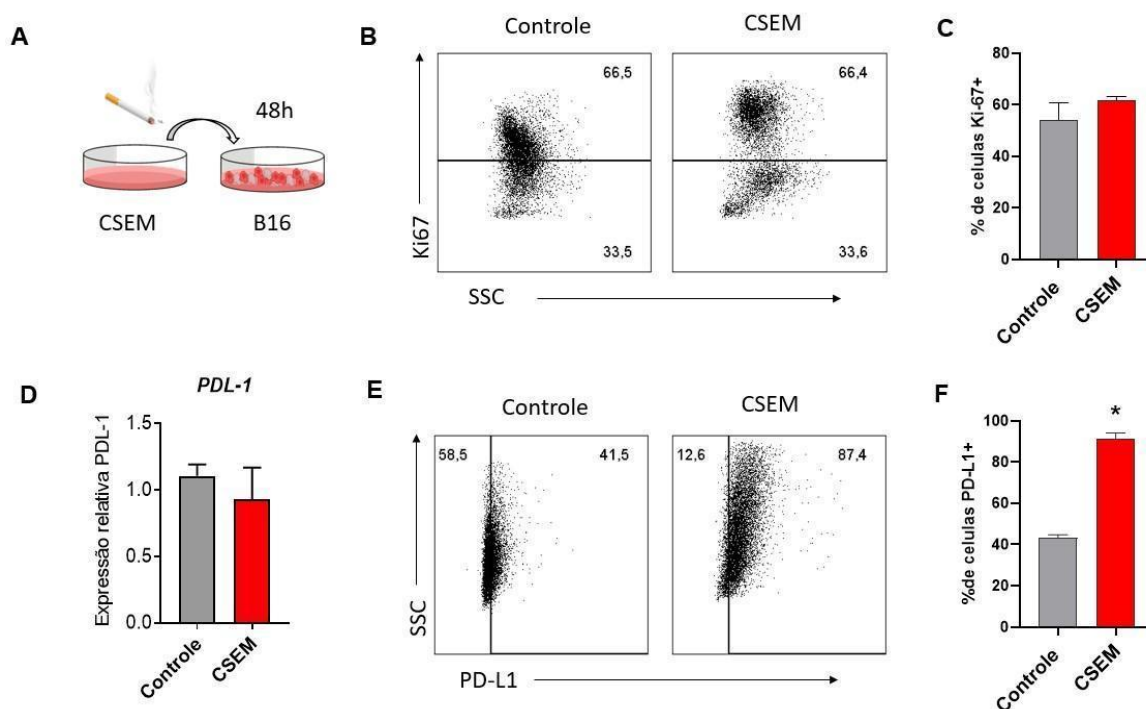
**Figura 3. Exposição à fumaça do cigarro promove aumento do crescimento tumoral.** (A) Esquema ilustrativo do delineamento experimental. Animais C57BL/6 receberam 500 mil células da linhagem B16 pela via subcutânea para indução do modelo experimental de melanoma (n= 5 por grupo experimental). (B) Volume tumoral  $\pm$  SEM por indivíduo. (C) Gráfico da área sob a curva (do inglês - *area under the curve* - AUC). (D) Esquema ilustrativo do delineamento experimental. Células



B16 foram cultivadas em meio enriquecido com a fumaça do cigarro (CSEM) ou RPMI controle por 48 h, em seguida  $1 \times 10^6$  células foram injetadas em animais C57BL/6 pela via subcutânea para indução do modelo experimental de melanoma (n= 5 por grupo experimental). (E) Volume tumoral  $\pm$  SEM por indivíduo. (F) Gráfico da AUC. Os dados são apresentados como média  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.05$  significativo analisado por teste t não pareado.

#### **4.2 A exposição a componentes da fumaça do cigarro aumenta a expressão de PD-L1 nas células de melanoma B16**

A fim de investigar possíveis alterações fenotípicas nas células da linhagem B16 decorrentes da exposição à fumaça do cigarro, nós avaliamos a expressão de proliferação MKi67 (Ki-67) e de imunomodulação (PD-L1) por citometria de fluxo. As células foram cultivadas na presença ou ausência de CSEM seguindo o protocolo descrito na **figura 4 A**. A exposição a componentes da fumaça do cigarro, não foi capaz de alterar a expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 nas células B16 (**Fig. 4 B e C**). Com relação ao PD-L1, uma importante proteína imunossupressora, embora não tenha sido observado alterações na sua expressão gênica no período avaliado (**Fig. 4 D**), foi observado um aumento significativo dos níveis proteicos de PD-L1 nessas células (**Fig. 4 E e F**). Esses achados sugerem que os efeitos da exposição à fumaça do cigarro no crescimento tumoral não estão relacionados às mudanças na capacidade proliferativa das células tumorais, mas sim por meio da regulação da resposta imune mediada pelo PD-L1 e possivelmente por outros fatores.

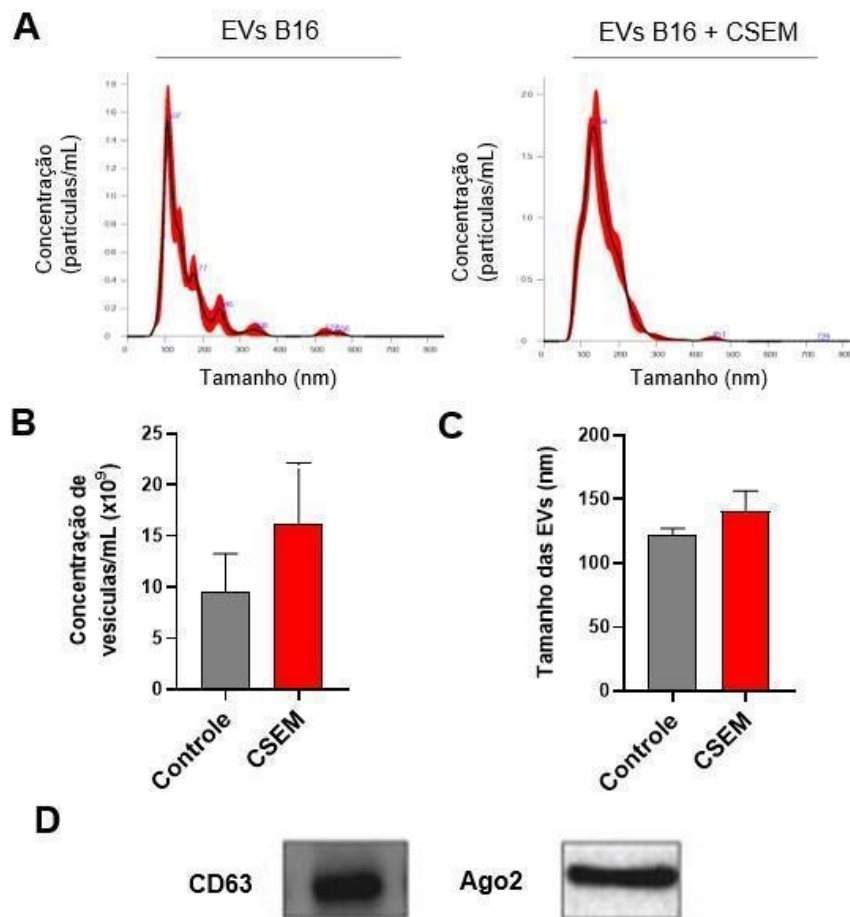


**Figura 4. Exposição a componentes da fumaça do cigarro promove aumento da expressão de PD-L1 em células B16.** (A) Esquema ilustrativo do delineamento experimental. Células B16 foram cultivadas na presença ou ausência do meio enriquecido com a fumaça do cigarro (CSEM) por 48 horas. (B) Painel representativo da marcação de Ki-67 analisado por citometria de fluxo. (C) Percentagem de células Ki-67<sup>+</sup>. (D) Análise da expressão de PD-L1 por RT-PCR. (E) Painel representativo da marcação de PD-L1 analisado por citometria de fluxo. (F) Percentagem de células PD-L1<sup>+</sup>. Os dados são apresentados como média  $\pm$  s.e.m.  $n=3$ /grupo, representativo de 2 experimentos. \* $p < 0.05$  significativo analisado por teste t não pareado.

#### 4.3 A exposição à fumaça do cigarro não altera o tamanho e concentração de vesículas liberadas por células B16

Após avaliarmos as alterações fenotípicas provocadas pela exposição a componentes da fumaça do cigarro nas células B16, investigamos os efeitos dessa

exposição na liberação de vesículas extracelulares. Para cumprir com esse objetivo, o sobrenadante da cultura de células B16 foram cultivadas na presença ou ausência do meio CSEM por um período de 48 horas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a uma velocidade de 2000g por 10 minutos para remoção de células e debris provenientes da cultura. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e filtrado (22 $\mu$ M) para remoção de partículas contaminantes. O sobrenadante passou por um processo de ultracentrifugação a 100,000g para separação das EVs. Ao final das centrifugações as partículas foram coletadas e seguiram para as análises por NTA (do inglês *Nano Tracking Analysis*) e western blot. O NTA é um método realizado no aparelho NanoSight (Malvern) que permite a visualização e análise, em tempo real, de nanopartículas em meio líquido. Baseada em uma técnica de microscopia a laser acoplada a uma câmera de elevada sensibilidade é possível analisar o movimento *Browniano* das nanopartículas. O programa visualiza e analisa cada partícula separadamente, e ao final gera um gráfico de distribuição por tamanho e estima a concentração dessas partículas na amostra de estudo. As análises de NTA demonstram que após o processo de ultracentrifugação as vesículas isoladas do sobrenadante de células B16 apresentam um tamanho de aproximadamente 130 nm. Observamos que os componentes da fumaça do cigarro não foram capazes de influenciar o tamanho, bem como a concentração das EVs liberadas pelas células B16 (**Fig. 5 A-C**). Utilizando a técnica de western blot, observamos que o isolamento das EVs por ultracentrifugação foi efetivo, visto que detectamos a presença do marcador CD63 (**Fig 5 D**). Ainda, observamos também a presença da proteína Argonauta 2 (Ago2), que está associada à função regulatória de microRNAs (**Fig. 5D**).



**Figura 5. Caracterização das Vesículas Extracelulares liberadas pelas células B16.**

Células B16 foram cultivadas *in vitro* até atingir 70% de confluência. Após esta etapa foi adicionado um novo meio de cultura contendo soro fetal (10%) depletado de vesículas por 48 horas na presença ou ausência de meio enriquecido com a fumaça do cigarro (CSEM). Após esse período, o sobrenadante da cultura foi coletado e as vesículas extracelulares (EVs) isoladas a partir de centrifugação seriada seguida por ultracentrifugação. (A) Gráfico representativo de 5 análises de NTA (do inglês *Nano Tracking Analysis*), (B) Concentração e (C) tamanho das EVs liberadas pelas células tumorais B16. (D) Western

blot para as proteínas CD63 e argonauta 2. Os dados são apresentados como média  $\pm$  s.e.m., representativo de 2 experimentos da condição controle.

#### **4.4 Exposição à componentes da fumaça do cigarro modula a expressão de microRNAs intra e extracelulares em células de melanoma B16**

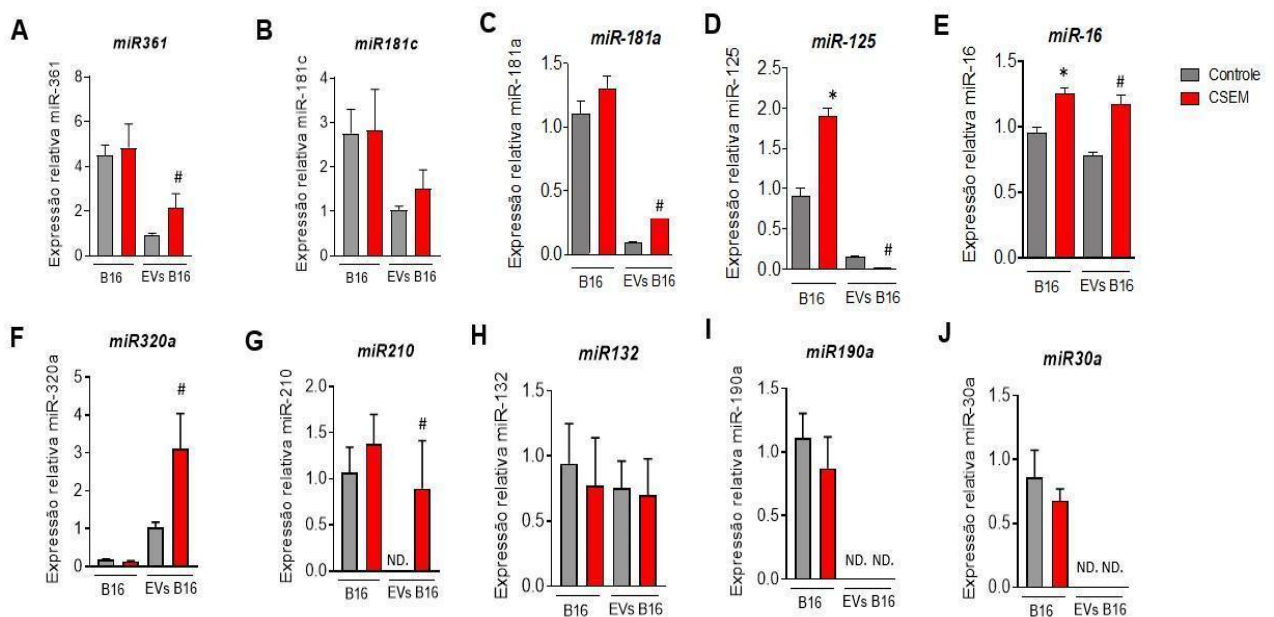
As vesículas são formadas por uma bicamada lipídica que podem conter RNA, lipídios e proteínas. Um trabalho publicado pelo nosso grupo demonstrou que a exposição à fumaça do cigarro é capaz de influenciar a expressão de microRNAs liberados por células Th17 (DONATE et al 2021). Como não observamos nenhuma alteração na concentração e tamanho das VEs liberadas pelas células B16, decidimos investigar se os componentes da fumaça do cigarro eram capazes de influenciar o conteúdo dessas vesículas. Para cumprir com esse objetivo avaliamos a expressão de diversos microRNAs sabidamente envolvidos com modulação da resposta imune e com a progressão tumoral, por PCR tempo real (**Fig. 6**).

Observamos que na presença de componentes da fumaça do cigarro, as células B16 expressam níveis intracelulares aumentados dos microRNAs: miR-125 e miR-16 (**Fig. 6 D e E**). Com relação aos microRNAs extracelulares, observamos um aumento dos microRNAs: miR-16, miR320a e miR-210 quando as células foram cultivadas na presença de CSEM (**Fig. 6 E-G**).

É interessante notar que a exposição à fumaça do cigarro é capaz de aumentar significativamente os níveis intra e extracelulares do miR-16. Esse miR pertence a uma família de microRNAs conservados e foi um dos primeiros microRNAs descritos como supressor tumoral (FINNERTY et al 2010, YUE et al

2010). Entretanto, estudos mais recentes demonstram que ele é capaz de controlar a expressão de IL-9 quando expresso em células Th9, conhecidas por sua função antitumoral (SINGH et al 2016).

Assim, esses resultados demonstram que componentes da fumaça do cigarro são capazes de modular a expressão de microRNAs intra e extracelulares em células da linhagem B16, que por sua vez poderiam influenciar o aumento da progressão tumoral.

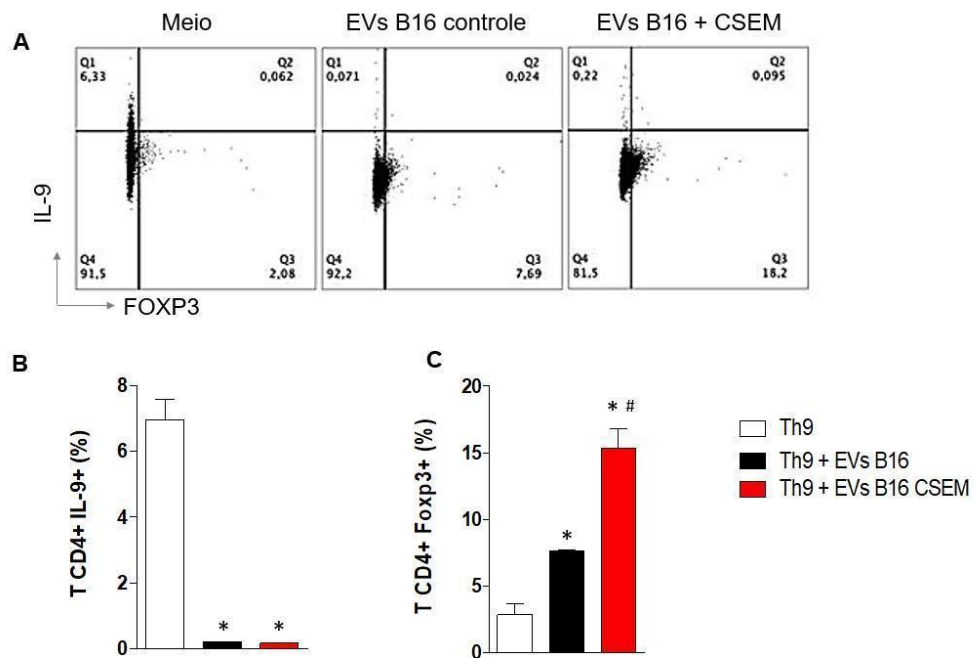


**Figura 6. Exposição à fumaça do cigarro modula a expressão de microRNAs liberados pelas células tumorais B16.** Células B16 foram cultivadas *in vitro* até atingir sua confluência. Após esta etapa foi adicionado um novo meio de cultura contendo soro fetal (10%) depletado de vesículas na presença ou não de meio enriquecido com a fumaça do cigarro (CSEM) por 48 horas. Após esse período o sobrenadante da cultura foi coletado e as vesículas extracelulares (VEs) (vesículas extracelulares) isoladas para extração de RNA total e análise da expressão de

microRNAs por RT-PCR. Os níveis de expressão foram normalizados e quantificados utilizando o miR190. Os dados são apresentados como média  $\pm$  s.e.m., n=3/grupo, representativo de 2 experimentos \* $p < 0.05$ , obtido por teste t não pareado em relação ao grupo B16 controle. # $p < 0.05$  significativo em relação ao grupo VEs controle. ND: não detectado

#### **4.5 Vesículas extracelulares liberadas pelas células B16 expostas a componentes da fumaça do cigarro regulam a diferenciação de células Th9**

Considerando que a exposição a componentes da fumaça do cigarro induziu aumento do miR-16 envolvido no controle das células Th9, decidimos avaliar se as VEs liberadas pelas células B16 seriam capazes de influenciar a diferenciação de células para o perfil Th9. Para cumprir com esse objetivo, células T naive ( $CD4^+ CD44^- CD62L^+$ ) do linfonodo de camundongos C57BL/6 foram isoladas por sorting e polarizadas para o perfil Th9 na presença das citocinas recombinantes TGF- $\beta$  e IL-4 e estimulação com anti-CD3 e anti-CD28. As VEs liberadas pelas células tumorais B16 foram isoladas por ultracentrifugação e adicionadas às culturas de células T polarizadas para o perfil Th9 na concentração de  $5 \times 10^7$  partículas para cada  $10^4$  células T (OKOYE et al 2014). De maneira interessante, após a adição de VEs B16 controle as células deixaram de produzir IL-9 e passaram a expressar o fator de transcrição Foxp3, característico das células T reguladoras (Tregs) (**Fig. 7A-C**). Na presença de EVs liberadas por células B16 cultivadas na presença de CSEM a expressão de Foxp3 foi ainda mais significativa (**Fig. 7 C**).



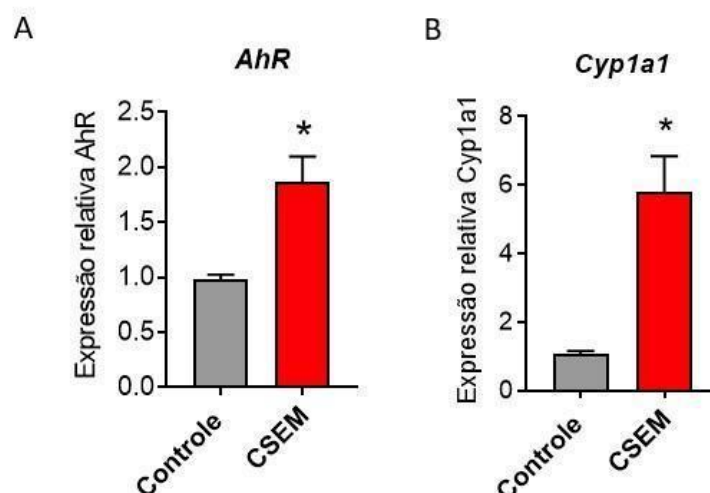
**Figura 7. Efeito das vesículas extracelulares liberadas pelas células tumorais B16 na plasticidade de células T CD4<sup>+</sup>.** Células T naives CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD44<sup>lo</sup> foram isoladas de camundongos C57/BL6 e foram polarizadas para o padrão Th9 por 3 dias na presença de vesículas extracelulares (EVs) provenientes de células da linhagem tumoral B16 cultivadas ou não na presença de meio enriquecido com a fumaça do cigarro (CSEM). Células polarizadas na ausência de EVs foram utilizadas como controle. (A) Painel representativo da diferenciação de células Th9. (B) percentagem de células CD4<sup>+</sup>IL-9<sup>+</sup>. (C) Percentagem de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Os dados são apresentados como média  $\pm$  s.e.m., n=3/grupo, representativo de 2 experimentos. \* $p$ <0.05, obtido por ANOVA seguido por teste de Bonferroni em relação ao grupo Th9 e # $p$ <0.05, obtido por ANOVA seguido por teste de Bonferroni em a Th9 + EVs B16.



#### **4.6 A exposição à fumaça do cigarro aumenta a expressão e ativação do receptor AhR**

A ativação de AhR está envolvida na modulação de microRNAs extracelulares e na expressão de PD-L1 (DONATE et al, 2021; WANG et al, 2019). Na tentativa de desvendar o mecanismo pelo qual a exposição à fumaça do cigarro modula a expressão de microRNAs e promove aumento da progressão tumoral, avaliamos a expressão dos genes *Ahr* e *Cyp1a1* por PCR em tempo real.

Na presença de componentes da fumaça de cigarro observamos um aumento significativo na expressão de ambos os genes (**Fig. 8**). Ressaltamos, que o aumento na expressão de *Cyp1a1* (**Fig. 8 B**), gene do citocromo P450 envolvido com o metabolismo de xenobióticos, indica uma ativação do receptor AhR, o que sugere que este receptor pode estar envolvido com aumento na expressão de PD-L1, de alguns microRNAs (miR-16, miR-125, miR-320a e miR-210) e da progressão tumoral descritos anteriormente. No entanto, mais experimentos serão conduzidos para confirmar essa relação.

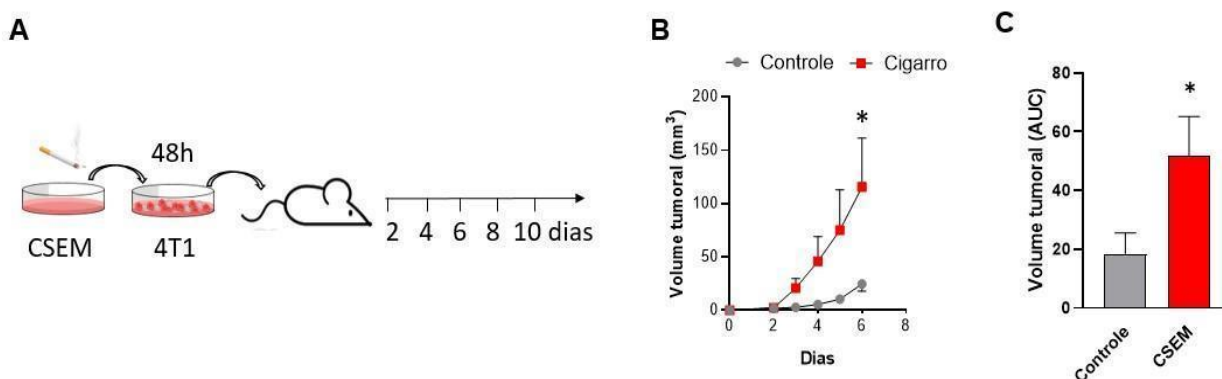


**Figura 8. A exposição de células B16 ao meio enriquecido com a fumaça do cigarro aumenta a expressão de Ahr e Cyp1a1.** (A) Gráfico ilustrativo da expressão relativa de Ahr. (B) Gráfico ilustrativo da expressão relativa de Cy1a1. A expressão gênica foi avaliada em relação ao controle. Os dados são apresentados como média  $\pm$  s.e.m.,  $n=3$ /grupo, representativo de 2 experimentos.  $*p<0.05$ , obtido por teste t não pareado em relação ao grupo B16 controle.

#### **4.7 A exposição à fumaça do cigarro acelera o crescimento do câncer de mama murino**

Os dados descritos até o momento, demonstraram os efeitos da exposição à fumaça do cigarro no modelo de melanoma. A fim de investigarmos se os resultados obtidos não se restringem a esse modelo, utilizamos uma metodologia similar para avaliar os efeitos da fumaça do cigarro em modelo experimental de câncer mama (Fig. 9 A). De maneira interessante, observamos que a prévia exposição de células 4T1 a componentes da fumaça do cigarro foi capaz de promover um aumento significativo do crescimento tumoral também nesse modelo. Esse resultado abre

perspectiva para novos estudos acerca da influência do tabagismo no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer além dos tumores de pulmão e do trato digestório superior já comumente associados.



**Figura 9. Exposição à fumaça do cigarro promove crescimento de tumor de mama 4T1.** (A) Esquema ilustrativo do delineamento experimental. Células de câncer de mama 4T1 foram cultivadas em meio enriquecido com a fumaça do cigarro (CSEM) ou RPMI controle por 48 h, em seguida  $1 \times 10^6$  células foram injetadas em animais BALB/C pela via subcutânea para indução do modelo experimental de câncer de mama ( $n = 5$  por grupo experimental). (B) Volume tumoral  $\pm$  SEM por indivíduo. (C) Gráfico da AUC (do inglês - *area under the curve* - AUC). Os dados são apresentados como média  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.05$  significativo analisado por teste t não pareado.

## 5. Discussão

O tabagismo é bem caracterizado por sua função carcinogênica e mutagênica, pois os compostos encontrados no cigarro possuem alto efeito mutagênico. Sendo assim já é bem descrito que esse hábito está correlacionado com aumento do risco de desenvolver câncer no trato respiratório e digestório

superior (JAYANT et al.,1977). Embora existam relatos descrevendo que tabagistas apresentam maior incidência de câncer de mama e pior prognóstico clínico em casos de melanoma, ainda é pouco explorada a contribuição da exposição ao cigarro na progressão desses cânceres que não são correlacionados diretamente com o tabagismo (LEONARDI et al., 2018; RANDOLPH, 2011). Dessa forma, no presente estudo avaliamos se a exposição à fumaça do cigarro promoveria a progressão tumoral em modelos de melanoma e câncer de mama.

Foi observado que a exposição à fumaça do cigarro promoveu aumento do volume tumoral em ambos os modelos estudados. Além disso, *in vitro* demonstramos que essa exposição resulta no aumento da expressão da proteína PD-L1. O PD-L1 é expresso nas células tumorais e células apresentadoras de antígeno e quando se liga ao receptor de morte programada 1 (PD-1) expresso em linfócitos promove a inativação das funções efetoras antitumorais dessas células (JIANG et al., 2019). Corroborando com nossos achados, Cao e colaboradores (2017) observaram uma correlação positiva entre a expressão de PD-L1 e o tempo de tabagismo em pacientes acometidos pelo carcinoma de pulmão de células não pequenas (do-inglês - *non – small cell lung cancer* – NSCLC) (CAO et al., 2017). Em outro estudo, Stabile e colaboradores (2020) avaliaram em modelo de câncer de pulmão a associação positiva entre a exposição à fumaça do cigarro e aumento da expressão de PD-L1. No entanto, essa associação em outros tipos de câncer como melanoma e câncer de mama ainda é pouco explorada (STABILE et al., 2021).

Por muito tempo o foco dos estudos acerca da relação cigarro/câncer foi centrada no potencial mutagênico e carcinogênico do cigarro (SOBUS; WARREN,

2014). Embora essa abordagem tenha produzido notáveis avanços para o entendimento do processo de transformação maligna de células normais, o efeito do tabagismo sobre as células presentes nos tumores ainda permanece pouco explorado. Sabe-se hoje que os cânceres são tecidos complexos compostos por populações heterogêneas de células neoplásicas, fibroblastos, células endoteliais e imunológicas que coletivamente compõem o TME (BALKWILL; HAGEMANN, 2012). Na última década, tornou-se claro que a interação molecular e celular heterotópica entre o tumor e as células circundantes no TME molda o escape imunológico e a progressão tumoral com destaque para a interação PD-L1/PD1(JIANG et al., 2019). Nesse cenário, a pesquisa e o tratamento do câncer mudaram de um modelo centrado em células cancerígenas para um modelo centrado em TME (HINSHAW; SHEVDE, 2019). Assim, a comunicação celular no TME passou a ser um processo importante para o escape imune e progressão tumoral. Há diferentes mecanismos de comunicação celular no TME, que podem envolver o contato célula-célula e a liberação de moléculas mediadoras como as VEs. No presente estudo nós caracterizamos as VEs liberadas pelas células de melanoma murino B16 quando expostas a componentes da fumaça de cigarro. Embora não tenham sido observadas alterações no tamanho e concentração, foram identificadas mudanças no conteúdo dessas VEs.

As VEs liberadas pelas células são importantes carreadoras de informações que estão associadas a progressão tumoral, como por exemplo, o transporte de microRNAs que contribuem para metástase e imunossupressão (YIN, Y. et al., 2014). Dessa forma, avaliamos a expressão de microRNAs liberados pelas células B16 quando expostas ou não à fumaça do cigarro. De forma interessante

observamos aumento intracelular dos microRNAs miR-125a e miR-16, enquanto nas vesículas houve aumento do miR-16, miR-320a e do miR-210.

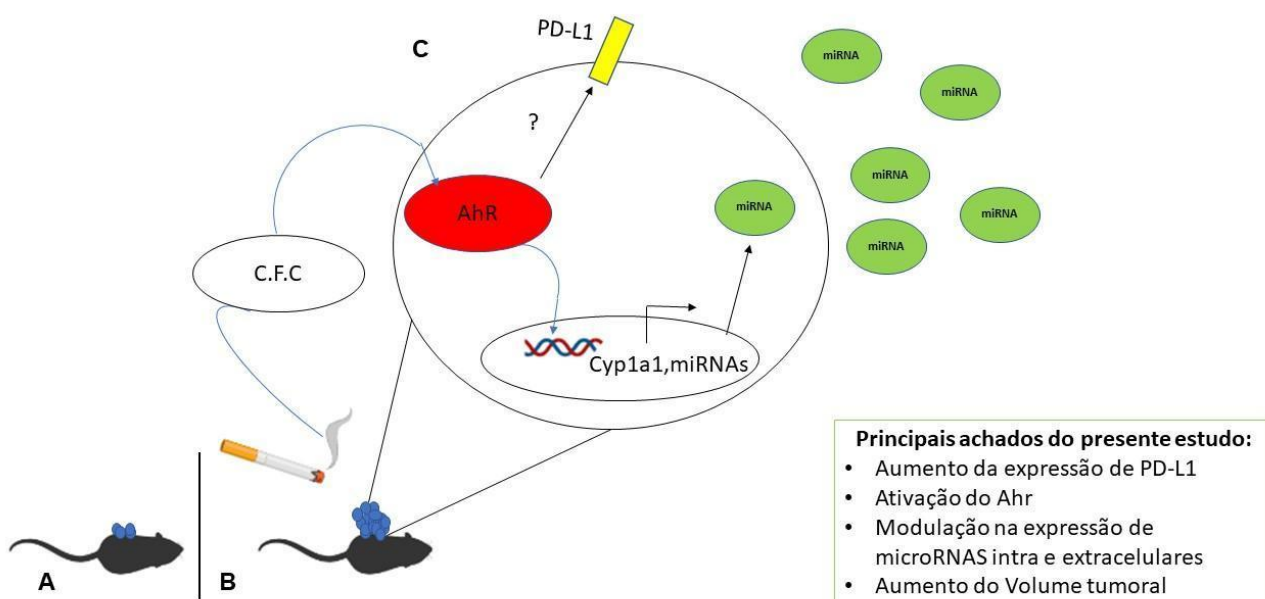
O microRNA 320a é descrito como um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão e contribui para polarização de macrófagos reguladores do tipo M2 em pacientes fumantes (FOTUNATO et al, 2018). Entretanto, não há descrição de sua função em melanoma o que torna nossos dados inéditos. O miR-210 é um microRNA extracelular que contribui com o processo de metástase e promoção da exaustão de células CD8 citotóxicas (NOMAN et al., 2016). Dessa forma, a alta expressão do miR-210 poderia contribuir para maior progressão tumoral observada nos modelos murinos de melanoma. Adicionalmente, também observamos o aumento da expressão do miR-16. Esse microRNA é bem descrito como regulador das células Th9 conhecidas por seu potencial antitumoral (SINGH Y et al 2016). Confirmando essa função, observamos que as EVs de B16 promoveram a redução na produção de IL-9 e aumento da expressão de Foxp3 nas células Th9, o aumento de Foxp3 foi exacerbado na condição EVs B16 cultivadas com o CSEM. Esses dados sugerem que essas EVs contendo o miR16 poderiam modular a resposta imune antitumoral favorecendo o escape a imunovigilância aumentando as populações de células Tregs no TME.

Com a finalidade de identificar o mecanismo biológico responsável pelo aumento na expressão diferencial de PD-L1 e dos microRNAs (miR-16, miR210, miR-320a), avaliamos a expressão e ativação do receptor *Ahr*. O AhR é um sensor intracelular de poluentes, entre eles os presentes na fumaça do cigarro. Recentemente, um trabalho do nosso grupo demonstrou que componentes da

fumaça do cigarro ativam o receptor AhR em células Th17 induzindo a expressão de microRNAs específicos liberados por essas células (DONATE et al, 2021). De maneira similar também que a exposição a componentes da fumaça do cigarro em células B16 também ativou esse receptor. Desse modo, hipotetizamos que a ativação do AhR pode estar envolvida nos fenômenos acima descritos. No entanto, ainda precisamos confirmar essa relação por meio da modulação farmacológica ou genética do AhR nas células B16.

## 6. Conclusão

No presente estudo, podemos concluir que a exposição à fumaça do cigarro promove a progressão tumoral possivelmente através da modulação da expressão de PD-L1 e da liberação de microRNAs imunoreguladores



**Fig.10. Exposição à fumaça do cigarro promove a progressão tumoral.** (A). animais com melanoma não expostos à fumaça do cigarro. B. Animais com melanoma expostos à fumaça do cigarro. A sigla C.F.C indica componentes da fumaça do cigarro C. Componentes da fumaça do cigarro ativam o AhR e induzem ativação da a sinalização mediada por Cyp1a1, possivelmente essa via induz aumento da expressão de PD-L1 e a modulação na expressão de microRNAs intra e extracelulares de vesículas extracelulares contendo microRNAs com potencial imunomodulador. Imagem criada com Biorender. Acesso em: 15/07/2021 [BioRender](#)

## 7. Referências

- AKTIPIIS, C. A. et al. Life history trade-offs in cancer evolution, C. A. et al. Life history trade-offs in cancer evolution. *Nature Reviews Cancer*, 892, **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 883–892, 2013.
- ALEXANDROV, L. B. et al. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *science* v. 354, n. 6312, p. 2–7, 2016.
- ALFONSI, R. et al. The double face of exosome-carried micrnas in cancer immunomodulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, 2018.
- ARNSON, Y.; SHOENFELD, Y.; AMITAL, H. Effects of tobacco smoke on immunity , in fl ammation and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. J258–J265, 2010.
- BALKWILL, F. R.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of Science**.125 (23): 5591–5596. 2012.
- BRÜCHER, B. L. D. M.; JAMALL, I. S. Epistemology of the origin of cancer: A new paradigm. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2014.



CAO, L. et al. PD-L1 is a Prognostic Biomarker in Resected NSCLC Patients with Moderate / high Smoking History and Elevated Serum SCCA Level. **Journal of Cancer**, v. 8, n. Cd, 2017.

DOLL, R ET AL. The mortality of doctors in relation to their smoking habits: a preliminary report. 328. 1529–1533. 2004

DONATE, P. B. et al. Cigarette smoke induces miR-132 in Th17 cells that enhance osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 1, p. 1–8, 2020.

FINNERTY, J. R. et al. The miR-15 / 107 Group of MicroRNA Genes : Evolutionary Biology , Cellular Functions , and Roles in Human Diseases. **Journal of Molecular Biology**, v. 402, n. 3, p. 491–509, 2010

FORTUNATO, O. et al. Circulating mir-320a promotes immunosuppressive macrophages M2 phenotype associated with lung cancer risk. v. 2761, p. 2746–2761, 2019.

GIBBINGS, D. J. et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 1143–1149, 2009.

GROSSO, G. et al. Possible role of diet in cancer: systematic review and multiple meta-analyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. **Nutrition Reviews**, v. 75, n. 6, p. 405–419, 2017.

HALL, J. et al. The association of sequence variants in DNA repair and cell cycle genes with cancers of the upper aerodigestive tract. **Carcinogenesis** v. 28, n. 3, p. 665–671, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HÉLIOT, A. et al. International Journal of Hygiene and Smoker extracellular vesicles influence status of human bronchial epithelial cells. **International Journal of**

**Hygiene and Environmental Health** v. 220, p. 445–454, 2017.

HINSHAW, D. C.; SHEVDE, L. A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. **Cancer research** v.79 p. 4557–4567, 2019.

HUI, L.; CHEN, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. **Cancer Letters**, v. 368, n. 1, p. 7–13, 2015.

JIANG, X. et al. Role of the tumor microenvironment in PD- L1 / PD-1-mediated tumor immune escape. **Molecular Cancer** v.18 p. 1–17, 2019.

JAYANT et al. Quantification of the role of smoking and chewing tobacco in oral, pharyngeal, and oesophageal cancers. **Br J Cancer**. v.35 p. 232–235 (1977)

KOSAKA, N. et al. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 4, p. 1163–1172, 2016.

LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, 2018.

NOMAN, M. Z. et al. miR-210 and hypoxic microvesicles: Two critical components of hypoxia involved in the regulation of killer cells function. **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p. 257–262, 2016.

OKOYE, I. S. et al. Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 89–103, 2014.

PARRY, E. M. et al. Germline Mutations in DNA Repair Genes in Lung Adenocarcinoma. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 12, n. 11, p. 1673–1678, 2017.

RANDOLPH, M. B. Association of active and passive smoking with risk of breast cohort study. **BMJ** 42: d1016, 2011.

RAHNER, NILS, and VERENA STEINKE. “Hereditary cancer syndromes.” **Deutsches Arzteblatt international**, v.105, p.706-14, 2008.

SATO, K. et al. Lung Cancer Association between the mutational smoking signature

and the immune microenvironment in lung adenocarcinoma. **Lung Cancer**, v. 147, n. June, p. 12–20, 2020.

SINGH, Y. et al. MicroRNAs regulate T-cell production of interleukin-9 and identify hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  as an important regulator of T helper 9 and regulatory T-cell differentiation. **Immunology**, v. 149, n. 1, p. 74–86, 2016

SOBUS, S. L.; WARREN, G. W. The biologic effects of cigarette smoke on cancer cells. **Cancer**, v. 120, n. 23, p. 3617–3626, 2014.

STABILE, L. P. et al. Syngeneic tobacco carcinogen – induced mouse lung adenocarcinoma model exhibits PD-L1 expression and high tumor mutational burden. **JCI Insight**. v.6, p. 1–13, 2021

THÉRY, S. et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Curr Protoc Cell Biol Chapter 3**, Unit 3.22 (2006).

YIN, Y. et al. Tumor-secreted miR-214 induces regulatory T cells: a major link between immune evasion and tumor growth. **Nature Publishing Group**, p. 1164–1180, 2014.