

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

LUCAS ALEIXO LEAL PEDROZA

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE
MACRÓFAGOS EM MELANOMAS UTILIZANDO DADOS DE
SEQUENCIAMENTO DE CÉLULAS ÚNICAS.**

Recife
2023

LUCAS ALEIXO LEAL PEDROZA

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE
MACRÓFAGOS EM MELANOMAS UTILIZANDO DADOS DE
SEQUENCIAMENTO DE CÉLULAS ÚNICAS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dra Mariana Lima Boroni Martins

Co-Orientador: Dra. Angela Castoldi de Albuquerque

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

PEDROZA, LUCAS ALEIXO LEAL.

CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE MACRÓFAGOS EM
MELANOMAS UTILIZANDO DADOS DE SEQUENCIAMENTO DE
CÉLULAS ÚNICAS. / LUCAS ALEIXO LEAL PEDROZA. - Recife, 2023.

78p : il., tab.

Orientador(a): MARIANA LIMA BORONI MARTINS

Coorientador(a): ANGELA CASTOLDI DE ALBUQUERQUE

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. Biologica celular. 2. Bioinformática. 3. Transcriptômica. 4. Oncologia. 5.
Imunologia. I. MARTINS, MARIANA LIMA BORONI . (Orientação). II. DE
ALBUQUERQUE, ANGELA CASTOLDI. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

LUCAS ALEIXO LEAL PEDROZA

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE
MACRÓFAGOS EM MELANOMAS UTILIZANDO DADOS DE
SEQUENCIAMENTO DE CÉLULAS ÚNICAS.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Mariana Lima Boroni Martins
Instituto Nacional do Câncer/ Departamento de pesquisa básica e experimental

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto
Universidade Federal de Pernambuco/ Instituto Keizo Asami

Prof. Dra Patrícia d Emery Alves Santos
Instituto Keizo Asami

Dedico este trabalho a minha irmã,
Mariana Aleixo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Dra. Mariana Boroni, pela oportunidade e o privilégio de fazer parte do seu grupo de pesquisa, bem como pela confiança nas minhas habilidades e por sempre ter tentando extrair o melhor de mim. À minha co-orientadora, Dra Angela Castoldi por toda paciência e pelos ensinamentos passados durante todo este período. Ao LBBC e ao ILIKA por disponibilizar os recursos necessários para a realização deste projeto.

Agradeço também a todos os integrantes do LBBC por terem contribuído direta ou indiretamente com o desenvolvimento deste projeto, especialmente à Gabriela e ao Leandro por sempre terem se disponibilizado a me ajudar, me ensinar com uma paciência quase infinita e por sempre terem se desdobrado para conseguir um tempo para mim, mesmo quando as circunstâncias não permitiam. Tenho certeza que sem eles este trabalho não existiria.

Agradeço também aos amigos que fiz durante esta pequena e tão importante fração da minha jornada acadêmica, os quais foram responsáveis por tantos momentos alegres durante minha graduação e por sempre terem estado ao meu lado nos momentos difíceis.

Agradeço a todos os meus familiares por terem me apoiado durante todos esses anos, em especial ao meu tio Pedro Aleixo por sempre ter me incentivado a ter um senso crítico e a gostar de leitura e ciências, além de sempre ter apoiado meus sonhos de ser um cientista. Ao meu avô Francisco Leal e minha avó Aleida Maria por todo amor e carinho e por terem cuidado de mim com tanto zelo. Às minhas tias, Erika e Carol por sempre estarem ao meu lado e me auxiliado em todos os momentos. À minha querida irmã Mariana, que mesmo sendo tão pequena, tornou-se meu principal combustível para continuar avançado.

Digna de um parágrafo exclusivo, gostaria de agradecer imensamente à minha mãe e maior inspiração de vida, Francine Aleixo, por ter enfrentado tantas barreiras e desafios sem temer apenas para me ver bem, por sempre ter sido uma mãe excepcional, uma grande amiga, e o principal alicerce na minha vida. Graças a ela eu não chegaria onde cheguei.

Por fim e não menos importante, gostaria de agradecer ao meu grande amor, Ana Luiza, por sempre ter sido uma luz na minha vida e suportado todas as crises e momentos difíceis até aqui.

PEDROZA, Lucas Aleixo. **Caracterização de subpopulações de macrófagos em melanomas utilizando dados de sequenciamento de célula única.** 2023. Número total de folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

O melanoma é um dos tipos de câncer mais letais atualmente, devido ao seu alto potencial metastático e resistência à terapias, entretanto, com o avanço do entendimento acerca dos tumores, observou-se que as células imunes do microambiente tumoral desempenham papéis tão importantes para a progressão tumoral quanto as próprias células neoplásicas. Dentre os componentes imunológicos, os macrófagos têm recebido um destaque especial, visto que os mesmos são células extremamente plásticas podendo assumir fenótipos distintos resultando em diferentes desfechos clínicos. Devido à alta complexidade em caracterizar as diferenças entre as subpopulações dos macrófagos, notou-se que as técnicas convencionais de sequenciamento não eram suficientes, e para suprir esta necessidade, as técnicas de sequenciamento de RNA de células únicas (do inglês *single-cell RNA sequencing*) surgiram para trazer análises de dados em resoluções até então desconhecidas. No presente estudo realizamos a caracterização de 8 subpopulações de macrófagos distribuídos em 3 principais tipos de melanoma (cutâneo, acral e uveal) e entre sítios primários e metastáticos utilizando dados de *single-cell RNAseq*, disponíveis em bancos de dados públicos e análise dos mesmos por meio de bibliotecas e ferramentas computacionais. Cento e cinquenta e sete (157) mil células de 53 pacientes diferentes foram obtidas e processadas, das quais 2814 foram anotados como macrófagos e caracterizadas nos fenótipos: associados a lipídeos, apresentadores de antígenos, associados a IFN, intersticiais, associados à angiogênese e associados à hipóxia. Sendo o melanoma uveal caracterizado por uma maior presença de macrófagos associados à IFN (>55%), comparado ao cutâneo e acral que apresentaram um perfil mais estratificado. Os macrófagos intersticiais por sua vez estavam presentes de forma semelhante em amostras de melanoma acral (23%), cutâneo (25%), uveal (20%). Ao comparar amostras primárias e metastáticas por outro lado, observou-se que em nas primeiras houve de cerca de 60% para macrófagos associados à IFN, enquanto em amostras metastáticas houve um aumento de fenótipos associados à lipídeos (18%) e a hipóxia (6%). Tais dados, juntamente com as análises de enriquecimento de vias possibilitaram a visualização da relação destas subpopulações com características diretamente relacionadas ao curso clínico da doença, bem como o seu papel na atuação em diversos processos oncológicos relacionados tanto com um melhor ou pior prognóstico. Ademais, o respectivo trabalho também possibilitou um vislumbre acerca do papel que algumas destas subpopulações podem desempenhar frente à respostas à imunoterapias, bem como a sua interação com outras células imunológicas.

Palavras-chave: Melanoma. *Single-cell RNAseq*. Macrófagos. Microambiente tumoral. Bioinformática.

PEDROZA, Lucas Aleixo. **Caracterização de subpopulações de macrófagos em melanomas utilizando dados de sequenciamento de célula única.** 2023. Número total de folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Melanoma is one of the most lethal types of cancer currently due to its high metastatic potential and resistance to therapies. However, with the advancement of understanding about tumors, it has been observed that immune cells in the tumor microenvironment play roles as important for tumor progression as the neoplastic cells themselves. Among the immune components, macrophages have received special attention, as they are highly plastic cells that can assume distinct phenotypes resulting in different clinical outcomes. Due to the high complexity in characterizing the differences between macrophage subpopulations, it was noted that conventional sequencing techniques were insufficient. To address this need, single-cell RNA sequencing techniques emerged to provide data analysis at previously unknown resolutions. In the present study, we characterized 8 subpopulations of macrophages distributed among 3 main types of melanoma (cutaneous, acral, and uveal) and between primary and metastatic sites using single-cell RNAseq data available in public databases. We conducted analyses using computational libraries and tools. A total of one hundred and fifty-seven thousand (157,000) cells from 53 different patients were obtained and processed, of which 2,814 were annotated as macrophages and characterized into the following phenotypes: lipid-associated, antigen-presenting, IFN-associated, interstitial, angiogenesis-associated, and hypoxia-associated. Uveal melanoma was characterized by a higher presence of IFN-associated macrophages (>55%) compared to cutaneous and acral melanomas, which exhibited a more stratified profile. Interstitial macrophages, on the other hand, were similarly present in acral (23%), cutaneous (25%), and uveal (20%) melanoma samples. When comparing primary and metastatic samples, it was observed that in the former, there was an increase of about 60% in IFN-associated macrophages, while in metastatic samples, there was an increase in lipid-associated (18%) and hypoxia-associated (6%) phenotypes. These data, along with pathway enrichment analyses, allowed for visualization of the relationship of these subpopulations with characteristics directly related to the clinical course of the disease, as well as their role in various oncological processes associated with both better and worse prognoses. Furthermore, this work also provided insight into the roles some of these subpopulations may play in response to immunotherapies and their interactions with other immune cells.

Key words: Melanoma. *Single-cell RNAseq*. Macrophages. Tumour microenvironment. Bioinformatics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Incidência e mortalidade do melanoma no mundo e na América do Sul	12
Figura 2 – Distribuição de diferentes subtipos de melanoma em diferentes sítios corpóreos	14
Figura 3 – Representação ilustrativa do microambiente tumoral	19
Figura 4 – Funções dos macrófagos associados ao tumor	25
Figura 5 – Diferenças entre <i>sc-RNAseq</i> e <i>bulk-RNAseq</i>	28
Figura 6 – Panorama do fluxo de trabalho empregado no projeto	32
Figura 7 – Caracterização da coorte em frequência relativa das amostras de cada paciente	34
Figura 8 – Panorama do controle de qualidade	35
Figura 9 – Primeiro nível de anotação para cada estudo individualmente e identificação de RNA ambiente	37
Figura 10 – Panorama geral dos datasets integrados	39
Figura 11 – Expressão de genes canônicos no primeiro nível de anotação	40
Figura 12 – Distribuição relativa dos tipos celulares	42
Figura 13 – Distribuição absoluta dos tipos celulares	43
Figura 14 – Representação dos marcadores e dos clusters de células mielóides	44
Figura 15 – UMAP das subpopulações de macrófagos detectadas pelo <i>celltypist</i>	46
Figura 16 – Distribuição de macrófagos residentes e recrutados	47
Figura 17 – Anotação das subpopulações de macrófagos identificadas	49
Figura 18 – Distribuição das subpopulações de macrófagos	52
Figura 19 – Presença de marcadores de exaustão entre as subpopulações de macrófagos	53
Figura 20 – Análise de enriquecimento de vias das populações detectadas de macrófagos residentes	58
Figura 21 – Análise de enriquecimento de vias das populações detectadas de macrófagos recrutados	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais mutações encontradas nos melanomas cutâneos, acrais e uveais 17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF1	Fator inflamatório 1 do aloenxerto
AKT	Proteína quinase B
APC	Célula apresentadora de antígeno
APO	Apolipoproteína
BAP1	Proteína-1 associada a BRCA1
BRAF	Proto-oncogene B-Raf
C1Q	Complemento C1Q
CCL	Ligante de quimiocina CC
CCND1	Ciclina D1
CD	Cluster de diferenciação
CDC45	Ciclo de Divisão Celular 45
CDH5	Caderina
CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
CDK4	Quinase 4 dependente de ciclina
CLDN5	Claudin-5
CLEC9A	Domínio de lectina tipo C contendo 9A
COL	Colágeno
CPA3	Carboxipeptidase A3
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos
CMM	Melanoma maligno cutâneo
CSF3	Fator estimulador de colônias 3
CXCL	Ligante de quimiocina (motivo CXC)
CXCR	Receptor da quimiocina (motivo CXC)
DC	Célula dendrítica
DEG	Genes diferencialmente expressos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIF1AX	Fator de iniciação da tradução eucariótica 1A
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
ESM1	Molécula 1 específica da célula endotelial
FABP	Proteínas de ligação a ácidos graxos

FCN1	Ficolina 1
FCGR	Receptor Gama Fc
FCER1A	Receptor Fc Épsilon Ia
FN1	Fibronectina 1
FOLR2	Receptor beta de folato
GEO	<i>Gene expression omnibus</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF)
GNAQ	Subunidade alfa da proteína G(q)
GNA11	Subunidade alfa-11 da proteína de ligação ao nucleotídeo
HERC2	Ligase de proteína ubiquitina gigante E3
HES1	Família Hes Fator de Transcrição BHLH 1
HLA	Antígenos leucocitários humanos
HMGB1	Proteína da caixa 1 do grupo de alta mobilidade
IFITM	Proteína Transmembrana Induzida por Interferon
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do câncer
IRF	Fator regulador de Interferon
JAK2	Janus Quinase 2
KIT	Proto-oncogene cKIT
KRT	Queratina
LA	Associado à lipídeos
LAG3	Gene de ativação de linfócitos 3
LILR	Receptor semelhante a imunoglobulina de leucócitos
LST1	Transcrição específica de leucócitos 1
LUM	Luminicano
LYVE1	Receptor de hialuronano endotelial de vasos linfáticos 1
LYZ	Lisozima
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MC1R	Receptor de melanocortina
MEK	Quinase ativada por mitógeno
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MKI67	Marcador de proliferação KI-67
MLANA	Melan-A

MS4A1	Membrana Abrangendo 4 Domínios A1
MSH	Hormônio estimulador de melanócitos
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
MZB1	Proteína Específica de Células da Zona Marginal B e B1
NF1	Neurofibromatose 1
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NGS	Sequenciamento de nova geração
NK	Linfócito <i>natural killer</i>
NRAS	NRAS proto-oncogene GTPase
NCM	Melanoma maligno não cutâneo
OCA2	Gene P
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDCD1LG2	Ligante 2 de morte celular programada 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinases
PMEL	Proteína Pré-melanossoma
PPA1	Pirofosfatase Inorgânica 1
PRAME	Regulador transcricional do receptor nuclear PRAME
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatase
PD-L1	Ligante de morte 1 programado
PDGFRB	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas beta
pDC	Células dendríticas plasmocitóides
RCV1	Recoverina 1
REC	Recrutado
RES	Residente
RGS5	Regulador da sinalização da proteína G 5
RGR	Receptor Acoplado à Proteína G RPE-Retinal
RHO	Rodopsina
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAseq	Sequenciamento de RNA
ROM1	Proteína da membrana do segmento externo da retina 1
RPE65	Isomerohidrolase retinoide
S100	Proteína de ligação de cálcio S100 A1
sc	Sequenciamento de células únicas
SELL	Selectina

SF3B1	Subunidade 1 do fator de splicing 3B
SMART	Mecanismo de comutação na extremidade 5' do modelo de RNA
SPP1	Osteopontina
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
STMN1	Stamina 1
TAM	Macrófagos associados ao tumor
TCF	Fator de transcrição
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TIM-3	Receptor celular 2 do vírus da hepatite A
TOP2A	DNA Topoisomerase II Alfa
TP53	Proteína tumoral p53
TPS	Triptase
TME	Microambiente tumoral
Treg	Linfócitos T reguladores
TREM2	Receptor desencadeado expresso nas células mielóides 2
TGF- β	Fator de crescimento tumoral-beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UV	Raios ultravioletas
UMI	Identificador molecular único
VCAN	Versicano
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VWF	Fator de Von Willebrand

SUMÁRIO

1 Introdução	0
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	12
2.1 Melanoma	12
2.1.1 Melanoma cutâneo	14
2.1.1.1 Melanoma acral	15
2.1.2 Melanoma uveal	16
2.2 Microambiente tumoral	17
2.2.1 Células linfóides	19
2.2.2 Células mielóides	20
2.2.2.1 Monócitos	21
2.2.2.2 Células dendríticas	22
2.2.2.3 Macrófagos	22
2.3 Análise de expressão gênica para identificação do perfil imune tumoral	25
2.3.1 Sequenciamento de rna total (bulk)	26
2.3.2 Sequenciamento de rna de células únicas	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 Tipo do estudo	29
4.2 Seleção de dados	29
4.3 Padronização do genoma de referência	29
4.4 Controle de qualidade	30
4.5 Primeiro nível de anotação	30
4.6 Identificação de subpopulações de macrófagos	31
4.7 Análise de enriquecimento de vias	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Caracterização da coorte	32
5.2 Controle de qualidade	34
5.3 Primeiro nível de anotação e remoção do rna ambiente	35
5.4 Panorama da integração e do primeiro nível de anotação	37
5.5 Identificação e caracterização de células mielóides	43
5.5.1 Macrófagos	45
5.5.2 Análise de enriquecimento de vias	55
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

1 Introdução

O melanoma é um tipo de câncer derivado de malignidades nos melanócitos, caracterizando-se inicialmente por pequenas manchas irregulares conhecidas como nevos, geralmente em regiões onde há maior exposição solar, como pele e olhos. Dermatologicamente os melanomas podem ser classificados pelos critérios ABCDE: Assimetria, Irregularidade das Bordas, Variação de Cores, Diâmetro Maior que 6 mm, e Evolução da lesão (mudança de tamanho, cor, forma ou nevogênese) (Jensen and Elewski., 2015). Apesar de não ser um tipo de câncer muito incidente, o seu alto potencial metastático e resistência à imunoterapias o tornam um dos tumores mais letais (Schadendorf et al., 2015; Ahmed et al., 2020).

De acordo com levantamentos do *Global Cancer Observatory* (IARC., 2020), a estimativa global para o ano de 2020 foi de mais de 320 mil indivíduos foram diagnosticados com melanoma, com cerca de 57 mil óbitos pela doença, enquanto cerca de 80% ocorreram em indivíduos com mais de 50 anos, os quais também apresentavam pior prognóstico (Arnold et al., 2022). Não obstante, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) referentes aos levantamentos realizados em 2020 e 2022, estimam-se cerca de 8.980 novos casos e 1.923 mortes (“Câncer de pele melanoma” INCA, 2022).

O melanoma também apresenta suas próprias subdivisões, sendo as principais que separam os melanomas malignos entre cutâneos, do inglês “*Cutaneous malignant melanoma*”: (CMM) e não cutâneos, do inglês “*Non-cutaneous malignant melanomas*”: (NCM) (Saidi et al., 2022), sendo os primeiros geralmente associados à exposição aos raios UV, além de serem representados pelos subtipos: melanomas de expansão superficial, nodular, lentiginoso maligno e melanoma acral, este último diferenciando-se dos demais CMM por concentrar-se nas palmas das mãos e solas dos pés (Greenwald et al., 2023; Elder et al., 2020; Goydos and Shoen et al., 2015). Não obstante outros subtipos de melanoma podem não ser cutâneos e são mais raros e de difícil diagnóstico, como é o caso do melanoma uveal que surge no pigmento dos olhos e representa cerca de 3-5% de todos os casos melanomas (Chattopadhyay et al., 2017; McLaughlin et al., 2005).

Apesar de ter sido um dos primeiros tumores a ser tratado com imunoterapias, o melanoma demonstrou-se altamente resistente, apresentando elevadas taxas de recidiva (Tímar e Ladányi., 2022). Embora seus mecanismos ainda não sejam completamente compreendidos, o diagnóstico precoce do

melanoma é crucial para um prognóstico significativamente melhor, enquanto, o diagnóstico tardio pode levar a um prognóstico extremamente adverso, onde se observa maior resistência desses tumores às terapias, além de maiores chances da doença estar em processo metastático. Apesar do avanço nas técnicas diagnósticas, cerca de 10% dos pacientes recebem o primeiro diagnóstico quando já estão em fases avançadas da doença; além disso, o melanoma é conhecido por ser um dos tumores com pior prognóstico, principalmente devido ao seu alto potencial metastático e à evasão do sistema imune (Ross and Jeffrey et al., 2011).

Sabe-se também que no microambiente tumoral (TME, do inglês “*tumor microenvironment*”) do melanoma ocorre um recrutamento significativo de células imunossupressoras, tais como os linfócitos T reguladores (Treg) e linfócitos com perfil Th2. Essas células liberam citocinas e quimiocinas, como IL-10, TGF- β e CCL17, que reduzem a citotoxicidade das células imunes no TME e podem também levar à citólise e disfunção metabólica das mesmas (Chattopadhyay et al., 2013; Eddy and Chen., 2020).

Dentre as células imunes do TME melanocítico, incluem-se os macrófagos, que desempenham papéis diversos em nosso organismo, como a fagocitose de partículas e patógenos, reparo tecidual, além de atuarem como células apresentadoras de antígenos (APC). Essas células de origem mielóide podem tanto ser precursoras de monócitos circulantes quanto originar-se de precursores embrionários que migraram para os tecidos e deram origem aos macrófagos, sendo conhecidas como macrófagos residentes, podendo receber nomenclaturas próprias dependendo do tecido em que residam. No caso da pele, elas são chamadas de células de Langerhans. Além disso, embora o conceito seja simplificado devido à alta plasticidade dessas células, é amplamente relatado na literatura que elas podem polarizar-se em estados antagônicos e reversíveis, conhecidos como M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório, imunossupressor e de reparo) (Davies et al., 2013; Wynn and Vannella et al., 2016).

Nos processos tumorais, como o melanoma, algumas subpopulações de macrófagos podem expandir-se no TME, sendo denominados nesses casos como macrófagos associados ao tumor, do inglês “*tumor associated macrophages: (TAMs)*”. TAMs já foram associados ao aumento da taxa de proliferação, migração, invasão e angiogênese nos tumores (DeNardo and Ruffell., 2019). Ademais, essas células desempenham funções críticas na interação com outras células imunes,

especialmente os linfócitos T, resultando em resistência às imunoterapias. Por outro lado, macrófagos polarizados em perfil pró-inflamatório estão associados a um melhor prognóstico e maior sobrevida (Zhou et al., 2022).

Devido à alta heterogeneidade do TME, principalmente em função dos componentes imunes, o sequenciamento convencional ou bulk RNAseq muitas vezes pode não fornecer informações precisas e em alta resolução sobre a expressão gênica em populações celulares específicas. Isso ocorre porque nessa técnica, avalia-se a expressão gênica de todo RNA presente na amostra, sem distinções celulares prévias; diante disso, o sequenciamento do transcriptoma de células única (single-cell RNAseq) vem sendo implementado como uma alternativa para solucionar essa problemática. Essa técnica baseia-se na separação e leitura de cada célula individual de uma amostra, permitindo o sequenciamento do transcriptoma de cada uma delas. Isso proporciona uma abordagem em alta resolução do comportamento celular e molecular do TME (Qian et al., 2020).

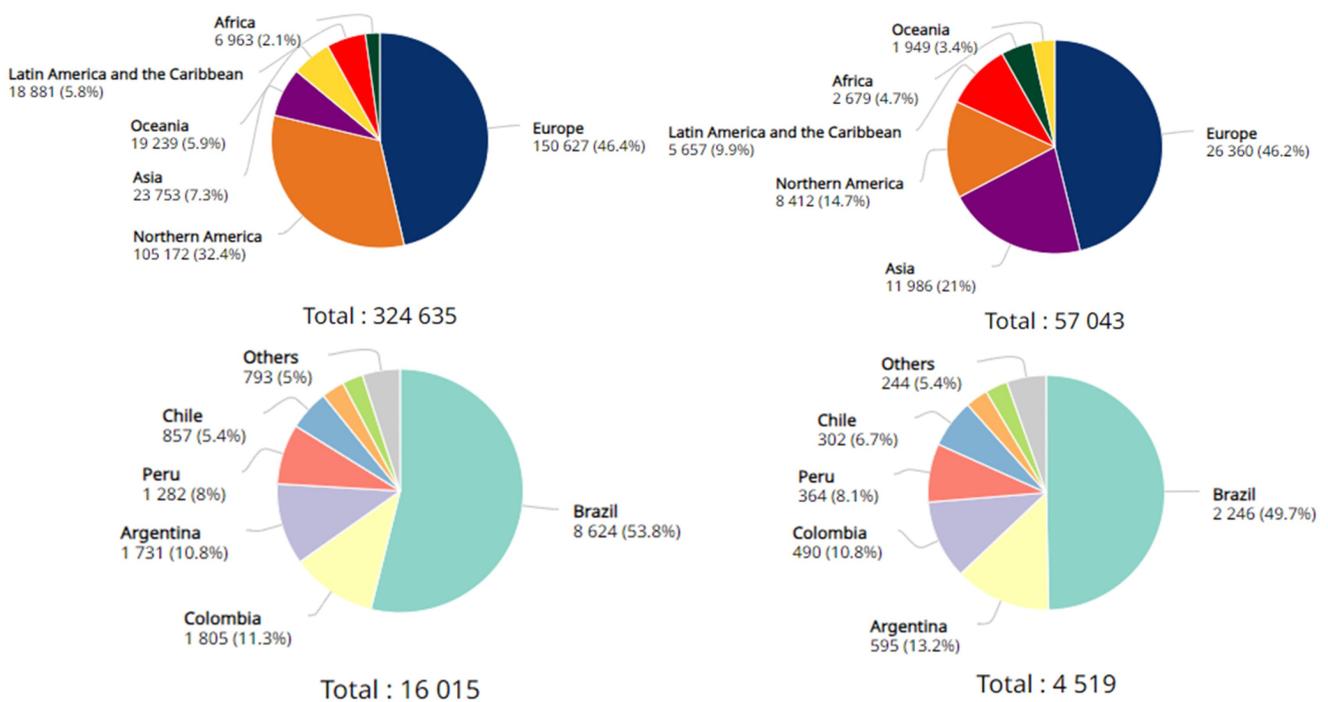
Considerando a quantidade de lacunas que ainda permeiam o conhecimento acerca dos macrófagos e seu papel no TME de diferentes subtipos de melanoma, o uso de dados gerados por meio de técnicas em alta resolução, como no caso do scRNAseq, é fundamental para trazer novas perspectivas ao entendimento da doença e, eventualmente, no desenvolvimento de terapias mais adequadas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1 MELANOMA

O melanoma é atualmente o subtipo de câncer de pele mais letal, representando cerca de 75% das mortes por câncer de pele, ou seja, mais de 320 mil indivíduos diagnosticados com melanoma e cerca de 57 mil mortes registradas anualmente no mundo todo (Davis et al., 2019; Arnold et al., 2022). Não obstante, apesar de o Brasil não encontrar-se entre os países com maior incidência de melanoma, dados gerados pelo INCA em 2020 e 2022 demonstram que as proporções entre número de casos e mortalidade são muito semelhantes com cerca de 8.624 novos casos e 2.246 mortes anualmente (“Câncer de pele melanoma” INCA, 2022) (Figura 1).

Figura 1: Incidência e mortalidade do melanoma no mundo e na América do Sul.



Fonte: International Agency for Research on Cancer - WHO - 2020.

O melanoma costuma ser muito mais incidente em pessoas de pele clara, visto que o melanoma é um tumor que acomete um pequeno grupo celular

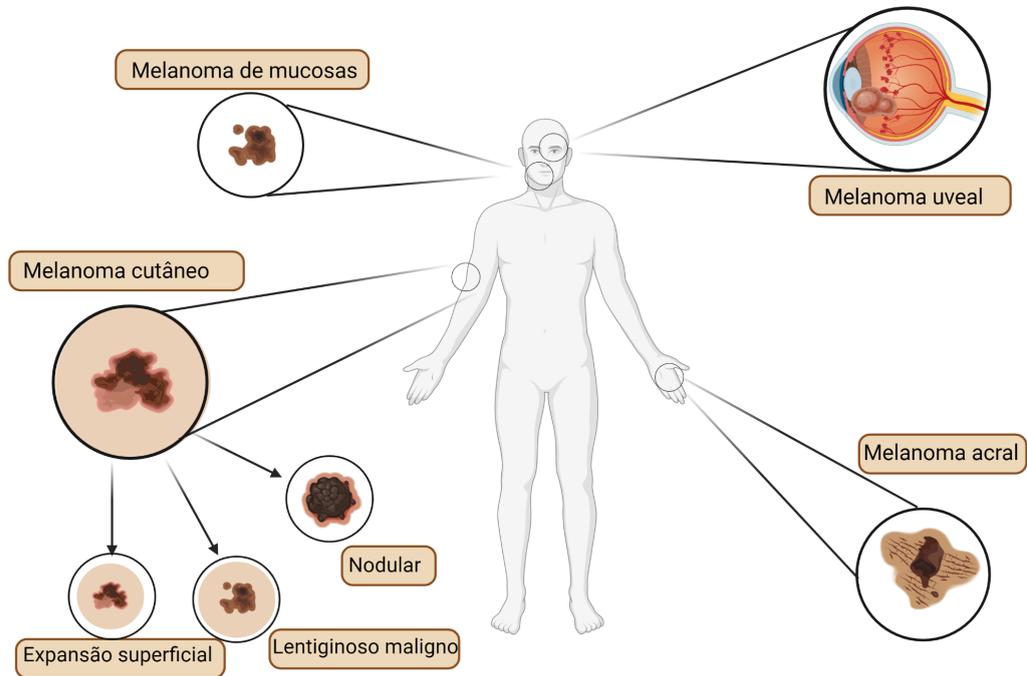
presente na epiderme denominado de melanócitos, sendo este o conjunto de células responsável por produzir os pigmentos de melanina eumelanina (pigmento preto/marrom) e feomelanina (vermelho/amarelo) e indivíduos com maiores proporções de feomelanina estão mais susceptíveis aos efeitos carcinogênicos dos raios UV (Morgan et al., 2013). Ademais, devido a fragilidade da pele com o avanço do tempo e do aumento no acúmulo de mutações, indivíduos mais velhos tendem a ser a principal faixa etária a ser acometida (Elder et al., 2020).

Dentre os principais motivos da letalidade do melanoma está o seu alto potencial metastático, visto que poucos melanócitos (cerca de 10^6) são o suficiente para invadir os tecidos subcutâneos, valor este que é aproximadamente 10 vezes menor do que em outros tumores sólidos, tornando o processo de metástase e migração para sítios adjacentes muito mais rápido e agressivo (Tímár and Ladányi et al., 2022).

Mesmo sendo pouco frequente e tendo fatores genéticos, como mutações que contribuem para o desenvolvimento do melanoma, como é o caso dos genes *BRAF*, *RAS* e *NF1* que estão diretamente envolvidos com a via da MAPK (Schadendorf et al., 2018), o melanoma é um câncer que também pode estar diretamente correlacionado com o estilo de vida, dada a diferença de exposição aos raios UV que cada indivíduo sofre. Ademais, com o aumento da temperatura global em função das mudanças climáticas e eventual aumento da exposição aos raios solares, os índices de casos de melanoma também podem aumentar significativamente (Karimkhani et al., 2015).

O melanoma também consta com diferentes sub-classificações, visto que seus sítios histológicos podem variar bastante. Isto posto este tipo de tumor pode ser classificado em CMM ou NCM, sendo o primeiro relacionado diretamente à exposição aos raios UV, além de serem os mais frequentes, sendo eles o, melanoma de expansão superficial, melanoma nodular, lentiginoso maligno, e acral, enquanto os melanomas não cutâneos e que geralmente não estão associados à exposição solar, são divididos em uveal e melanoma de mucosas (Rabbie et al., 2019). Com o avanço das técnicas de biologia molecular e sequenciamento genômico, o melanoma recebeu novas classificações de subtipo baseadas nas mutações mais frequentes, os quais não recebem distinções histopatológicas, sendo eles *BRAF*, e *NRAS* mutantes, ausência de *NF1* e triplo selvagem (TWT) (TCGA., 2015).

Figura 2: Distribuição de diferentes subtipos de melanoma em diferentes sítios corpóreos.



Fonte: Autor, 2023. Figura feita no *Biorender*.

Mesmo com o advento de novos biomarcadores genéticos supracitados, a observação clínica de pequenas lesões oriundas da proliferação dos melanócitos levando ao surgimento de pigmentos na pele conhecidos como nevos ainda é essencial no diagnóstico do melanoma, visto que, apesar de serem comuns em grande parte da população, o acometimento de nevos em formatos irregulares ainda é fator determinante no diagnóstico. Isto posto, os critérios ABCDE (Assimetria, Irregularidade das Bordas, Variegação de Cores, Diâmetro Maior que 6 mm, e Evolução da lesão) são amplamente utilizados na clínica médica (Jensen and Elewski et al., 2015).

2.1.1 MELANOMA CUTÂNEO

Os CMM representam o subtipo mais incidente quando comparados aos não cutâneos e estão diretamente relacionados à exposição aos raios UV (especialmente os UV-B), visto que este tipo de câncer acomete os melanócitos presentes em regiões da pele comumente expostas a luz solar, como braços,

pescoço, cabeça e face, sendo estas regiões mais expostas a luz solar. Entretanto, outros eventos capazes de gerar lesões na pele, como queimaduras, quantidade aumentada de nevus, exposição à câmaras de bronzeamento com altos níveis de UV-A, além do próprio histórico familiar, também podem preceder em anos ou décadas o surgimento deste tipo de malignidade (Matthews et al., 2017).

Apesar da sua alta carga mutacional, estudos indicam que em CMM mutações no oncogene *BRAF*, mesmo sendo a mutação mais frequente, não é o suficiente para desenvolver um processo neoplásico, visto que a mesma também encontra-se presente em grande parte dos nevus benignos, sendo necessária a ocorrência de outras mutações como *NF1*, *NRAS*, *TERT* e *CDKN2A*, além de mecanismos capazes de levar a evasão da vigilância imunológica. Demais estudos sugerem também que queratinócitos podem participar diretamente na formação de melanócitos malignos por meio da produção do hormônio estimulador de melanócitos (MSH) ao se ligar no receptor de melanocortina (MC1R); apesar deste ser um processo fisiológico que visa induzir uma maior quantidade de melanina para proteger a pele, a exposição crônica aos raios UV-A e UV-B podem exacerbar este mecanismo levando hiper-proliferação dos melanócitos, além de levar ao acúmulo de mutações (Leonardi et al., 2018).

Além de ser mais sensível aos efeitos da radiação solar, estudos indicam que a feomelanina por si só é capaz de produzir níveis mais altos de espécies reativas de oxigênio (EROs) em resposta à radiação solar levando a aumento do estresse oxidativo, podendo levar a danos celulares que a longo prazo elevam a probabilidade de ocorrer o processo de melanogênese (Ranadive et al., 1986; Morgan et al., 2013; Sarna et al., 1985). Por fim, os CMM assim como nos demais tipos de tumores, podem ser classificados quanto o estadiamento clínico do paciente, onde os estágios I e II representam tumores primários, o III as metástase para linfonodos e IV metástases para outros tecidos (Naik et al., 2021)

2.1.1.1 MELANOMA ACRAL

Durante muito tempo o melanoma acral foi reconhecido como um subtipo diferente de NCM, entretanto, atualmente o mesmo é reconhecido como um subtipo de CMM com características e padrões diferentes dos encontrados nesta classificação, visto que o mesmo é presente principalmente nas palmas das mãos, solas dos pés e nos dedos. Assim como em CMMs, os melanomas acrais também

possuem alta frequência entre idosos (Hall and Rapini et al., 2023).

Diferentemente do que é observado nos CMM, os melanomas acrais não estão relacionados à exposição aos raios UV, além de não possuir relações com maiores proporções de feomelanina. Embora não possuam cargas mutacionais tão elevadas quanto as observadas em CMMs convencionais, devido à baixa quantidade de danos ao DNA proporcionada pelos raios UV, mutações como *BRAF*, *KIT*, *NRAS* e *NF1* ainda marcam estes tumores (Liang et al., 2017; Zhang et al., 2022).

Devido a diferenças histológicas que o melanoma acral possui em relação aos CMM em regiões expostas à luz solar, alguns autores sugerem que sua classificação clínica e dermatológica não deveria seguir os parâmetros ABCDE, e sim os parâmetros “CUBED”, sigla em inglês para: Variação da cor, diagnóstico incerto para uma lesão nas mãos ou pés, lesões hemorrágicas (sangramento direto ou exsudato), alargamento da lesão e atraso na cicatrização (Bristow et al., 2010).

2.1.2 MELANOMA UVEAL

O melanoma uveal é o principal representante dos melanomas não cutâneos, compondo cerca de 5% de todos os casos de melanoma e surgindo principalmente na região do corpo coróide. Assim como observado nos CMMs, o melanoma uveal também é mais frequente em pessoas de pele clara e em muitas vezes é precedido por fatores ambientais como exposição aos raios solares (Chattopadhyay et al., 2017).

Enquanto os tumores primários tendem a ser mais facilmente diagnosticados e retirados cirurgicamente, pacientes que evoluem para metástase tendem a ter um péssimo prognóstico, com uma sobrevida de aproximadamente 1 ano. Além disso, de todos os sítios histológicos, o melanoma uveal parece ter uma preferência por gerar metástases no fígado, visto que o mesmo representa cerca de 90% das metástases (Grisante e tura et al., 2018; COMS., 2001).

Enquanto nos CMMs as mutações iniciadoras mais frequentes são nos genes *BRAF* e *NRAS*, no melanoma uveal existe uma prevalência de mutações nos genes *GNAQ*, *GNA11* e *BAP1*, sendo estas responsáveis pela ativação das vias RAF/MEK/ERK e inativação de supressores de tumor, e de marcadores de morte celular programada como a p53, além do aumento da atividade da via PI3K-AKT, responsável pela sobrevivência celular (Jager et al., 2020; Grisante e tura et al.,

2018).

Tabela 1: Principais mutações encontradas nos melanomas cutâneos, acrais e uveais.

Subtipo histológico	Mutações mais frequentes	Referências
Melanoma cutâneo	BRAF, KIT, NRAS, NF1, CDK4, PTEN, CDKN2A, TERT, P53	Shain et al., 2015; Leonardi et al., 2018
Melanoma Acral	BRAF, KIT, NRAS, NF1, CDK4, CCND1, CDKN2A, TERT	Zhang et al., 2022; Liang et al., 2017
Melanoma uveal	GNAQ, GNA11, BAP1, SF3B1, EIF1AX, HERC2, OCA2, IRF4	Jager et al., 2020; Ferguson et al., 2016

Fonte: Autor, 2023. Figura feita no *Biorender*.

2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL

Durante muito tempo, tinha-se a ideia de que as células malignas eram as únicas responsáveis por moldarem o estadiamento, prognóstico e resposta a terapias em tumores sólidos. Entretanto, hoje sabe-se que juntamente com as células neoplásicas, existem diversos outros componentes que moldam o que é atualmente conhecido como TME, um sistema altamente complexo composto por componentes celulares (Células imunes, estromais e endoteliais) e não celulares (Citocinas, quimiocinas, proteases e diversos fatores) (Hanahan et al., 2022).

A grosso modo os componentes imunológicos podem aderir a perfis pró-inflamatórios comumente relacionados a efeitos anti-tumorais, visto que atuam em um sistema de vigilância contra as células malignas, ou de reparo/ perfil anti-inflamatório (imunossupressor) (Xia et al., 2021). A descoberta destas interações entre células levou os pesquisadores a elucidar mecanismos de fuga da imunovigilância por parte das células malignas e eventualmente, estudos foram direcionados para o desenvolvimento de terapias focados não apenas na destruição tumoral, mas também na regulação de células efetoras e nas interações

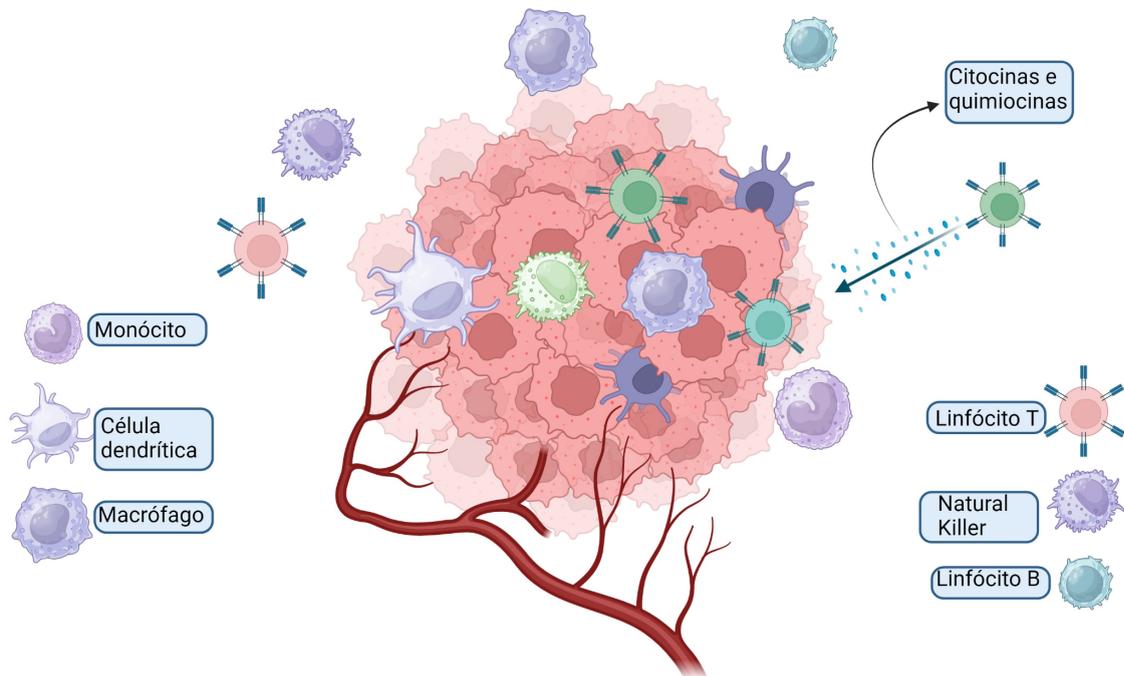
responsáveis pela evasão imunológica (Zhang and Zhang., 2020).

Apesar da presença de células imunossupressoras serem constantemente relacionadas a atividade pró-tumoral, muitas vezes um aumento substancial de células de perfil pró-inflamatório também pode levar a um prognóstico adverso, visto que tal mecanismo pode induzir à ações de proteases e citocinas capazes de degradar a matriz extracelular e acelerar o processo metastático.

Ademais, em tumores sólidos o TME é conhecidamente hipóxico, levando a uma necessidade de captação de nutrientes e indução de processos pró-angiogênicos mediados principalmente por fatores estimuladores como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Kretschmer et al., 2021; .Apte et al., 2019).

No contexto do melanoma, o TME é caracterizado pela sua alta imunogenicidade conferida pelo grande infiltrado de células imunes, especialmente de origem linfóide, quadro este proveniente especialmente pela elevada carga mutacional dos melanomas (principalmente os cutâneos), levando a uma super-expressão de antígenos que podem desencadear uma resposta imunológica contra as células tumorais. Entretanto, no melanoma os tumores desenvolvem mecanismos capazes de regular negativamente moléculas relacionadas ao checkpoint imunológico, como *PD-L1*, *CTLA-4* e *TIM-3*, capazes de inativar linfócitos T CD8+ (Petrova et al., 2020).

Figura 3: Representação ilustrativa do microambiente tumoral.



Fonte: Autor, 2023. Figura feita no *Biorender*.

2.2.1 CÉLULAS LINFÓIDES

O braço linfóide das células hematopoiéticas é composto principalmente pelos linfócitos T e B, sendo estes os principais mediadores da resposta imunológica adaptativa, além dos linfócitos NK (*Natural killer*) que participam do sistema imune inato (Abbas., 2008).

Os linfócitos B são os responsáveis pela produção de anticorpos com afinidade por antígenos específicos, representando assim a imunidade humoral (Cyster and Allen., 2020). No TME a presença de células B infiltrantes é comumente associada a um bom prognóstico, devido a sua capacidade de associação com linfócitos T CD8, T CD4 e macrófagos, além de suas propriedades de se diferenciar em células dendríticas plasmocitóides (pDC), relacionadas à apresentação de antígenos tumorais (Laumont et al., 2022)

Já os linfócitos T são os representantes da imunidade celular e podem ser subdivididos em diversas populações de acordo com sua atividade funcional, sendo os mais conhecidos os linfócitos T CD8 (Citotóxicos), T CD4 (Auxiliares), responsáveis por reconhecer antígenos e ativar outros leucócitos (Buchholz, Schumacher and Busch et al., 2015) e os linfócitos T regulatórios (Treg), que por sua

vez são responsáveis principalmente por suprimir a resposta imune, além de serem altamente associados a resposta pró-tumoral devido a sua capacidade de reduzir a atividade de células citotóxicas efectoras (Tanaka and Sakaguchi et al., 2019)

No contexto do TME, os linfócitos T CD8 são comumente associados a atividade anti-tumoral devido ao seu fenótipo citotóxico e capacidade de eliminar células neoplásicas devido ao reconhecimento de antígenos tumorais, entretanto a exposição prolongada destes linfócitos aos antígenos tumorais pode levar um desgaste celular conhecido como exaustão, processo este que também pode ser induzido por citocinas liberadas por linfócitos Treg e pelo processo de inflamação crônica presente no TME. A exaustão dos linfócitos por sua vez leva a um aumento da expressão de *PD-1*, *CTLA-4* e *TIM-3*. Já as células tumorais por sua vez também são responsivas aos estímulos externos como a inflamação, e em uma tentativa de sobrevivência passam a expressar moléculas que se ligam nos *checkpoints* imunológicos como é o caso do PD-L1 e inibem a atividade antitumoral dos linfócitos T (Dolina et al., 2021).

Tal mecanismo de evasão imunológica demonstrou-se tão importante que após diversos estudos, imunoterapias visando o desenvolvimento de inibidores de receptores de checkpoint imunológico, fazendo assim com que a atividade pró-tumoral das células T não fosse inibida e eventualmente as células tumorais teriam seus mecanismos de evasão barrados (Raskov et al., 2021; Tang et al., 2022).

2.2.2 CÉLULAS MIELÓIDES

Representando o segundo braço hematopoiético, as células de origem mielóide além de darem origem a componentes sanguíneos essenciais para a circulação e homeostase dos vasos como hemácias e plaquetas, os progenitores mielóides também são responsáveis pela produção de células da imunidade inata atuantes na linha de frente contra patógenos e processos lesivos em diversos tecidos, como é o caso dos granulócitos, especialmente os neutrófilos, sendo as células mais prevalentes na circulação de forma que em processos infecciosos estas células migram para os tecidos por um processo quimiotático conhecido como diapedese, e lá desempenham funções efectoras contra patógenos. Os eosinófilos e basófilos por sua vez também são granulócitos com funções efectoras, entretanto, os mesmos estão mais associados a respostas contra parasitas e reações alérgicas,

além de serem menos frequentes na circulação e mais prevalentes em mucosas (Abbas., 2008).

Os progenitores mielóides também são responsáveis por maturarem em fagócitos mononucleares: monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs), as quais recebem tal nomenclatura devido a sua capacidade de serem células especializadas em fagocitar patógenos, partículas estranhas e células mortas. Ao serem fagocitados, os patógenos e partículas estranhas também podem ser processados por estas células e apresentados para outras células imunes capazes de ativar respostas mais específicas, como é o caso dos linfócitos (Chow, Brown and Merad., 2011).

2.2.2.1 MONÓCITOS

Dentre todas as células mielóides, os monócitos talvez sejam aqueles com maior capacidade de se adequar a diferentes tecidos e microambientes, visto que os mesmos circulam livremente nos vasos sanguíneos facilitando seu recrutamento para os locais requisitados. Ao interagirem com moléculas como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α e EROs os monócitos podem se diferenciar em macrófagos com perfil pró-inflamatório e oxidativo conhecidos há muito tempo na literatura como macrófagos M1, enquanto IL-4, IL-13, IL-10 ou TGF β costumam induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos com perfil anti-inflamatório e com maior capacidade de reparo tecidual, conhecidos como macrófagos M2 (Austermann, Roth and Kahlert et al., 2022).

Os monócitos também podem ser recrutados para atuarem como células apresentadoras de antígenos ou DCs por meio de citocinas como IL-4 e o fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), adquirindo a capacidade de capturar e processar antígenos de diferentes origens e apresentá-los aos linfócitos T, os quais irão modular uma resposta efetora. Ademais, os monócitos por si só também podem possuir diferentes fenótipos antes mesmo de se diferenciarem, podendo ser classificados em clássicos (CD14 $^{++}$), sendo estes fagócitos mais eficientes, com maior potencial inflamatório e proliferativo, enquanto os monócitos não clássicos (CD14 $^{+}$, CD16 $^{++}$) são menos inflamatórios e possuem maior facilidade em migrar para os tecidos (Guilliams, Mildner e Yona., 2018).

Durante o processo de carcinogênese e com o aumento de células imunes, especialmente os linfócitos, observa-se muitas vezes a formação de um TME

extremamente inflamatório com a presença de diversas citocinas, quimiocinas e fatores teciduais como IL-6, CCL2, TNF- α e CXCL8, ocorre um maior recrutamento de monócitos clássicos para o local do tumor (Chen, Xia e Chen., 2023), fato este visualizado em diversos tumores incluindo em amostras metastáticas de melanoma com forte expressão do marcador CD163, altamente correlacionado com atividade pró-tumorigênica (Biermann et al., 2023; Skytthe et al., 2020). Entretanto, com a progressão tumoral, é comum observar um maior recrutamento de monócitos não clássicos com funções pró-metastáticas, auxiliando principalmente na promoção da angiogênese (Olingy et al., 2019)

2.2.2.2 CÉLULAS DENDRÍTICAS

Representando o tipo celular com maior capacidade de apresentar antígenos, comumente conhecidas como APC, as DCs são fundamentais na mediação da comunicação entre as imunidades inata e adaptativas, haja vista que as grandes projeções citoplasmáticas lhes permitem capturar partículas antigênicas com eficiência e processá-las para apresentar para as células linfóides por meio do complexo de histocompatibilidade (MHC) tipo I (linfócitos T CD8) ou tipo II (CD4), processo este conhecido como apresentação cruzada (Abbas., 2008).

Apesar de serem amplamente distribuídas em todos os tecidos do corpo, as DCs encontram-se em maior quantidade na pele, e nas mucosas, visto que estas regiões são os sítios que mais recebem exposição de patógenos e danos externos. Além de seu papel como APC, as DC também podem liberar citocinas capazes de ativar outras células imunes, induzindo respostas inflamatórias por meio de macrófagos, linfócitos T, induzindo a produção de anticorpos por linfócitos B, além de sua capacidade de modular a tolerância imunológica, suprimindo respostas inflamatórias exacerbadas (Merad et al., 2013).

2.2.2.3 MACRÓFAGOS

Representando o grupo celular mais plástico dentre todas as células hematopoiéticas, os macrófagos podem ser diferenciados inicialmente de acordo com sua origem, visto que podem ser originários de precursores hematopoiéticos embrionários, com alta expressão de marcadores como *FOLR2*, *TREM2*, *HES1* e *LYVE1*, sendo específicos para diferentes tecidos onde podem receber nomenclaturas distintas, como é o caso das células de Kupffer que representam os

macrófagos residentes do fígado. Os macrófagos recrutados por outro lado são derivados de monócitos circulantes após migrarem para algum tecido por meio de citocinas inflamatórias, tendo como principais marcadores *FN1*, *SELL* e *VCAN* além de possuírem uma meia vida mais curta do que os residentes os quais podem durar meses ou anos (Guimarães et al., 2023).

Além da separação entre residentes e recrutados, os macrófagos durante muito tempo foram classificados quanto ao seu fenótipo pró-inflamatório (Macrófagos M1), estimulados por moléculas como *IL-6*, *IL-1 β* e *IFN* e em seu fenótipo anti-inflamatório (M2), ativados por moléculas como *IL-4*, *IL-13* e *TGF- β* , muitas vezes relacionados ao reparo tecidual. Entretanto, com o tempo e avanço de técnicas de sequenciamento e biologia celular como o scRNAseq, observou-se que esta classificação nos estados de polarização macrofágica eram muito simplórios dado o amplo espectro de funções e diferentes formas de adaptação que estas células podem adquirir, especialmente no TME (Chen et al., 2021). Nosso grupo foi capaz de fazer uma caracterização funcional extensa de 12 subpopulações de macrófagos encontrados no TME de diferentes tumores sólidos usando integração de um vasto conjunto de dados de scRNA-Seq (Guimarães et al., 2023).

Macrófagos no contexto do TME são nomeados de TAM e podem desempenhar funções dicotômicas nestes microambientes, as quais podem favorecer ou não a progressão do tumor. No caso de macrófagos com perfil pró-inflamatório, estes costumam ser associados a um melhor prognóstico em pacientes oncológicos dada a sua alta capacidade de induzir citotoxicidade à células tumorais por meio da liberação de EROs e óxido nítrico, além de tornar o ambiente mais propício à infiltração de linfócitos T CD8 (Pan et al., 2020). Não obstante, a presença de linfócitos T especialmente na periferia do tumor estaria relacionada ao recrutamento de monócitos e macrófagos responsivos à interferon, especialmente pela liberação de IFN- γ por parte dos linfócitos T CD8 e pela interação dos T CD4 com o receptor CD40 de macrófagos, fazendo com que estes macrófagos também assumam um papel altamente pró-inflamatório com alta expressão de *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11* e genes checkpoint imunológico como *PDL1* induzindo assim uma respostas Th1 e anti-tumoral, por meio do recrutamento de mais linfócitos para o local do tumor (Mulder et al., 2021; Gubin et al., 2018).

TAMs com perfil pró-inflamatório também podem assumir um metabolismo altamente proliferativo e com vias e genes enriquecidos para aumento da atividade

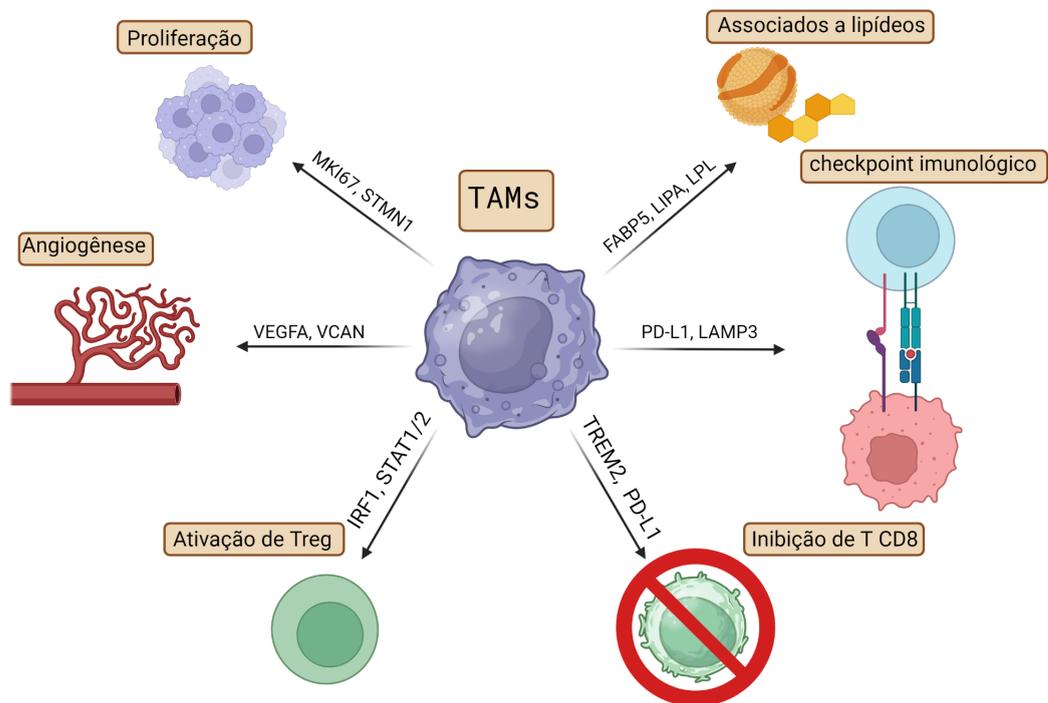
mitótica, como *MKI67*, *CDC45* e *HMGB1*, sendo também associados a atividades pró-tumorais (Tuong et al., 2021).

Os macrófagos com perfil anti-inflamatório por outro lado são constantemente associados às atividades pró-tumorigênicas utilizando mecanismos variados para responder à inflamação crônica do TME, fazendo assim com que recebam uma gama maior de sub-classificações, como é o caso dos macrófagos regulatórios ou macrófagos apresentadores de antígenos, (devido à expressão significativa do complexo MHC e HLA) que estão intimamente associados a inibição de linfócitos T CD8, recrutamento de Treg além de aumentar a resistência à imunoterapias por meio da indução da expressão de checkpoints imunológicos, como PD-1 e LAG3, fato este que também pode ser observado em amostras de melanoma em camundongos com expressão aumentada de *trem2* (Molgora et al., 2020).

Os TAM também podem se associar a um perfil pró-angiogênico, geralmente em resposta ao ambiente hipóxico e da escassez de nutrientes frente à alta demanda do TME, apresentando altos níveis de VEGFA, SPP1 e VCAN. Não obstante, em pacientes com melanoma responsivos a tratamentos com imunoterápicos, estes TAM pró-angiogênicos estavam menos presentes (Cheng et al., 2021).

No TME os TAMs podem se adaptar a um contexto de maior disponibilidade de lipídeos como é o caso de macrófagos encontrados em tumores de mama, um tecido com alta deposição de gordura. Esses macrófagos são conhecidos como , do inglês *Lipid associated-TAM (LA-TAM)*, identificados pela expressão de *FABP4*, *FABP5*, *APOE* e *TREM2* e assumindo um perfil mais imunossupressor e altamente fagocítico fazendo com estes TAMs fagocitem e acumulem lipídeos derivados de células tumorais e ativem mecanismos pró-tumorais a partir do estresse sofrido (Conza et al., 2022).

Figura 4: Funções dos macrófagos associados ao tumor.



Fonte: Autor, 2023. Figura feita no *Biorender*.

2.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA PARA IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL IMUNE TUMORAL

Devido à alta complexidade e heterogeneidade do TME, principalmente dentre as células imunes, as quais representam a maior população no microambiente, torna-se imprescindível uma melhor compreensão do fenótipo molecular.

Após as etapas de transcrição, onde um gene representado por um fragmento de DNA será transcrito em uma molécula de RNA mensageiro, esta molécula passará por uma série de etapas de tradução até ser convertida em uma proteína funcional que exercerá funções específicas nas células e no organismo, sendo este mecanismo conhecido como expressão gênica (Brouwer and Lenster., 2019).

Apesar de todas as células de um mesmo organismo compartilharem o mesmo DNA, nem todos os genes serão expressos igualmente em todas elas, fator este que contribui diretamente com a definição das características e fenótipos individuais de cada tipo celular (Rodriguez et al., 2019). A análise de expressão

gênica por sua vez visa estudar quais genes estão sendo expressos em uma determinada população celular, sob uma determinada condição, visto que em dadas circunstâncias certos genes podem estar mais ou menos expressos (Lovén et al., 2012).

Tendo estes conceitos em mente, as análises de expressão gênica se tornaram cada vez mais fundamentais dentro da biologia molecular, fazendo assim com que novas técnicas mais precisas fossem desenvolvidas, dentre elas, o sequenciamento de RNA (RNAseq), técnica que utiliza plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) e é capaz de identificar e quantificar moléculas de RNA com base em seus nucleotídeos que posteriormente serão mapeados juntamente a um genoma de referência onde os genes expressos poderão ser identificados (Kuksin et al., 2021).

2.3.1 SEQUENCIAMENTO DE RNA TOTAL (*BULK*)

Uma das abordagens utilizadas para análise de expressão gênica utilizando NGS é o sequenciamento de RNA em massa (*RNAseq bulk*), onde o RNA total de uma amostra biológica é extraído, convertido em moléculas de DNA complementar (cDNA) e sequenciado de forma abrangente, identificando genes que estejam ativos de forma significativa após a quantificação (Ozsolak and Milos., 2020).

Entretanto, os dados gerados por sequenciamento do tipo bulk fornecem apenas a expressão média dos genes analisados, não permitindo a identificação destes genes a nível de célula única, fornecendo apenas uma média da expressão de uma determinada população celular.

2.3.2 SEQUENCIAMENTO DE RNA DE CÉLULAS ÚNICAS

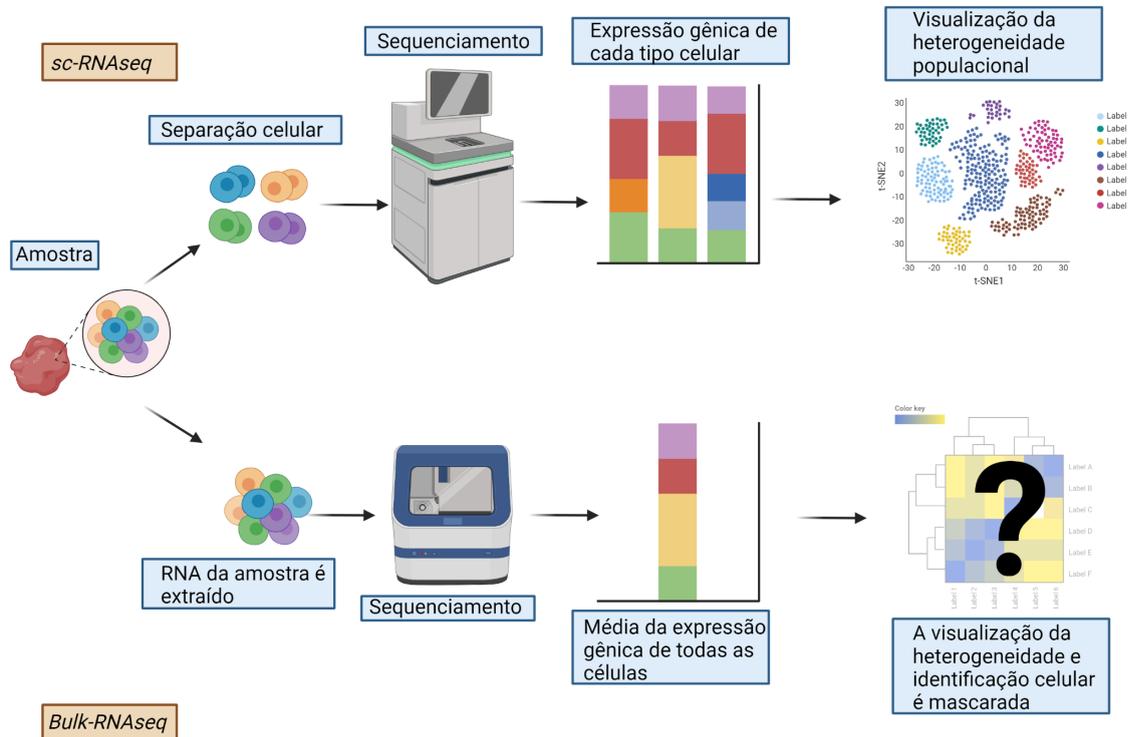
Na técnica de sequenciamento de RNA de célula única (*sc-RNAseq*) por outro lado, a barreira que impedia o sequenciamento de células de forma individual no bulk RNAseq foi superada, visto que nesta abordagem ao invés de se obter uma média da expressão gênica de uma amostra biológica, cada célula tem seu transcriptoma sequenciado individualmente com uso de plataformas de NGS, possibilitando assim o estudo da heterogeneidade de determinados tecidos a nível celular, sendo a oncologia uma das áreas que muito se beneficiou desta inovação biotecnológica.

Apesar de possuírem altas semelhanças técnicas e metodológicas nas etapas que vão desde a extração do RNA até o sequenciamento em si, visto que

ambas são baseadas em NGS, suas principais divergências consistem na etapa de separação e captura de células individuais, a qual pode ser realizada por meio de diferentes tecnologias, dentre as quais podemos citar a versão comercial 10x Genomics Chromium e a não comercial SMART-seq. Na primeira técnica, cada célula é englobada por uma gotícula de emulsão contendo um identificador único, bem como os reagentes necessários para que ocorra a reação, como os primers, além dos códigos de barras moleculares específicos para cada cDNA, chamado de *Unique Molecular Identifier (UMI)* (Gao et al., 2020). A técnica de SMART-seq (*Switching Mechanism at the 5' End of RNA Template*) por sua vez é uma técnica anterior à 10x e que não utiliza a metodologia de gotículas de emulsão, necessitando de uma etapa de isolamento de células únicas por diluição seriado ou uso de equipamento sorter. Em seguida, as células já individualizadas em poços são lisadas e primers se ligam às extremidades das moléculas de RNA, realizando uma amplificação do cDNA por uma PCR linear. Ademais, a fim de tornar a técnica mais sensível, os primers foram trocados por oligonucleotídeos, UMIs foram adicionados além de duas etapas de amplificação, sendo conhecida como SMART-seq2 (Ziegenhain et al., 2017).

Devido a enorme quantidade de informações obtidas a partir de um sequenciamento de sc-RNAseq, muitos estudos por maiores que sejam, não conseguem observar todas as populações e interações moleculares provenientes de seus estudos, fazendo assim com que diversos outros grupos utilizassem continuamente os dados públicos disponibilizados pelos grupos que tenham gerado dados inéditos de sc-RNAseq, para realizar novas análises com novas abordagens e perspectivas.

Figura 5: Diferenças entre *sc-RNAseq* e *bulk-RNAseq*.



Fonte: Autor, 2023. Figura feita no Biorender.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil de subpopulações de macrófagos dentro do microambiente tumoral de melanomas cutâneos, acrais e uveais baseado em seu fenótipo molecular utilizando dados públicos de scRNA-seq

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição celular do melanoma cutâneo, acral e uveal;

- Identificar e caracterizar funcionalmente as diferentes subpopulações de macrófagos presentes no TME dos melanomas cutâneo, acral e uveal;
- Analisar e comparar a composição das subpopulações de macrófagos presentes no TME dos melanomas estudados;
- Analisar as principais vias moleculares enriquecidas em cada subpopulação de macrófagos identificada.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DO ESTUDO

O respectivo estudo consta de análises totalmente *in silico*, utilizando dados públicos single-cell RNA seq, analisadas utilizando ferramentas computacionais apropriadas.

4.2 SELEÇÃO DE DADOS

Todos os datasets utilizados no respectivo projeto foram obtidos a partir do banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO) (Barrett et al., 2013), após uma busca minuciosa utilizando como parâmetros de busca os termos “Melanoma”, “Melanoma Acral”, “Melanoma Cutâneo”, “Melanoma Uveal” e “Single-cell RNAseq” e o booleano “AND”; Ademais, conjuntos de dados que não tivessem sido obtidos a partir de biópsias humanas, não continham células imunes e não tinham dados disponíveis

publicamente, foram descartados. Ao final das buscas, 3 estudos foram selecionados para construção da coorte, sendo eles de Melanoma cutâneo (Arnon et al., 2018), acral (Zhang et al., 2022) e uveal (Durante et al., 2020), sendo o primeiro dataset obtido a partir da técnica de *smart-seq2*, enquanto 2 últimos por tecnologia 10x.

4.3 PADRONIZAÇÃO DO GENOMA DE REFERÊNCIA

A fim de evitar irregularidades nas etapas de anotação e integração e para padronizar o estudo, os genes de cada dataset foram re-annotados utilizando a versão do genoma humano de referência hg38. Para isto, um script foi desenvolvido pelo LBBC em linguagem de programação R versão 4.0, e utilizando as bibliotecas Seurat (HAO et al., 2021) para manipulação dos datasets e a anotação gênica foi

realizada com o pacote AnnotationDbi (PAGÈS et al., 2023) e com o banco de dados EnsDb.Hsapiens.v86.

4.4 CONTROLE DE QUALIDADE

Nesta etapa os dados foram tratados e devidamente pré-processados utilizando a linguagem de programação python e a biblioteca para manipulação de dados de scRNA-seq, scanpy (WOLF et al., 2018). Inicialmente um filtro que remove todas as células com no máximo 200 genes foi aplicado e em seguida foi utilizado um script para detecção e remoção de células consideradas outliers com base no número genes únicos detectados em cada célula (nCounts) e no número total de moléculas detectadas dentro de uma célula (nFeatures) com base na fórmula ($x > \text{quantil}(x, 0,75) + 1,5 * IQR(x)$). Posteriormente foi definido que o máximo de genes mitocondriais que cada célula poderia expressar foi de 15% a fim de evitar a presença de células mortas no estudo. Filtros para remoção de conteúdo ribossomal e hemoglobínico também foram aplicados, seguindo cortes de 45% e 10% respectivamente, com exceção do dataset do Arnon *et al.* (Arnon et al., 2018), em que o corte de conteúdo ribossomal foi de 25%. Por fim, o pacote Scrublet foi utilizado para remover células duplicadas ou *Doublets* (WOLOCK et al., 2019)

4.5 PRIMEIRO NÍVEL DE ANOTAÇÃO

Nesta etapa cada dataset foi integrado separadamente utilizando como parâmetro os 3000 genes mais variáveis de cada célula, identificados pela função *pp.highly_variable_genes()* do pacote Scanpy, enquanto a integração foi realizada com uso dos parâmetros padrões do pacote baseado em rede neural, scvi-tools versão 0.2.0 (Gayoso et al., 2022). Para evitar variações sistemáticas oriundas de diferenças experimentais que possam esconder diferenças biológicas entre os grupamentos celulares, utilizamos a correção de efeito de lotes múltiplos associados ao paciente/amostra, tecnologia e subtipo histológico. Após a correção de lotes, o scvi gerou uma representação latente dos dados com dimensionalidade reduzida, preservando as características das células, e em seguida as células foram agrupadas em “*clusters*” utilizando o algoritmo Leiden v0.3.9 (Traag, Waltman e Eck, 2019). As resoluções mais baixas, como 0.3 ou 0.6 são as que identificam menos agrupamentos, enquanto, resoluções maiores eventualmente identificam mais variações e mais grupamentos celulares. (Traag, Waltman e Eck, 2019) Para o

respectivo estudo foram utilizadas as resoluções de 0.8 e 1.4. Após as etapas de integração e clusterização, o scanpy foi utilizado para realizar a anotação manual de cada *cluster* celular baseado na expressão de marcadores específicos para as linhagens celulares a serem buscadas. Visto que esta foi a primeira anotação, optamos por anotar os grupos celulares de forma mais generalista, sendo eles: Mielóides (Marcadores: *AIF1*, *CD163*, *LYZ* e *CD68*), células B plasmáticas (*MZB1*), células B foliculares (*MS4A1*), linfócitos T e NK (*CD3D*, *NKG7*, *CD8A* e *CD3E*), mastócitos (*TPSAB1* e *TPSB2*), queratinócitos (*KRT7*, *KRT19*), melanócitos (*PRAME*, *MLANA* e *PMEL*), células endoteliais (*CLDN5*, *VWF*, *CDH5* e *ESM1*), fibroblastos (*CLDN5*, *COL1A1* e *LUM*), pericitos (*RGS5* e *PDGFRB*), pDC (*LILRA4*, *TCF4* e *IRF8*) e exclusivamente para o dataset de melanoma uveal foram utilizados marcadores para fotorreceptores (*RGR*, *RHO*, *ROM1*, *RPE65* e *RCVRN*). Os *clusters* sem assinatura gênica definida foram considerados *doublets* ou células em baixa resolução e foram removidos para as próximas etapas. No mais, o algoritmo baseado no método bayesiano foi utilizado para detectar e remover o RNA ambiente/contaminante usando cada corrida como um parâmetro de efeito de lote (Yang et al., 2020)

4.6 Identificação de subpopulações de macrófagos

Após integração dos datasets a subpopulação celular anotada como mielóide foi separada das demais e clusterizada novamente utilizando as mesmas ferramentas e os mesmos parâmetros de correção de efeito de lote. Posteriormente as células mielóides foram anotadas utilizando marcadores conhecidos da literatura e separadas em monócitos (*S100A12*, *FCN1*, *S100A8*, *S100A9*, *VCAN*, *FCGR3A*, *LST1*, *LILRB2*), macrófagos (*APOE*, *APOC1*, *SPP1*, *C1QB*, *C1QA*, *FOLR2*, *CD14*, *CSF3R*, *IFITM1*) e DCs (*FCER1A*, *CD1C*, *CD1E*, *PPA1*, *CLEC9A*, *LAMP3*).

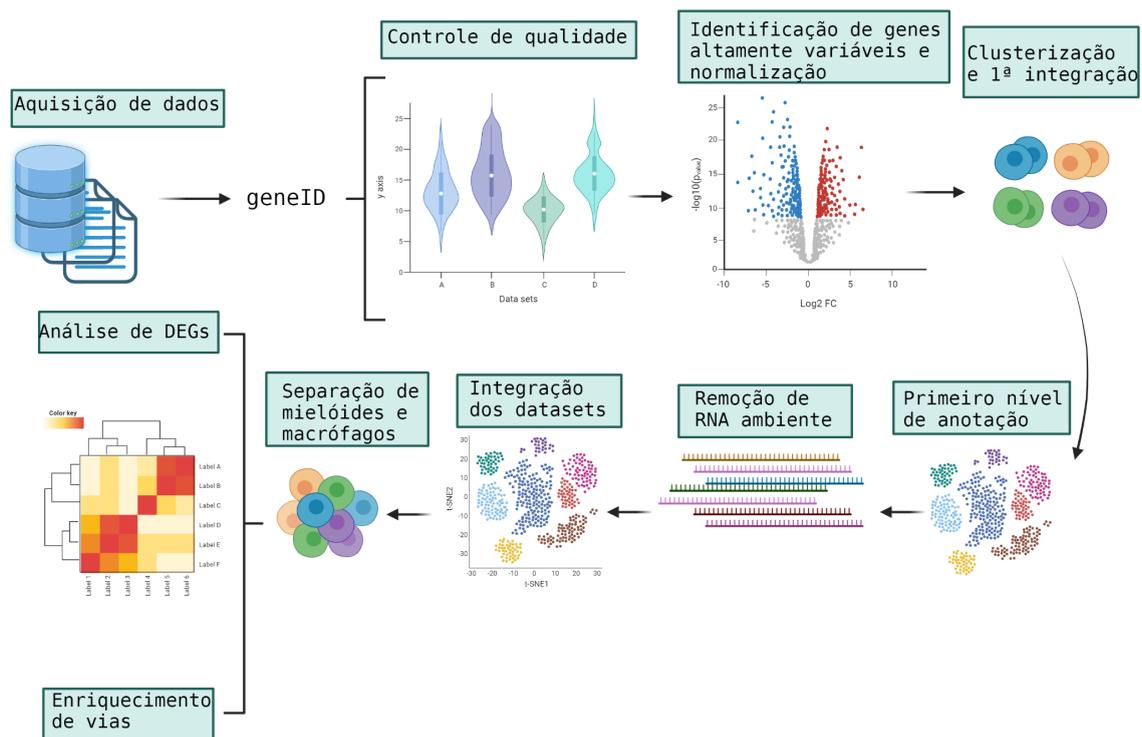
Por fim, os macrófagos também foram isolados das demais subpopulações e clusterizados utilizando a mesma metodologia. Devido à alta semelhança entre marcadores nas diferentes subpopulações, a ferramenta baseada em aprendizado de máquina, celltypist (Conde et al., 2022) foi utilizada para realizar a identificação de cada população utilizando como base um dataset com uma ampla variedade de populações de macrófagos já anotados com a presença de TAMs residentes e recrutados, além dos fenótipos: Associados à hipóxia, angiogênese, lipídeos, IFN, apresentadores de antígenos e intersticiais, realizada anteriormente no laboratório

de bioinformática e biologia computacional (LBBC) (Guimarães et al., 2023), utilizando a resolução *leiden_1.8*. Todas as informações obtidas pelo celltypist foram verificadas cautelosamente com base na expressão de marcadores já relatados na literatura, bem como nos genes diferencialmente expressos (*DEGs*).

4.7 Análise de enriquecimento de vias

Para identificar quais vias eram predominantes e enriquecidas em cada subpopulação anotada baseada nos seus genes diferencialmente expressos, foi usada a biblioteca *gseapy*, e tendo como referência o bancos de dados *Molecular Signatures Database* (*MsigDB*) e um cutoff de valor de $p = 0,05$ (Liberzon et al., 2015).

Figura 6: Panorama do fluxo de trabalho empregado no projeto.



Fonte: Autor, 2023. Figura feita no *Biorender*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA COORTE

A seleção dos dados do estudo visou contemplar 3 dos principais subtipos de melanoma (uveal, acral e cutâneo), para isso apenas amostras oriundas de

biópsias humanas que contivessem células imunes e dados públicos disponíveis foram escolhidos. Após a triagem, 3 estudos foram selecionados, sendo eles: Durante *et al.*, (Durante et al., 2020) representando dados de 11 pacientes com melanoma uveal, onde destes, 8 eram de tumor primário e 3 de metástases hepáticas ; Zhang *et al.* (Zhang et al., 2022), contendo 6 amostras de melanoma acral e 3 de melanoma cutâneo. Por fim, representando 1 amostra de melanoma acral e 32 de cutâneo (sendo 3 tumores primários), o dataset do Arnon *et al.* (Arnon et al., 2018) une dados obtidos pelo mesmo e de um estudo publicado em 2016 por Tirosh *et al.* (Tirosh et al., 2016). Dos dados analisados, apenas o Arnon *et al.* processou suas amostras utilizando a técnica de Smart-seq2, enquanto os estudos de Zhang e Durante foram realizados utilizando a técnica 10x Genomics, embora o estudo do Arnon represente um maior percentual (62%) devido ao N de pacientes (Figura 7a-b)

Ao analisar os metadados, observa-se uma maior representatividade numérica para amostras de pacientes com melanoma cutâneo (N:35, 66%), seguido por uveal (N:11, 21%) e acral (N:7, 13%). Por outro lado, a maioria das amostras obtidas foi proveniente de pacientes com metástases (N:32, 60%), dos quais apenas 3 eram de melanoma uveal, e os demais de melanoma cutâneo. Uma camada nos metadados também foi criada a fim de observar a quantidade de pacientes que forneceram amostras de sítios primários (N:21, 40%) ou metastáticos (N:32, 60%). (Figura 7c-d)

Observa-se também que nos dados selecionados houve uma predominância de amostras provenientes de indivíduos do sexo masculino (N:35, 66%) (Figura 7e).

Apesar de não existir, até o momento, nenhuma correlação genética ou molecular que justifique a maior prevalência de casos de melanoma em homens do que em mulheres, alguns pesquisadores levantam a hipótese de que tais achados possam estar relacionados única e exclusivamente com diferenças comportamentais entre os gêneros, visto que mulheres tendem a cuidar mais da pele, especialmente com o uso de protetor solar (Bellenghi et al., 2020).

Não surpreendentemente, a maioria dos pacientes possuíam mais de 50 anos de idade, sendo o grupo mais expressivo o de 60 à 70 anos de idade, representando 31% (N:16) dos indivíduos (Figura 7f). Tais dados são compatíveis com a literatura, visto que pessoas mais velhas, especialmente idosos, são os grupos mais suscetíveis ao desenvolvimento de melanoma devido ao tempo de

exposição, fragilidade da pele e acúmulo de mutações ao longo do tempo (Elder et al., 2020).

Por fim, uma camada relacionada ao recebimento ou não de alguma forma de terapia também foi criada, sendo separados em pacientes tratados ou não. Apesar de ainda representar um valor significativo de 34% (N:18), apenas o estudo do Arnon *et al* disponibilizou a informação quanto aos pacientes que receberam terapias, dos quais 18 receberam pelo menos algum tipo de anticorpo monoclonal (Figura 7g).

Os demais estudos não informaram sobre o recebimento ou não de algum tipo de terapia.

Figura 7: Caracterização da coorte em frequência relativa das amostras de cada paciente. **A)** Frequência por estudo. **B)** Frequência por tecnologia. **D)** Frequência por subtipo histológico. **D)** Frequência por estadiamento. **E)** Frequência por sexo. **F)** Frequência por faixa etária. **G)** Frequência por recebimento ou não de tratamento.

A)			B)		
Estudo	N	Frequência Relativa	Tecnologia	N	Frequência Relativa
Arnon et al.	33	62%	10x	20	38%
Zhang et al.	9	17%	Smart-seq2	33	62%
Durante et al.	11	21%			

C)			D)		
Subtipo Histológico	N	Frequência Relativa	Estadiamento	N	Frequência Relativa
Cutâneo	35	66%	Primário	21	40%
Acral	7	13%	Metastático	32	60%
Uveal	11	21%			

E)			F)		
Sexo	N	Frequência Relativa	Faixa Etária	N	Frequência Relativa
M	35	66%	30-40	1	2%
F	18	34%	40-50	3	6%
			50-60	10	19%
			60-70	16	31%
			70-80	13	25%
			80-90	9	17%

G)		
Tratamento	N	Frequência Relativa
Em tratamento	18	34%
Não tratado/não informado	35	66%

Fonte: Autor 2023.

5.2 CONTROLE DE QUALIDADE

Um fluxo de trabalho extremamente rigoroso foi realizado nas etapas de pré-processamento e controle de qualidade dos dados, o qual foi dividido em 3 etapas: 1) Remoção de células que apenas contivessem um máximo de 200 genes,

2) Remoção de *outliers* de *nCounts* e *nFeatures*, juntamente com a aplicação de um corte mínimo de 15% de porcentagem mitocondrial, 45% de ribossomal e 10% de conteúdo hemoglobínico 3) Remoção de *doublets*.

O número inicial de células é referente à quantidade de células obtidas a partir da obtenção dos dados brutos de cada estudo. A tecnologia de sequenciamento 10x é uma técnica baseada em gotículas contendo *barcodes* específicos para cada célula que será englobada pela respectiva gotícula, entretanto, muitas dessas gotículas podem permanecer vazias e passar para as etapas subsequentes do sequenciamento (Wang et al., 2021), fazendo assim com que muitas vezes haja uma quantidade significativa de gotículas vazias, fator este que poderia explicar uma maior porcentagem relativa de exclusão nos datasets que utilizaram esta metodologia, frente ao estudo do Arnon que utilizou a técnica de Smat-seq2 (Figura 8).

Figura 8: Panorama do controle de qualidade com valores absolutos de células após cada etapa e porcentagem de células excluídas em relação ao seu valor absoluto inicial.

Estudo	Nº inicial de células	Filtro 1	Filtro 2	Nº final de células	Porcentagem Relativa de Exclusão
Arnon et al.	7186	7186	6868	6442	10% 
Zhang et al.	95002	94000	71263	70298	26% 
Durante et al.	253582	129801	83211	82683	67% 

Fonte: Autor, 2023

5.3 PRIMEIRO NÍVEL DE ANOTAÇÃO E REMOÇÃO DO RNA AMBIENTE

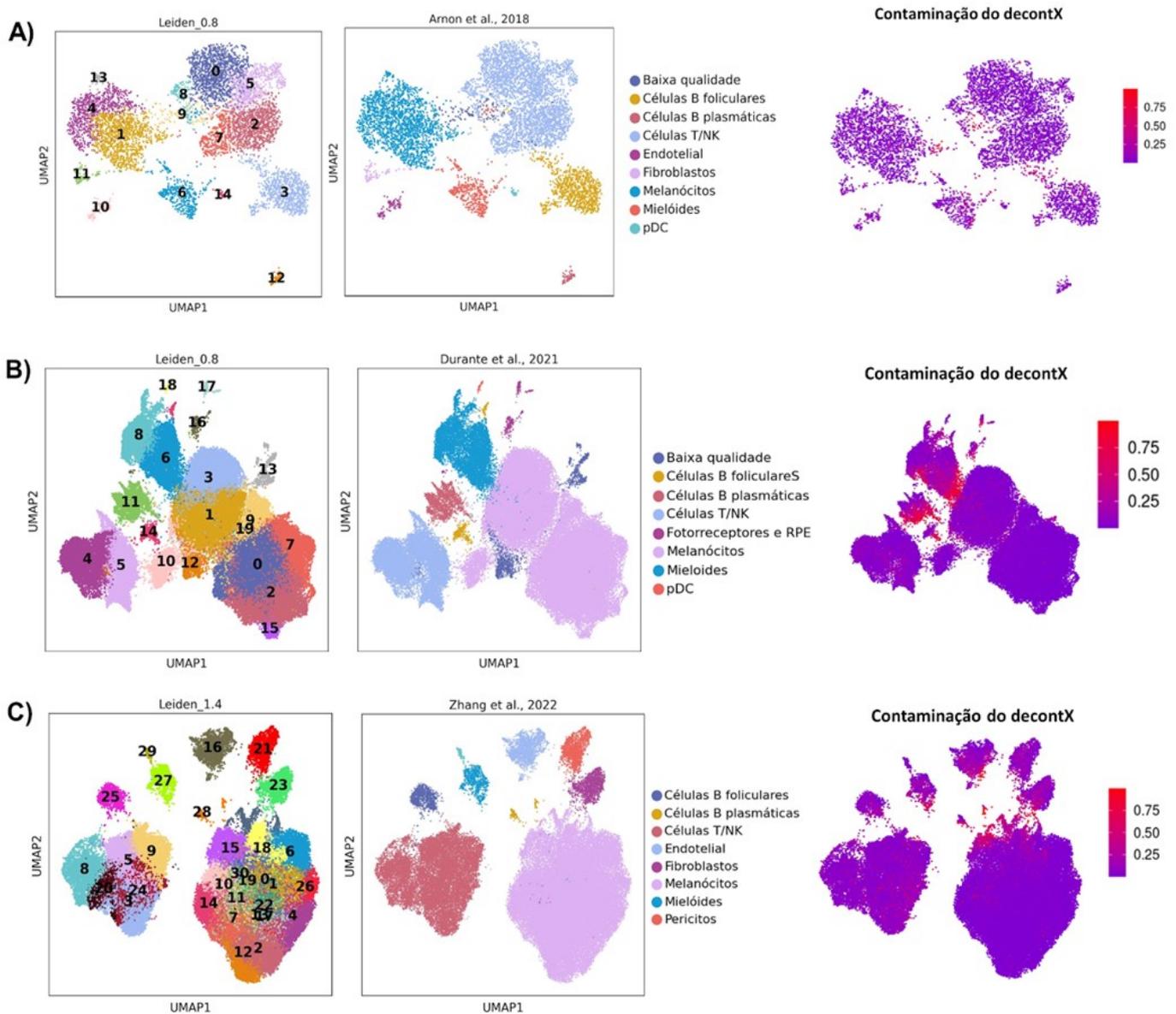
Visto que a contaminação por RNA ambiente é variável e intrínseco de cada estudo, cada *dataset* foi integrado e seus subtipos celulares majoritários foram anotados de forma mais generalista, a fim de evitar discrepâncias nas etapas posteriores de integração. Ademais, *clusters* que não obtiveram marcadores significativamente expressos ou não possuísem identidade definida, foram considerados *clusters* de baixa qualidade e removidos do estudo. Por fim, após a anotação, cada *dataset* foi submetido à ferramenta *DecontX* para identificação e remoção de moléculas de RNA ambiente (Figura 9).

Apesar dos tipos celulares terem apresentado proporções semelhantes entre

si, algumas diferenças puderam ser observadas, como é no caso do *dataset* do Durante *et al* (Durante et al., 2020), de melanoma uveal, onde não foram identificados fibroblastos e nem células endoteliais, além da presença de células específicas do sítio histológico ocular, sendo elas os fotorreceptores e as células do epitélio pigmentar da retina, os quais foram anotados como um único grupo celular (Figura 9b).

Diferentemente dos datasets do Arnon *et al* (Figura 9a) e Durante *et al* (Figura 9b) em que a resolução *leiden_0.8* foi o suficiente para separar os *clusters* de interesse, nos dados do Zhang *et al* observou-se que nesta mesma resolução marcadores de fibroblastos e pericitos marcaram em locais diferentes do mesmo *cluster* celular indicando que uma resolução maior seria necessária para identificar e separar estes dois grupos celulares, sendo assim notamos que esta distinção só foi possível a partir da resolução *leiden_1.4* (Figura 9c).

Figura 9: Primeiro nível de anotação para cada estudo individualmente e identificação de RNA ambiente onde cada ponto no UMAP representa uma célula. **A)** Arnon *et al.*, 2018 na resolução *leiden_0.8* **B)** Durante *et al.*, 2020 resolução *leiden_0.8*. **C)** Zhang *et al.*, 2022 *leiden_1.4*.



Fonte: Autor, 2023.

5.4 Panorama da integração e do primeiro nível de anotação

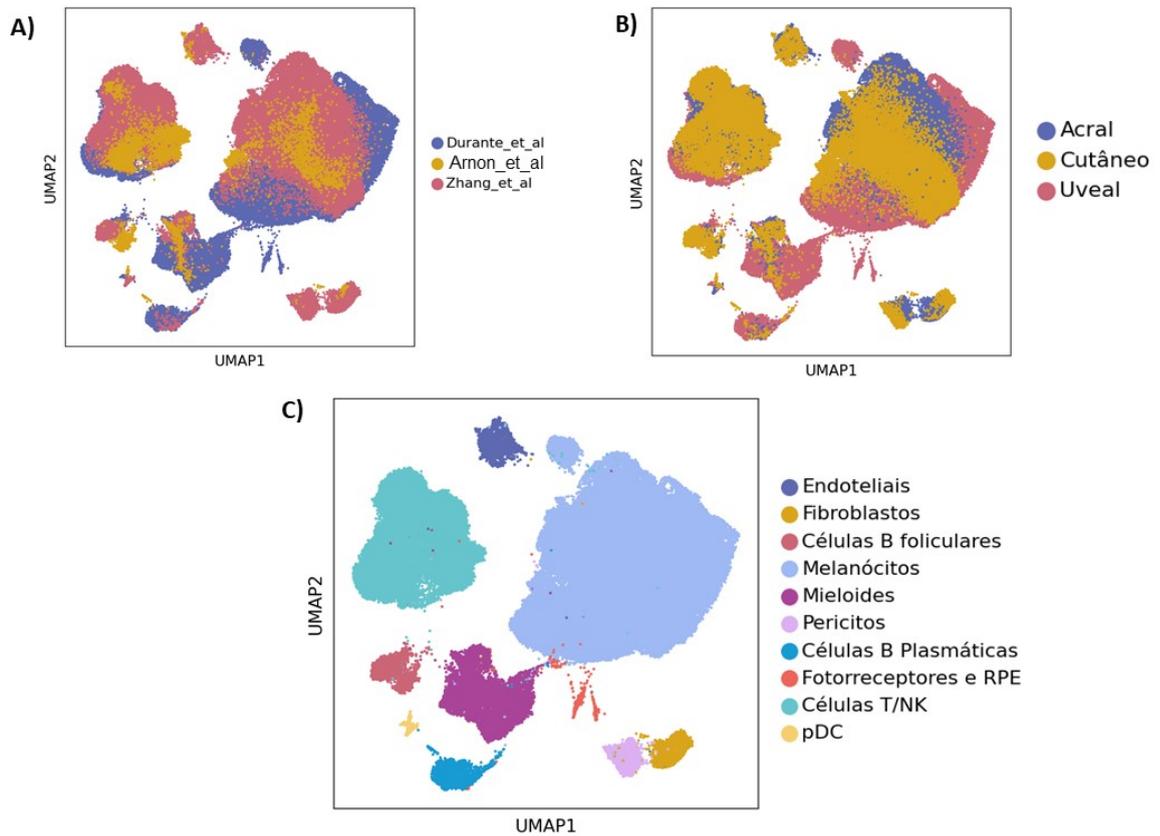
Após as etapas de pré-processamento, incluindo a remoção de clusters de baixa qualidade nos datasets individuais, 157.840 células de diferentes estudos e

subtipos de melanoma foram integradas, onde destas, 106660 foram os melanócitos expressando os marcadores canônicos *MLANA*, *PMEL* e *PRAME*, representando o maior grupo celular, seguido por: Células T/NK (31.820) expressando *CD3D*, *NKG7*; mieloides (9.285) expressando *LYZ*, *AIF1* e *CD163*; B foliculares (2.297) expressando *MS4A1*; B plasmáticas (2.177) expressando *MZB1*; endoteliais (1.983) expressando *CLDN5* e *VWF*; pericitos (1.511) expressando *PDGFRB*; fibroblastos (1.482) expressando *COL1A1*; fotorreceptores e RPE (424) expressando *RCVRN* e *RPE65* respectivamente e pDC (201) expressando *LILRA4* (Figura 11). De modo geral as proporções celulares são semelhantes às observadas nos demais tumores, com alta prevalência de células imunes infiltrantes, como é o caso dos linfócitos T e NK, seguidos das células mielóides, englobadas por macrófagos residentes e recrutados, monócitos e DCs, além de uma presença significativa de linfócitos B foliculares e plasmocitóides (Figura 10c). Tal perfil imunológico é condizente com a literatura visto que o melanoma compõe um TME altamente inflamatório, induzindo um recrutamento de células circulantes e periféricas (Greten and Grivennikov., 2019).

Em todos os estudos, apenas amostras de melanoma foram sequenciadas e processadas, sem o uso de grupos controle. Observa-se também que mesmo sendo provenientes de tecnologias diferentes como no caso do estudo do Arnon *et al* que foi processado em sequenciado pela metodologia Smart-seq2, enquanto os demais foram por 10x *genomics*, não houve separação por tipo de tecnologia durante a integração. Ademais é notável a boa distribuição por subtipo histológico, onde cada um possui quantidades e proporções semelhantes de células e grupos celulares (Figura 10 a-b).

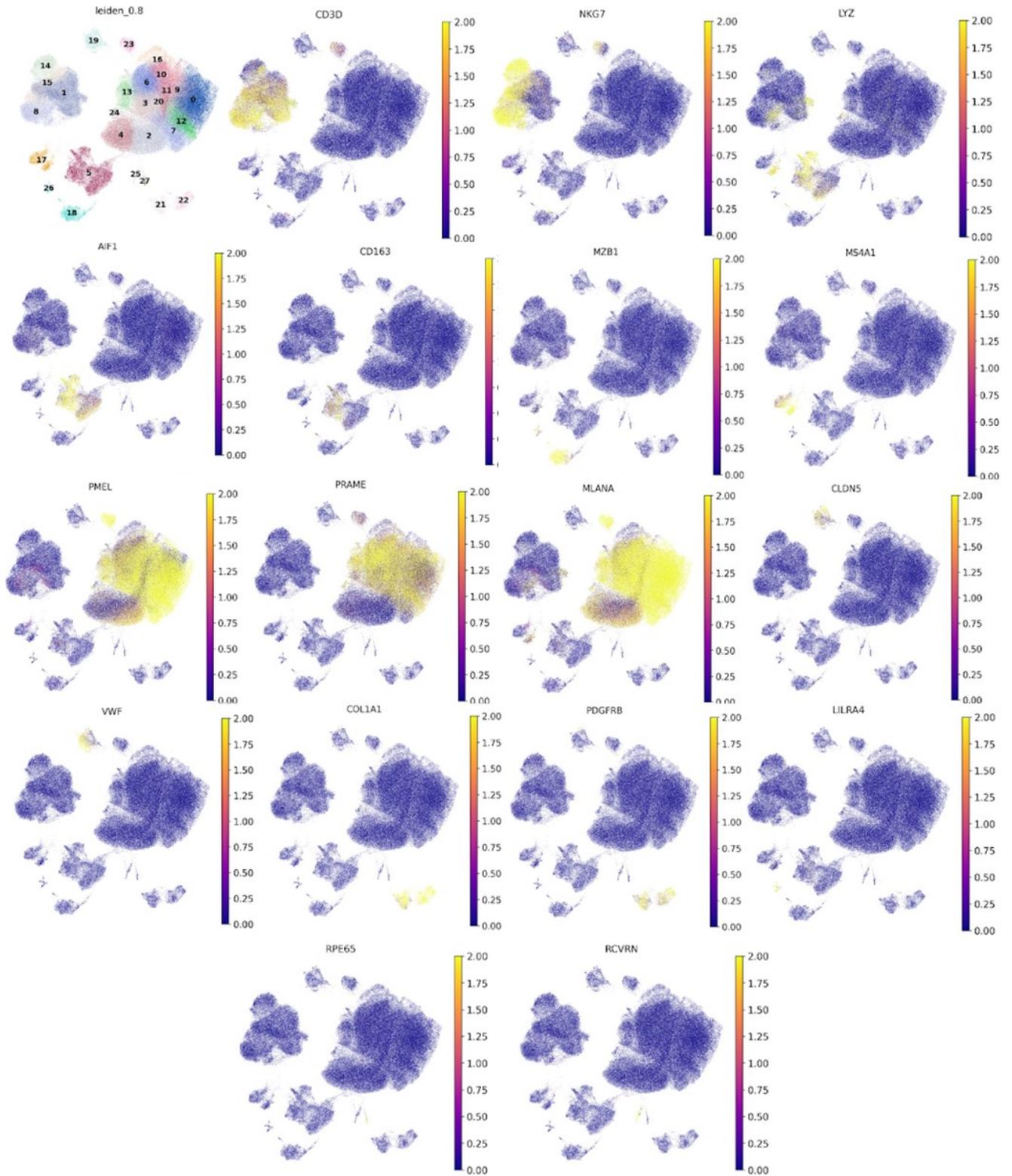
Figura 10: Panorama geral dos datasets integrados.

A) Dados integrados marcados por estudo. **B)** Datasets integrados marcados por subtipos histológicos. **C)** Primeiro nível de anotação visualizado nos datasets integrados.



Fonte: Autor, 2023.

Figura 11. Expressão de genes canônicos no primeiro nível de anotação. UMAP da densidade de expressão dos genes canônicos juntamente um UMAP representando a posição dos *clusters* na resolução de 0.8.



Fonte: Autor, 2023.

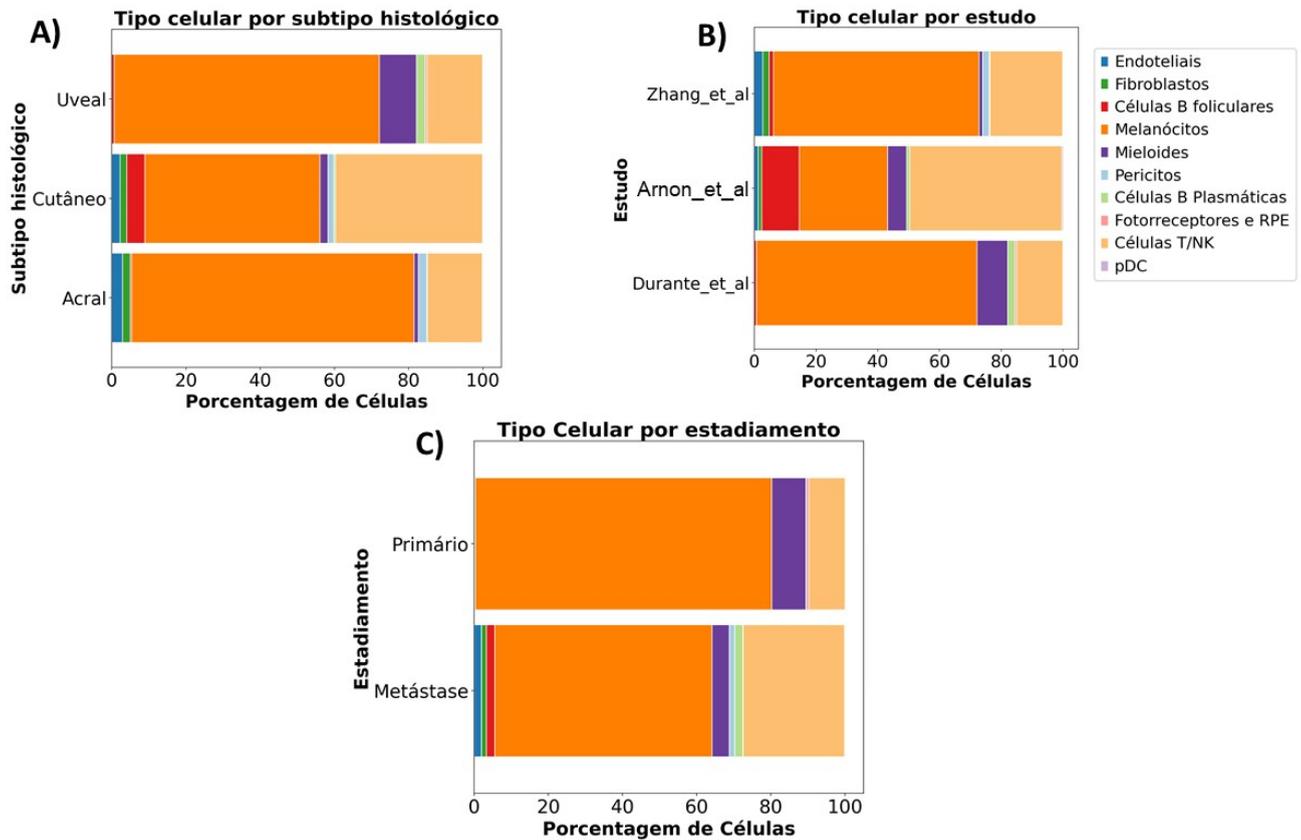
Ao observar a distribuição celular por subtipo histológico, nota-se que em amostras de melanoma acral o percentual de células mielóides foi expressivamente

menor do que em amostras de cutâneo e uveal, enquanto o mesmo também apresentou maiores proporções de células malignas quando comparado ao total de células. As amostras de melanoma uveal e cutâneo por outro lado foram as que apresentaram maiores quantidades de células imunes em valores percentuais, sendo as amostras de uveal com maiores quantidades de células mielóides e os melanomas cutâneos com maiores proporções de linfócitos T/NK, fato este que pode ser explicado pela presença de 3 amostras de metástase hepática onde há alta ocorrência de células de Kupffer (Figura 12a). Tais dados também são compatíveis com as proporções celulares e valores absolutos (Figura 13a), visto que cada estudo representa um tipo majoritário de melanoma, com exceção dos dados do Zhang *et al*, onde das mais de 70 mil células, cerca de 40 mil são de melanoma acral e 30 mil de cutâneo, explicando assim as diferenças observadas entre os subtipos histológicos e entre os valores celulares observados nos estudos (Figura 12b). Devido a grande quantidade amostras metastáticas em linfonodos, baço e regiões com alta predominância dos mesmos nos dados do Arnon *et al*, não é surpreendente uma maior presença de células B foliculares neste estudo, enquanto as células B plasmáticas especializadas na produção de anticorpos foram encontradas de forma significativa nos dados de melanoma uveal, em especial nas amostras de metástase hepática, visto que diferente das foliculares, as células plasmáticas podem ser encontradas em tecidos altamente inflamados (Jia et al., 2021; Helmink et al., 2020).

Ao analisar as diferenças entre tipos celulares em amostras primárias e metastáticas, observa-se também uma prevalência tanto percentual quanto absoluta de células linfóides T e NK em sítios metastáticos, sendo compatível com dados na literatura que sugerem um TME extremamente inflamatório e com mais infiltrados imunológicos, embora a caracterização do estudo não permita a identificação do perfil fenotípico destas células (Figura 12c).

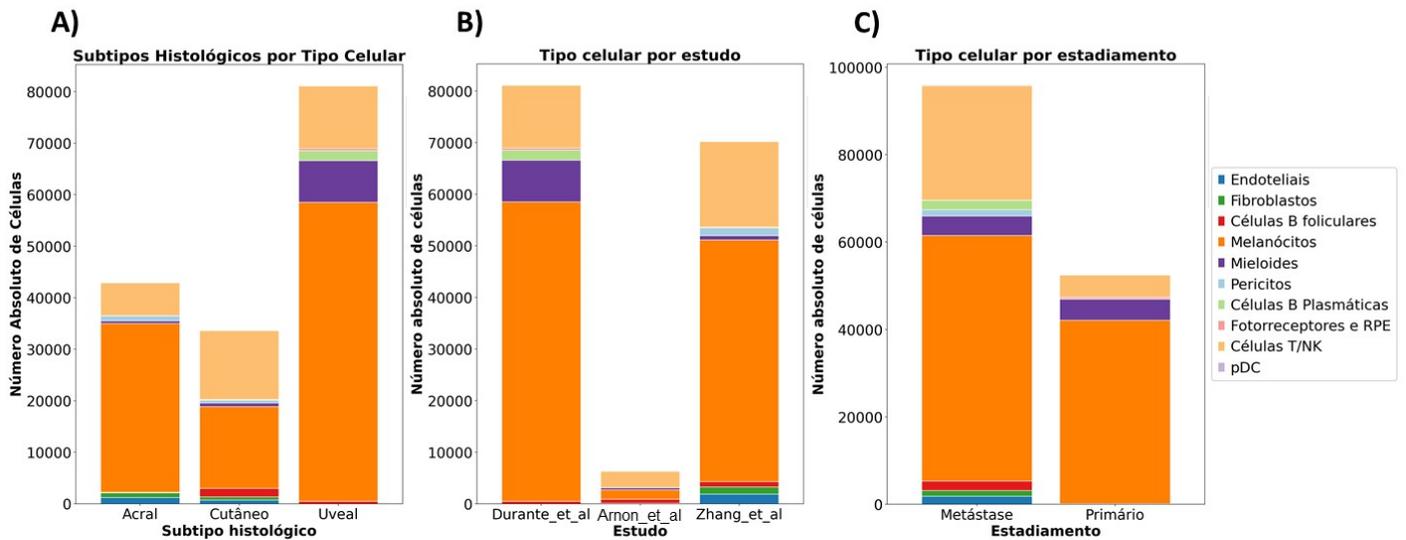
Figura 12: Distribuição relativa dos tipos celulares com relação à: **A) Subtipo histológico.** Acral.
 Melanócitos: 76%; Linfócitos T/NK: 14%; Endoteliais: 2,8%; Pericitos: 2,3%; Fibroblastos: 2%;
 Mieloides: 1,1%; Cél. B Foliculares: 0,3%; pDC: 0,2%; Cél. B plasmáticas: 0,15%; Cutâneo.
 Melanócitos: 47%; Linfócitos T/NK: 39%; Cél. B foliculares: 4,8%; Endoteliais: 2,2%; Mieloides:

2,15%; Fibroblastos: 1,79%; Pericitos: 1,5%; Cél. B plasmáticas: 0,47; pDC: 0,12%; Uveal. Melanócitos: 71%; Linfócitos T/NK: 14,94%; Mieloides: 9,9%; Cél. B plasmáticas: 2,4% Cél. B foliculares: 0,6%; Fotorreceptores e RPE: 0,5%; pDC: 0,08% **B) Estudo.** Durante: Melanócitos: 71%; Linfócitos T/NK: 14,94%; Mieloides: 9,9%; Cél. B plasmáticas: 2,4% Cél. B foliculares: 0,6%; Fotorreceptores e RPE: 0,5%; pDC: 0,08%; Arnon. Linfócitos T/NK: 49%; Melanócitos: 28%; Cél. B foliculares: 12%; Mieloides: 6%; Endoteliais: 1,2%; Fibroblastos: 1,1%; Cél. B plasmáticas: 0,9%; pDC: 0,3%; Zhang: Melanócitos: 66%; Linfócitos T/NK: 23%; Endoteliais: 2,7%; Pericitos: 2,1%; Fibroblastos: 2,0%; Cél. B foliculares 1,4%; Mieloides: 1,1%; Cél. B plasmáticas: 0,23%; pDC: 0,14%. **C) Estadiamento.** Metástase: Melanócitos: 58%; Linfócitos T/NK: 27%; Mieloides: 4,6%; Cél. B foliculares: 2,2%; Cél. B plasmáticas: 2,1%; Endoteliais: 1,95%; Pericitos: 1,5%; Fibroblastos: 1,3%; pDC: 0,19%; Fotorreceptores e RPE: 0,04%; Primário: Melanócitos: 79%; Linfócitos T/NK: 9,7%; Mieloides: 9,2%; Fotorreceptores e RPE: 0,7%; Cél. B Foliculares: 0,2%; Cél. B plasmáticas: 0,1%; Endoteliais: 0,06%; pDC: 0,02%; Fibroblastos: 0,0019%.



Fonte: Autor, 2023.

Figura 13: Distribuição absoluta dos tipos celulares com relação à: **A)** Subtipo histológico. Acral: 42993 células; Cutâneo: 33646; Uveal: 81201 **B)** Estudo. Durante: 81201; Arnon: 6341; Zhang: 70298 **C)** Estadiamento. Metástase: 95972; Primário: 52475.



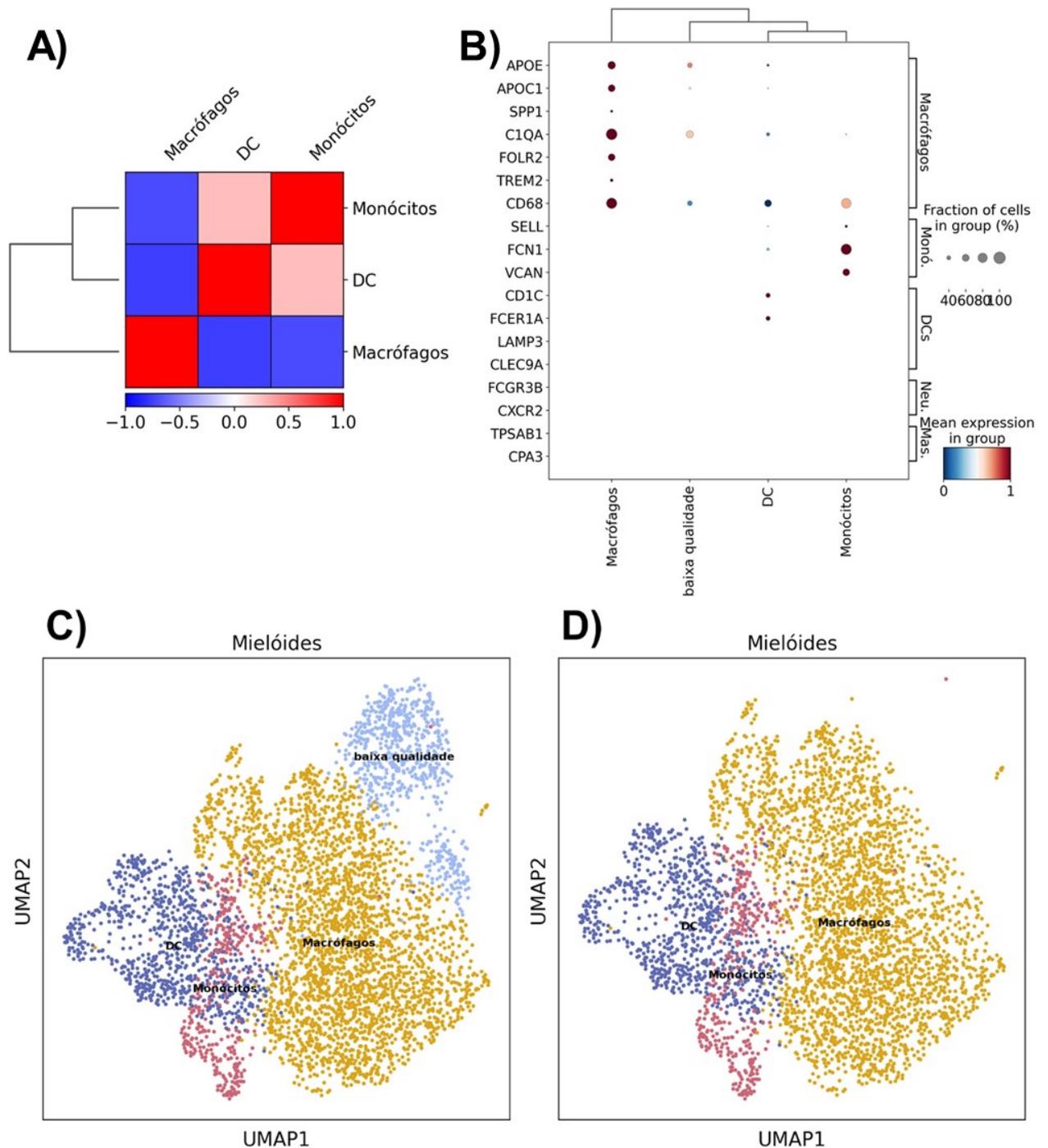
Fonte: Autor, 2023.

5.5 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS MIELÓIDES

Antes de caracterizar as subpopulações de macrófagos, a população referente às células mielóides foi separada e re-clusterizada, utilizando os mesmos parâmetros anteriores, porém adicionando a etapa que consistiu na retirada de efeitos de lote que continham menos de dez células. Os fagócitos mononucleares foram subdivididos em 3 tipos celulares: DCs (*CD1C*, *FCER1A*, *LAMP3*, e *CLEC9A*), Monócitos (*SELL*, *FCN1* e *VCAN*) e Macrófagos (*APOE*, *APOC1*, *SPP1*, *C1QA*, *FOLR2*, *TREM2* e *CD68*). Marcadores para neutrófilos (*FCGR3B*, *CXCR2*) e mastócitos (*TPSAB1*, *CPA3*) também foram utilizados, entretanto estes grupos celulares não foram identificados, provavelmente devido à limitações das técnicas de single-cell, especialmente 10x onde estas células geralmente morrem durante o processamento. (Figura 14a-b). Ademais, 2 *clusters* não marcaram de forma significativa para os marcadores canônicos utilizados, além de terem apresentando genes diferencialmente expressos para marcadores mitocondriais, fazendo assim com que estes fossem considerados de baixa qualidade e retirados do estudo, restando assim 4104 células mielóides, das quais 2864 foram macrófagos, 852 foram DCs e 388 monócitos (Figura 14c-d).

Figura 14: Representação dos marcadores e dos clusters de células mielóides. **A)** Mapa de correlação entre as populações identificadas. **B)** Dotplot da expressão de marcadores canônicos entre os grupos identificados. **C)** UMAP dos grupos celulares identificados antes da retirada das

células de baixa qualidade. **D)** UMAP dos grupos celulares identificados após a retirada das células de baixa qualidade.



Fonte: Autor, 2023.

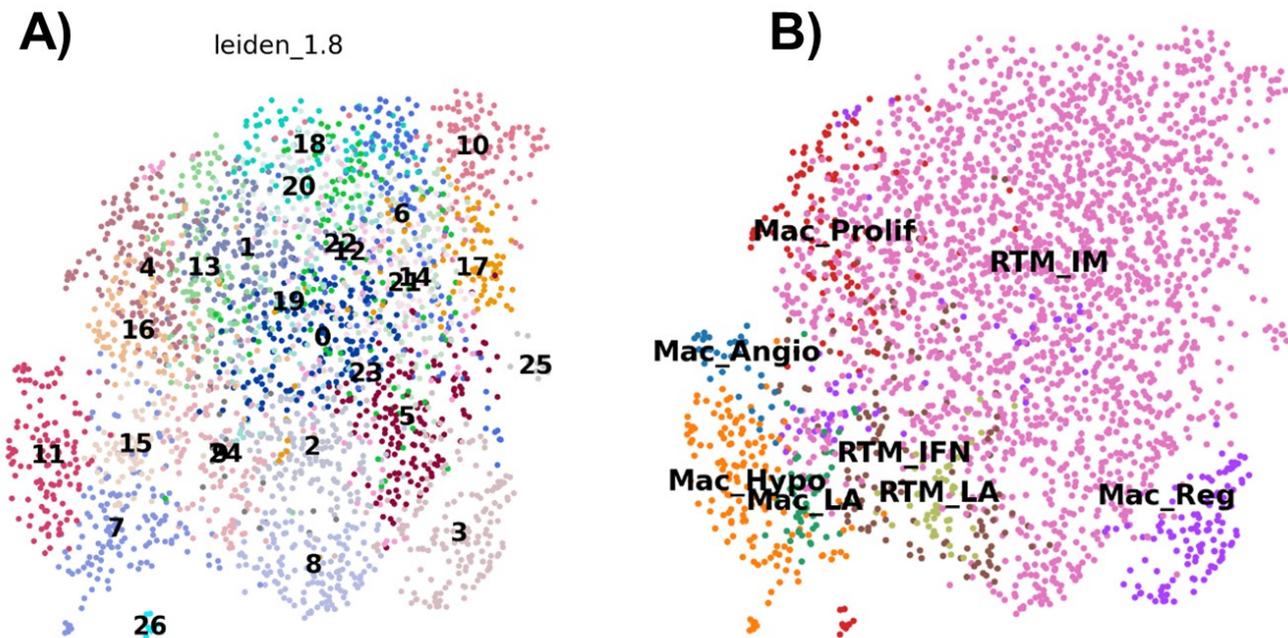
5.5.1 MACRÓFAGOS

Após a anotação das células mielóides, os macrófagos foram separados dos monócitos e DCs e re-clusterizados e novamente retirando os *batches* com menos

de 10 células, resultando em 2814 células. Para realizar a anotação das subpopulações a ferramenta *celltypist* foi utilizada como um dos parâmetros para a caracterização, utilizando como base um dataset já anotado de diferentes subtipos de macrófagos proveniente de análises realizadas em um estudo paralelo do LBBC (Guimarães et al., 2023). Juntamente ao *celltypist*, a análise de marcadores canônicos também foi visualizada de modo que pudessem ser comparados com o resultado da ferramenta. A partir da votação majoritária do *celltypist*, 8 subpopulações de macrófagos residentes e recrutados foram identificadas, sendo elas: Residentes intersticiais (RTM-IM), residentes associados à IFN (RTM-IFN), residentes associados à lipídeos (RTM-LA), recrutados associados à angiogênese (Mac_angio), recrutados proliferativos (Mac_prolif), recrutados associados à hipóxia (Mac_Hypo), recrutados regulatórios (Mac_reg) e recrutados associados à lipídeos (Mac_LA) (Figura 15).

Figura 15: Umap das subpopulações de macrófagos detectadas pelo *celltypist*. **A)** UMAP representando todos os *clusters* na resolução *leiden_1.8*. **B)** UMAP representando as subpopulações de macrófagos detectadas pelo *celltypist*. Macrófagos tecido-residentes foram nomeados de “RTM” (do inglês *resident-tissue macrophages*) e os macrófagos recrutados receberam apenas a

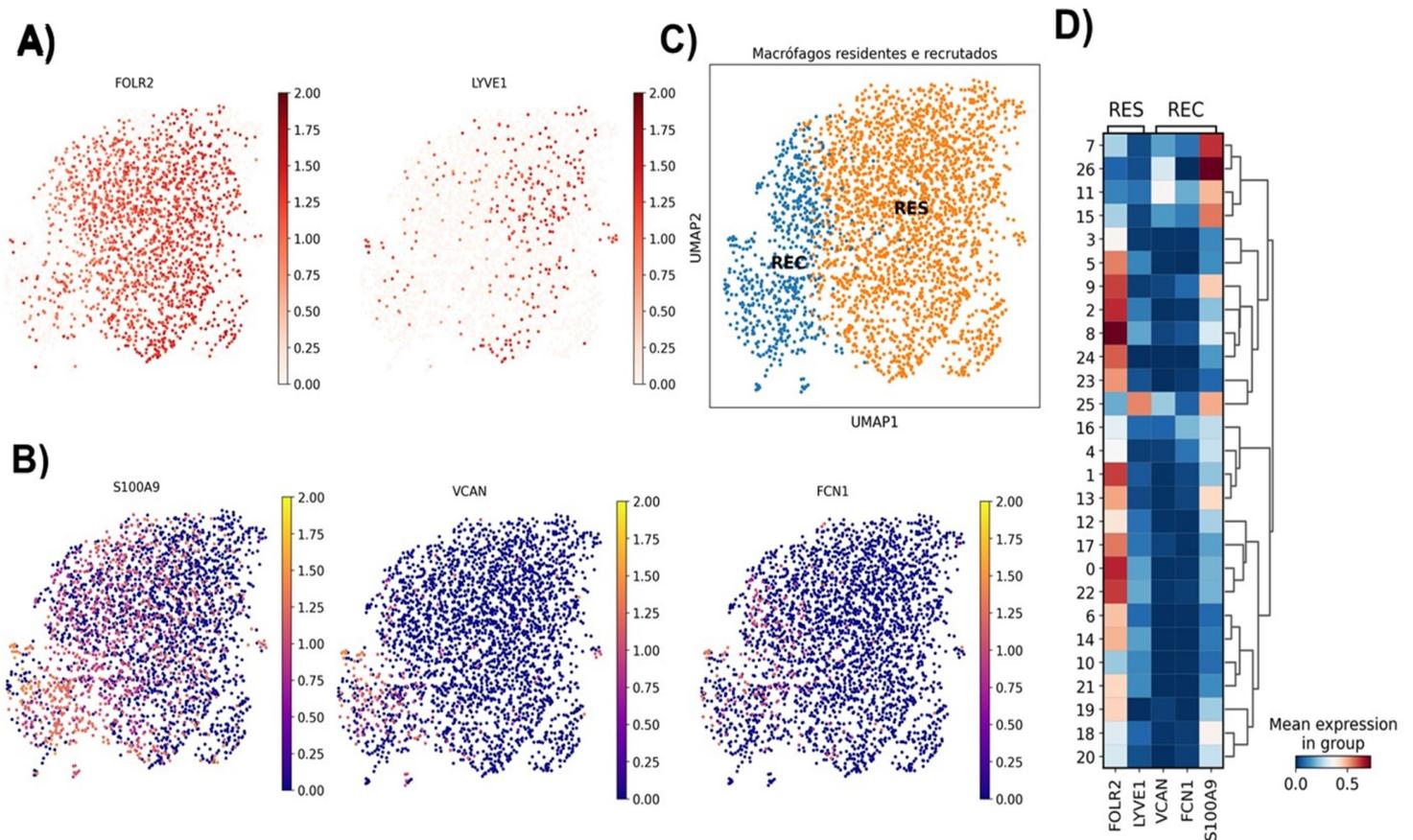
denominação de “Mac”. As populações detectadas pela ferramenta foram: Residentes intersticiais (RTM-IM); residentes associados à IFN (RTM-IFN); residentes associados à lipídeos (RTM-LA); Macrófagos regulatórios (Mac-reg); Macrófagos associados à lipídeos (Mac-LA); Macrófagos associados à hipóxia (Mac-hypo); Macrófagos associados à angiogênese (Mac-Angio); Macrófagos associados a proliferação (Mac-prolif).



Fonte: Autor, 2023.

Figura 16: Distribuição de macrófagos residentes e recrutados. **A)** UMAP representando a expressão dos marcadores FOLR2 e LYVE1 associados a macrófagos residentes (RES). **B)** UMAP representando a expressão dos marcadores S100A9, VCAN e FCN1 associados a macrófagos recrutados (REC). **C)** UMAP representando a distribuição de macrófagos residentes e recrutados. **D)**

Matrixplot representando a expressão dos marcadores em cada cluster na resolução *leiden_1.8*.



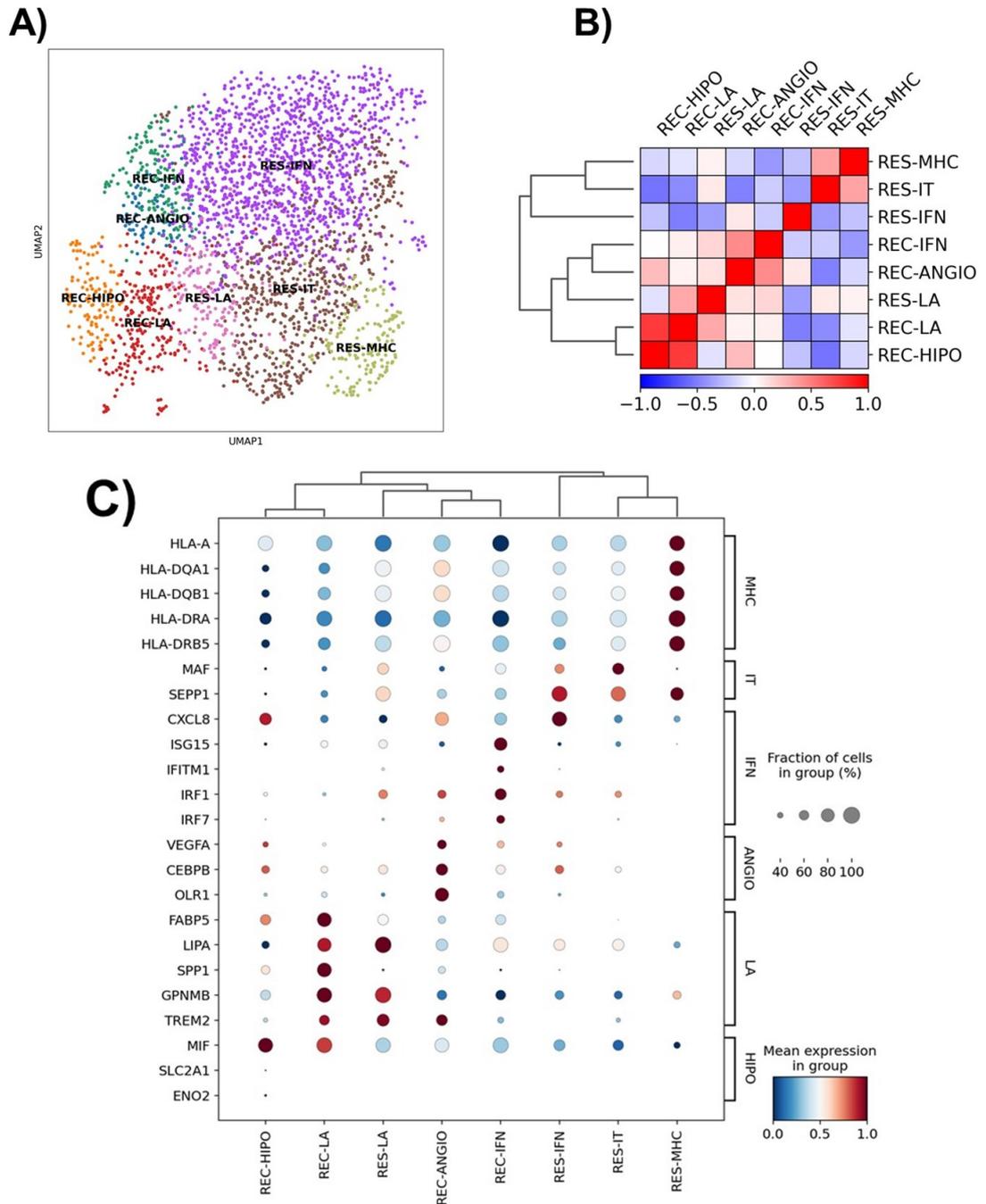
Fonte: Autor, 2023.

Após os resultados do *celltypist*, a visualização dos marcadores foi primeiramente separada entre residentes (*FOLR2*, *LYVE1*) (Figura 16a-d) e recrutados com marcadores derivados de monócitos (*VCAN*, *FCN1* e *S100A9*) (Figura 16b-d). Foram identificados 2195 macrófagos residentes (Figura 16c) dos quais englobam subpopulações de macrófagos associados à IFN (RES-IFN), contendo o marcador *CXCL8*, representando a maior subpopulação com 1305 células; Intersticiais (RES-IT), com os marcadores *MAF* e *SEPP1* (583 células); Residentes associados à lipídeos (RES-LA) com os marcadores *LIPA*, *GPNMB*, *TREM2*, contendo 147 células; Residentes apresentadores de antígenos, que devido a sua alta expressão de MHC foram classificados como RES-MHC (marcadores) (160 células). Os macrófagos recrutados por outro lado constituíram um total de 619 células (Figura 16c), apresentando 4 subpopulações, dentre as quais: Macrófagos associados à lipídeos (REC-LA) marcados por *FABP5*, *LIPA*, *SPP1*, *GPNMB*,

TREM2 e com 244 células; macrófagos associados à IFN (REC-IFN) com os marcadores *ISG15*, *IFITM1*, *IRF1* e *IRF7* e 160 células; macrófagos associados à hipóxia (REC-HIPO) marcados com *MIF*, *SLC2A1*, *ENO2* e 124 células; e macrófagos associados à angiogênese (REC-ANGIO) marcados com *VEGFA*, *CEBPB*, *OLR1* e 91 células (Figura 17).

Figura 17: Anotação das subpopulações de macrófagos identificadas. **A)** UMAP representando a anotação das subpopulações de macrófagos identificadas. Residentes associados a IFN (RES-IFN); residentes intersticiais (RES-IT); residentes MHC, com alta expressão de genes associados a apresentação antigênica (RES-MHC); Residentes associados à lipídeos (RES-LA); recrutados associados a IFN (REC-IFN); recrutados associados à angiogênese (REC-ANGIO); recrutados

associados à hipóxia (REC-HIPO); recrutados associados à lipídeos (REC-LA). **B)** Mapa de correlação entre as subpopulações identificadas. **C)** Dotplot representando os marcadores associados às subpopulações identificadas.



Fonte: Autor, 2023.

Apesar de o *celltypist* ter se mostrado semelhante à anotação final, vale frisar que a ferramenta realiza a anotação baseado na semelhança entre células e não entre *clusters* (Conde et al., 2022), portanto, algumas divergências foram

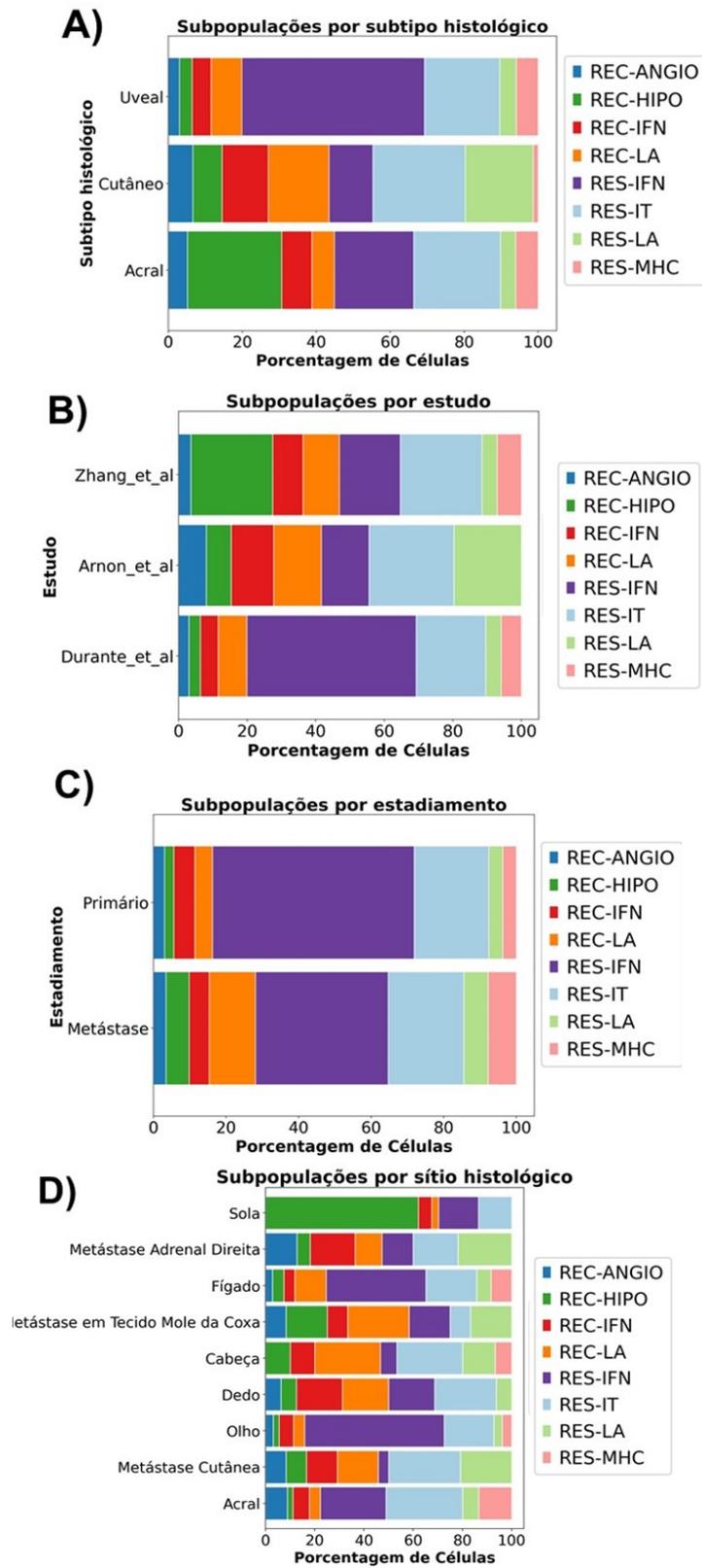
observadas especialmente entre as populações residentes, visto que nem todas as células classificadas como macrófagos intersticiais apresentaram tais características, sendo então divididas em RES-IM e RES-IFN. Além disso, o cluster anotado como RES-MHC, apresentou o mesmo fenótipo do *cluster* Mac_reg do *celltypist*, dado que os macrófagos regulatórios são fenotipicamente iguais aos MHC, notou-se que o mesmo obteve mais células expressando marcadores residentes do que recrutados, além de sua distância em relação às demais células recrutadas. Com relação às células recrutadas também foi necessário realizar ajustes frente ao resultado do *celltypist*, visto que as células antes anotadas como associadas a um fenótipo proliferativo, apresentaram pouca expressão para os marcadores canônicos de macrófagos proliferativos (*TOP2A*, *STMN1* e *MKI67*), enquanto os marcadores de macrófagos responsivos à IFN foram significativamente mais expressos (Figura 17c).

Em relação à distribuição de macrófagos residentes e recrutados, observa-se cerca de 55,10% RES e REC 44,90% para melanoma acral, 56% RES, e 44% de REC para cutâneo enquanto 80% RES e 20% REC foram detectados em uveal (Figura 18a). Visto que cada estudo representa um tipo majoritário de melanoma, os dados não variaram muito dos achados de RES e REC nos subtipos histológicos, sendo: Arnon 58% RES e 42% REC. Zhang 53% RES e 47 REC, enquanto os dados do Durante *et al*, foram iguais aos de Uveal (Figura 18b). Com relação ao estadiamento, os residentes também se mostraram superiores tanto em tumores primários (83%), quanto em metastáticos (71%) (Figura 18c).

Devido ao ambiente inflamatório que circunda o tumor, nota-se também um percentual significativo de RES-IFN (21% em acral, 11% em cutâneo e 49% em uveal) (Figura 18a), que por sua vez são conhecidos por apresentarem um perfil pró-inflamatório, devido a presença de marcadores como *CXCL8/10/11*, além de serem descritos como sendo diretamente relacionados com a exaustão e imunossupressão de Linfócitos T, bem como pelo recrutamento de Tregs (Mulder *et al.*, 2021; Gubin *et al.*, 2019). Em contraste com os RES-IFN, os REC-IFN estiveram em proporções expressivamente menores em todos os tumores (Acral 8%, cutâneo 12% e uveal 5%) (Figura 18a) e em condições de estadiamento (5% em ambos) enquanto o RES-IFN estiveram em 55% das amostras primárias e em 36% das metastáticas (Figura 18c), muito embora os REC-IFN tenham apresentado mais marcadores associados à IFN do que os residentes e baixos níveis de *CXCL8*, indicando que talvez esses macrófagos ainda estejam fase de transição para um

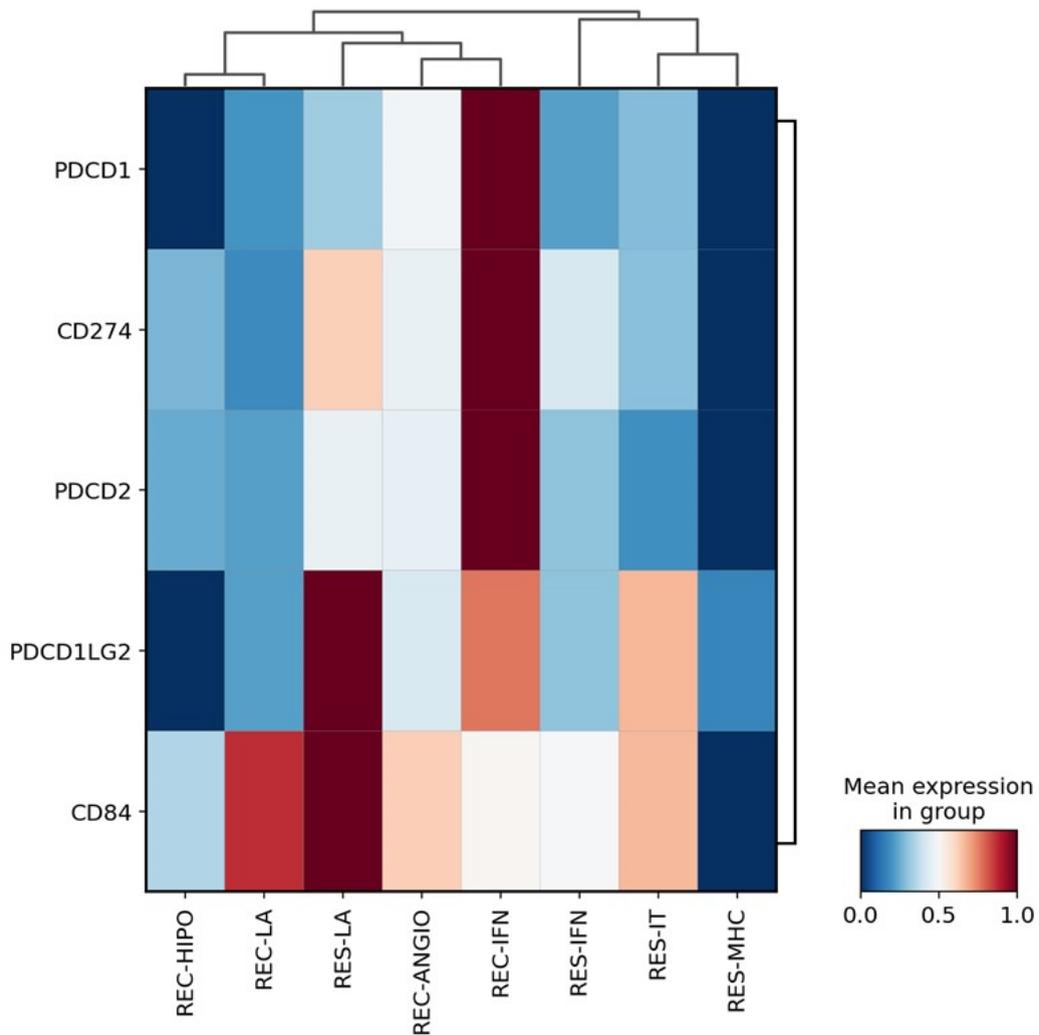
perfil mais pró-inflamatório (Figura 17c). Notavelmente, os REC-IFN foram a subpopulação com mais genes associados à exaustão celular de linfócitos T (Figura 19).

Figura 18: Distribuição das subpopulações de macrófagos entre: **A) Subtipo histológico:** RES-IFN: 21% acral; 11% cutâneo; 49% uveal. RES-IT: 23% acral; 25% cutâneo; 20% uveal. RES-LA: 6% acral; 16% cutâneo; 8% uveal. RES-MHC: 6% acral; 1% cutâneo; 5% uveal. REC-IFN: 8% acral; 12% cutâneo; 5% uveal. REC-ANGIO: acral 5%; cutâneo 6%; 2% uveal. REC-LA: 6% acral; 16% cutâneo; 8% uveal. REC-HIPO: 25% acral; 7% cutâneo; 3% uveal. **B) Estudo:** RES-IFN: 49% Zhang *et al*; 13% Arnon *et al*; 17% Durante *et al*. RES-IT: 20% Zhang *et al*; 24% Arnon *et al*; 23% Durante *et al*. RES-LA: 4% Zhang *et al*; 19% Arnon *et al*; 4% Durante *et al*. RES-MHC: 5% Zhang *et al*; 0% Arnon *et al*; 7% Durante *et al*. REC-IFN: 5% Zhang *et al*; 12% Arnon *et al*; 8% Durante. REC-ANGIO: 2% Zhang *et al*; 8% Arnon *et al*; 3% Durante *et al*. REC-LA: 4% Zhang *et al*; 19% Arnon *et al*; 4% Durante *et al*. REC-HIPO: 3% Zhang *et al*; 7% Arnon *et al*; 23% Durante *et al*. **C) Estadiamento:** RES-IFN 36% metástase; 55% primário; RES-IT: 20% primário; 20% metástase. RES-LA: 6% metástase; 3% primário. RES-MHC: 7% metástase; 3% primário. REC-IFN: 5% metástase; 5% primário. REC-ANGIO: 3% metástase; 3% primário. REC-LA: 12% metástase; 4% primário. REC-HIPO: 6% metástase; 2% primário. **D) Sítio histológico:** RES-IFN: 26% acral; 4% metástase cutânea; 56% olho; 18% dedo; 6% cabeça; 16% tecido mole; 40% fígado; 12% metástase adrenal; 16% sola. RES-IT: 31% acral; 29% metástase cutânea; 20% olho; 25% dedo; 26% cabeça; 8% tecido mole; 20% fígado; 18% metástase adrenal; 13% sola. RES-LA: 6% acral; 20% metástase cutânea; 3% olho; 6% dedo; 13% cabeça; 16% tecido mole; 5% fígado; 21% metástase adrenal; 0% sola. RES-MHC: 13% acral; 0% metástase cutânea; 3% olho; 0% dedo; 6% cabeça; 0% tecido mole; 0% fígado; 0% metástase adrenal; 0% sola. REC-IFN: 6% acral; 12% metástase cutânea; 5% olho; 18% dedo; 10% cabeça; 8% tecido mole; 4% fígado; 18% metástase adrenal; 5% sola. REC-ANGIO: 8% acral; 8% metástase cutânea; 3% olho; 6% dedo; 0% cabeça; 8% tecido mole; 2% fígado; 12% metástase adrenal; 0% sola. REC-LA: 4% acral; 16% metástase cutânea; 4% olho; 18% dedo; 26% cabeça; 25% tecido mole; 12% fígado; 10% metástase adrenal; 2% sola. REC-HIPO: 2% acral; 8% metástase cutânea; 2% olho; 6% dedo; 10% cabeça; 16% tecido mole; 4% fígado; 5% metástase adrenal; 62% sola.



Fonte: Autor, 2023.

Figura 19: Presença de marcadores de exaustão entre as subpopulações de macrófagos.



Fonte: Autor, 2023.

Os RES-IT também representaram uma população presente de forma equiparada em todos os subtipos histológicos (acral 23%, cutâneo 25% e uveal 20%), sítios (acral 31%, metástase cutânea 29%, olhos 20%, dedos 25%, cabeça 26%, tecido mole 8%, fígado 20%, metástase adrenal 18% e sola 13%) e condição de estadiamento (20% em ambas) (Figura 18a-d). Estes macrófagos por sua vez estão intimamente ligados a remodelação tecidual e fagocitose, sendo muitas vezes associados a um pior prognóstico devido a sua capacidade de degradar a matriz extracelular, facilitando a migração de células cancerígenas (Gu et al., 2022; Guimarães et al., 2023).

Há também uma maior frequência de macrófagos associados à lipídeos

tanto recrutados (REC-LA) quanto residentes (RES-LA) (Figura 18d), fator este que possivelmente se deve ao fato de sítios metastáticos como fígado, glândula adrenal, tecidos moles e metástases cutâneas que infiltram em camadas mais internas da pele são mais ricos em gorduras (Xiong et al., 2019), hipótese esta que é suportada ao observamos a distribuição destas subpopulações por subtipo histológico e por estudo, onde o estudo do Arnon que é o maior representante em proporção de melanoma cutâneo é o que apresenta maior quantidade de amostras metastáticas em diferentes sítios (Figura 18a-b). A presença de macrófagos associados a lipídeos no TME é constantemente relatada na literatura como estando relacionada a um pior prognóstico, especialmente em função da expressão elevada TREM2 nestas populações, conferindo um papel imunossupressor e pró-tumoral por meio do enriquecimento de vias relacionadas à angiogênese e inativação de linfócitos T efetores (Zhou et al., 2022; Liu et al., 2022). Não obstante ambas populações de macrófagos LA apresentaram expressão significativa de genes relacionados à exaustão e inativação de linfócitos T, como mostrado pela expressão de *CD84* e *PDCD1LG2* (Figura 19)

Os RES-MHC por sua vez constituem a menor população dentre as células residentes, sendo praticamente imperceptíveis em amostras de melanoma cutâneo. Sendo descritos como associados a um melhor prognóstico, visto sua capacidade de apresentar antígenos e ativar outras células do sistema imunológico (Dhatchinamoorthy et al., 2021). Apesar de ser esperado que essa população de fato seja pouco frequente frente às demais em um ambiente com alto potencial metastático, o fato de se observar mais RES-MHC em amostras de metástases do que em primárias, além de não haver nenhuma desta população no estudo do Arnon *et al*, é um forte indicativo de que na verdade estes achados são provenientes de um viés de coleta ou processamento, de modo que não seja possível identificar a especificidade desta população (Figura 18 a-c).

Os macrófagos associados à hipóxia (REC-HIPO) por outro lado foram significativamente mais associados a amostras metastáticas (6%) frente aos 2% de tumores primários (Figura 18c). A hipóxia é um fator chave na progressão do tumor para estágios de metástase devido principalmente à transição epitélio-mesenquimal (EMT), sendo geralmente a hipóxia associada a um maior número de células tumorais e eventualmente a um pior prognóstico (Gilkes et al., 2014).

Surpreendentemente, os REC-HIPO apresentaram 25% do percentual de

macrófagos no subtipo histológico acral, enquanto no sítio primário da sola dos pés foi de mais de 60% (Figura 18a, d). Apesar de ainda não haver relatos que suportem a hipótese de um TME mais hipóxico no melanoma acral, sabe-se que o mesmo também possui alto potencial metastático e é pouco responsivo à imunoterapias (Mao et al., 2021). Apesar de análises relacionadas a carga mutacional não terem sido realizadas neste estudo, tumores com altos níveis de mutações, especialmente no gene *TP53* em pacientes que estão em fase de progressão da doença estão intimamente associados a ambientes hipóxicos e mais suscetíveis à metástases (Zhao et al., 2022)

5.5.2 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS

Por fim, análises de enriquecimento de via foram realizadas utilizando como base o banco de dados MsigDB (Liberzon et al., 2015), a fim de melhor caracterizar o perfil fenotípico das subpopulações de macrófagos anotadas. Com isso, pudemos observar que tanto os RES-IFN (Figura 20a) quanto o REC-IFN (Figura 21d) estiveram enriquecidos para vias reguladas por IFN, além de ambos terem apresentado vias relacionadas a resposta à UV e a sinalização KRAS, fatores conhecidamente envolvidos na carcinogênese do melanoma acral e cutâneo (Cai et al., 2021). Por outro lado, os RES-IFN apesar de também terem apresentado um fenótipo pró-inflamatório, os mesmos demonstraram terem utilizado mecanismos de ativação diferentes dos observados nos REC-IFN, especialmente com um enriquecimento significativo das vias envolvendo TNF- α e NF- κ B e um pouco menor para IL-6/JAK/STAT3 (Figura 20a; Figura 21d). A literatura sugere que apesar de serem associados a um perfil “*M1-like*” o aumento da ativação da via IL-6/JAK/STAT3 está relacionada à progressão tumoral e principalmente com agravamento dos quadros por meio de EMT, aumento da proliferação e angiogênese, fatores estes essenciais para uma metástase bem sucedida (You et al., 2022). O aumento da ativação TNF- α por meio de NF- κ B é um forte indicativo de uma resposta a um ambiente que sofre de inflamação crônica, ademais apesar de atuar como um fator pró-apoptótico, estudos sugerem que concentrações elevadas de TNF- α no contexto do TME podem estimular a progressão e sobrevivência das células tumorais (Laha et al., 2021). Não menos importante, também é relatado que NF- κ B pode estimular o fator de transcrição STAT3 que por sua vez torna-se responsável pelo aumento da expressão de genes imunossupressores como *IL-10* e

TGF- β (Cavalcante et al., 2021).

O perfil inflamatório em TAMs é altamente associado a uma atividade anti-tumoral e citotóxica, entretanto, estudos sugerem que a polarização “crônica” de macrófagos em um perfil pró-inflamatório podem levar a um prognóstico adverso, com um fenótipo pró-metastático, além de um maior recrutamento de macrófagos imunossupressores (Liu et al., 2021; Pelka et al., 2021; Qian et al., 2011).

Os RES-IT apesar de também terem apresentado enriquecimento para a via de sinalização TNF- α e NF- κ B, sua polarização em um perfil totalmente pró-inflamatório não parece ser algo claro, visto que macrófagos intersticiais são altamente relacionados a fagocitose (Guimarães et al., 2023). Não obstante, os mesmos também estiveram significativamente enriquecidos para o processo de EMT, achado este que é corroborado pelo papel destas células na remodelação tecidual e fazendo com que estes estejam mais associados a um pior prognóstico. Digno de nota, os RES-IT também estavam associados a respostas imunossupressoras representadas pela expressão aumentada de CD84 e PDCC1LG2 (Figura 19).

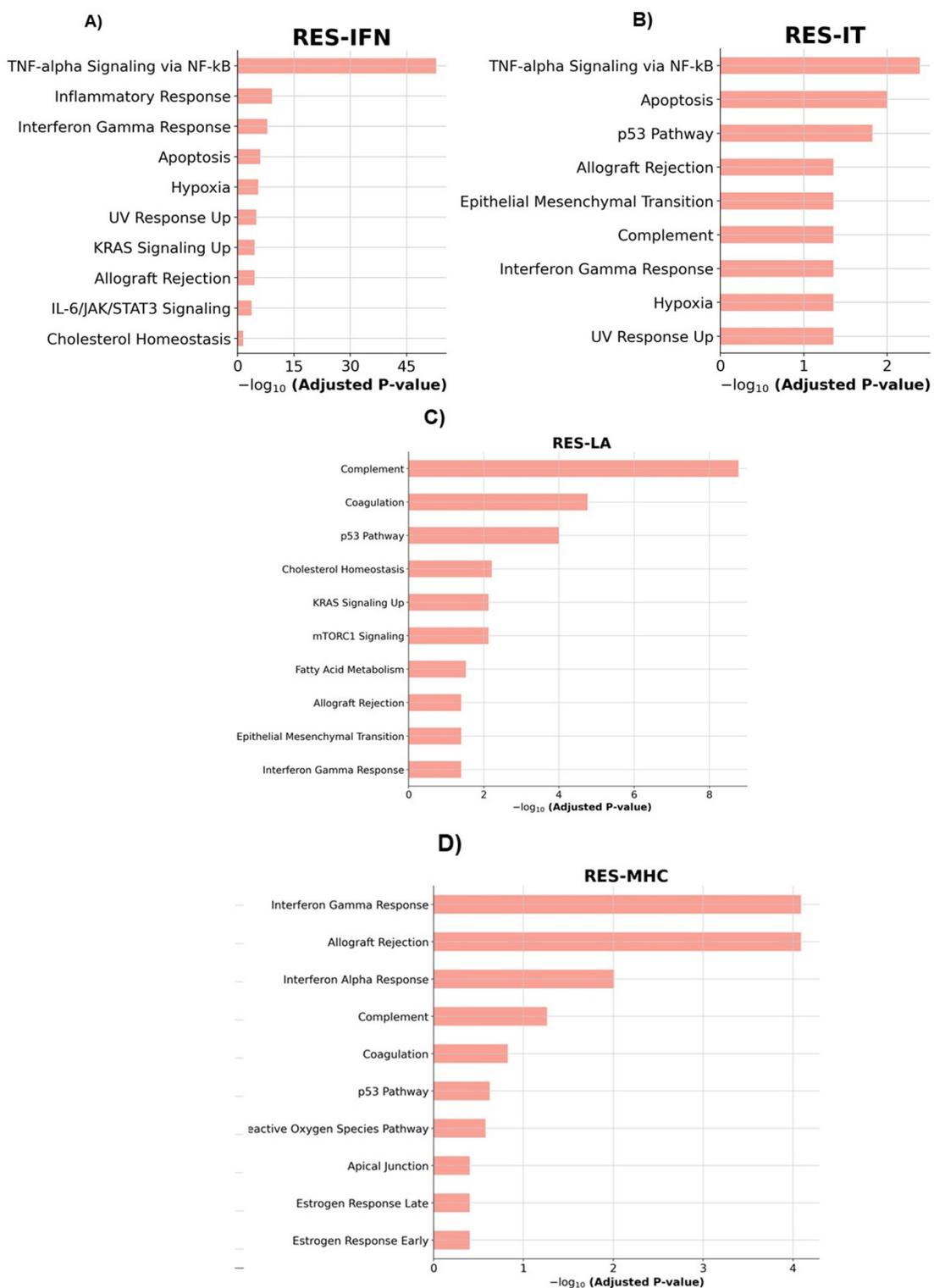
Tanto os REC-LA quanto os RES-LA apresentaram fenótipos muito semelhantes e também associados à atividades pró-tumorais, como pode ser observado pelo enriquecimento da via de sinalização mTOR, sensor de nutrientes, (Chun and Kim et al., 2021) que por sua vez é responsável por fosforilar diversos fatores relacionados ao crescimento celular e sobrevivência, ativada especialmente devido ao microambiente hipóxico e escasso de nutrientes (Huang., 2020) fato este que também é suportado pelo enriquecimento de vias associadas ao metabolismo de ácidos graxos e colesterol, demonstrando assim a responsividade destas células frente a um microambiente escasso de nutrientes. Não obstante, os mesmos também estiveram associados à EMT, e atividade imunossupressora com alta expressão de CD84 (Figura 18; 20c e 21c).

Não surpreendentemente, os REC-HIPO também apresentaram enriquecimento para as vias mTOR, hipóxia e demais vias associadas ao metabolismo energético, além de também apresentarem uma regulação positiva para vias relacionadas à angiogênese (Huang., 2020). O ambiente hipóxico por sua vez também é capaz de induzir um aumento de expressão de fatores pró-inflamatórios como IL-6 e TNF α e podem promover o crescimento tumoral, assim como demonstrado nos REC-ANGIO (Balamurugan et al., 2016).

Por fim e não menos importante os RES-MHC foram um subtipo celular caracterizados pela alta expressão de HLA e com alta capacidade de apresentação de antígeno, e ao enriquecimento de vias associadas a IFNs, além de terem apresentado vias de rejeição ao aloenxerto, que pode indicar um processo de hipersensibilidade aos antígenos tumorais (DeNardo and Ruffell., 2020).

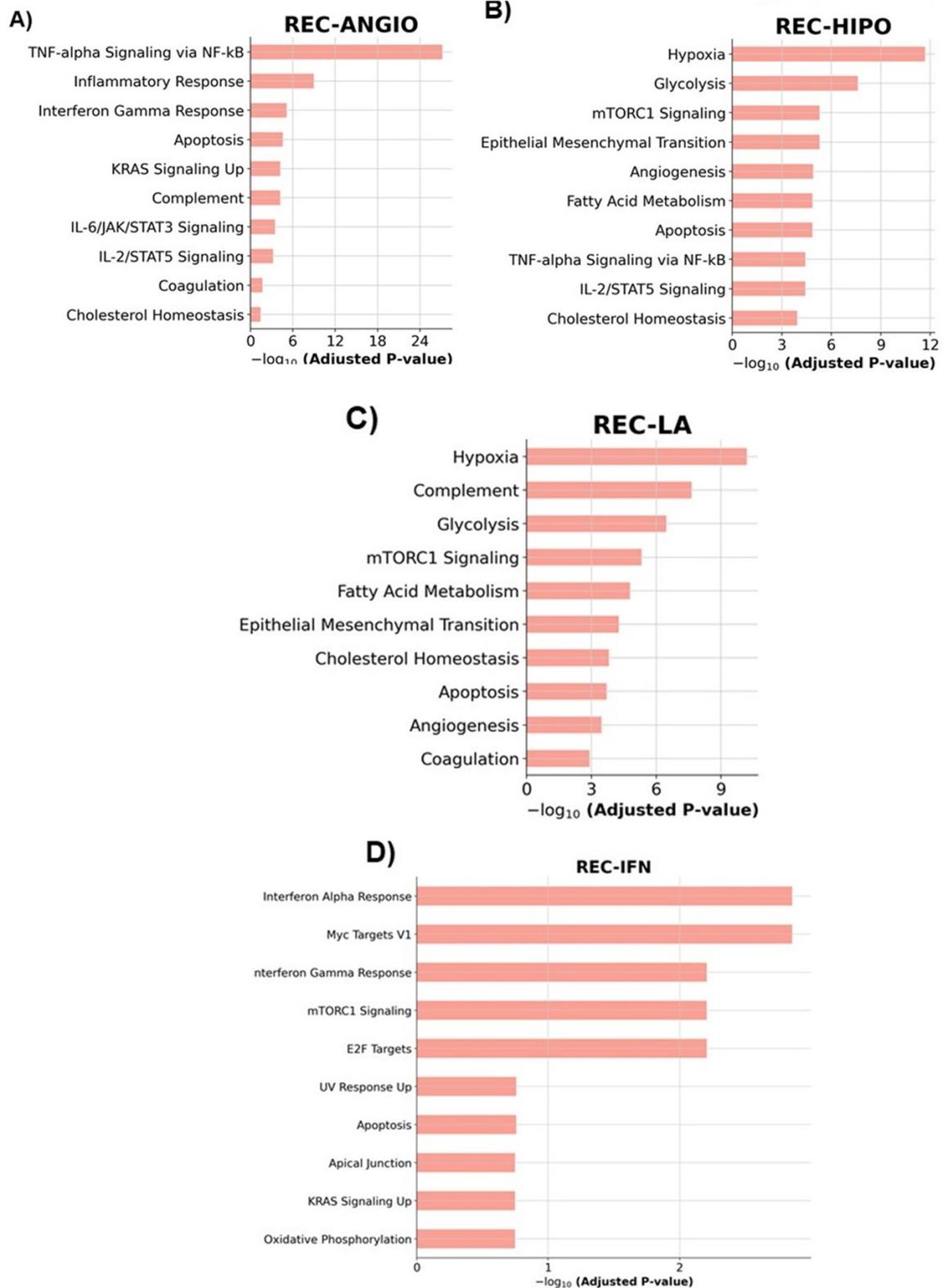
Figura 20: Análise de enriquecimento de vias das populações detectadas de macrófagos residentes.

A) RES-IFN; B) RES-IT; C) RES-LA; D) RES-MHC.



Fonte: Autor, 2023.

Figura 21: Análise de enriquecimento de vias das populações detectadas de macrófagos recrutados. **A)** REC-ANGIO; **B)** REC-HIPO; **C)** REC-LA; **D)** REC-IFN.



Fonte: Autor, 2023.

6 CONCLUSÃO

O respectivo projeto foi capaz de trazer uma caracterização aprofundada a nível de célula única acerca de 8 diferentes subpopulações de macrófagos entre residentes e recrutadas, com fenótipos distintos diferente das abordagens clássicas onde apenas há descrição de macrófagos M1 ou M2. O trabalho também foi capaz de ilustrar a distribuição de cada subpopulação macrofágica em 3 diferentes subtipos de melanoma (cutâneo, acral e uveal), bem como em sítios primários e metastáticos. Com isso foi possível observar que em sítios primários, especialmente em amostras de melanoma uveal houve um predomínio de macrófagos residentes responsivos à IFN, enquanto em amostras de melanoma acral houve um predomínio de macrófagos associados à hipóxia e nos cutâneos a distribuição entre todas as 8 populações foi a mais heterogênea. Ademais, notou-se que em amostras metastáticas houve uma prevalência de subpopulações associadas a progressão tumoral transição EMT e a resistência à imunoterapias tanto por meio de marcadores de exaustão quanto pela ativação de vias associadas à imunossupressão.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. et al. **Imunologia celular e molecular**. Rio De Janeiro (Rj): Elsevier, 2008.
- AHMED, B.; QADIR, M. I.; GHAFOR, S. Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 30, n. 4, p. 291–297, 2020.
- AKBANI, R. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, jun. 2015.
- APTE, R. S.; CHEN, D. S.; FERRARA, N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. **Cell**, v. 176, n. 6, p. 1248–1264, mar. 2019.
- ARNOLD, M. et al. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. **JAMA Dermatology**, v. 158, n. 5, p. 495–503, 30 mar. 2022.
- AUSTERMANN, J.; ROTH, J.; BARCZYK-KAHLERT, K. The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation. **Cells**, v. 11, n. 12, p. 1979, 20 jun. 2022.
- BALAMURUGAN, K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 5, p. 1058–1066, 7 abr. 2015.
- BELLENGHI, M. et al. Sex and Gender Disparities in Melanoma. **Cancers**, v. 12, n. 7, 7 jul. 2020.
- BIERMANN, J. et al. Dissecting the treatment-naïve ecosystem of human melanoma brain metastasis. **Cell**, v. 185, n. 14, p. 2591–2608.e30, 7 jul. 2022.
- BRISTOW, I. R. et al. Clinical guidelines for the recognition of melanoma of the foot and nail unit. **Journal of Foot and Ankle Research**, v. 3, n. 1, 1 nov. 2010.
- BROUWER, I.; LENSTRA, T. L. Visualizing transcription: key to understanding gene expression dynamics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 51, p. 122–129, ago. 2019.

BUCHHOLZ, V. R.; SCHUMACHER, T. N. M.; BUSCH, D. H. T Cell Fate at the Single-Cell Level. **Annual Review of Immunology**, v. 34, n. 1, p. 65–92, 20 maio 2016.

CAI, Y. et al. Recurrent KRAS, KIT and SF3B1 mutations in melanoma of the female genital tract. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, 8 jun. 2021.

CAVALCANTE, R. S. et al. STAT3/NF- κ B signalling disruption in M2 tumour-associated macrophages is a major target of PLGA nanocarriers/PD-L1 antibody immunomodulatory therapy in breast cancer. **British Journal of Pharmacology**, v. 178, n. 11, p. 2284–2304, 1 jun. 2021.

CHATTOPADHYAY, C. et al. Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between. **Cancer**, v. 122, n. 15, p. 2299–2312, 15 mar. 2016.

CHEN, D. et al. Metabolic regulatory crosstalk between tumor microenvironment and tumor-associated macrophages. **Theranostics**, v. 11, n. 3, p. 1016–1030, 2021.

CHEN, X. et al. Monocytes in Tumorigenesis and Tumor Immunotherapy. **Cells**, v. 12, n. 13, p. 1673, 21 jun. 2023.

CHENG, S. et al. A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. **Cell**, v. 184, n. 3, p. 792-809.e23, 4 fev. 2021.

CHOW, A.; BROWN, B. D.; MERAD, M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 788–798, 1 nov. 2011.

CHUN, Y.; KIM, J. AMPK–mTOR Signaling and Cellular Adaptations in Hypoxia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9765, 9 set. 2021.

CYSTER, J. G.; ALLEN, C. D. C. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. **Cell**, v. 177, n. 3, p. 524–540, abr. 2019.

DANIEL JENSEN, J.; ELEWSKI, B. E. The ABCDEF Rule: Combining the “ABCDE Rule” and the “Ugly Duckling Sign” in an Effort to Improve Patient Self-Screening Examinations. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 8, n. 2, p. 15, 2015.

DAVIES, L. C. et al. Tissue-resident macrophages. **Nature Immunology**, v. 14, n. 10, p. 986–995, 18 set. 2013.

DAVIS, L. E.; SHALIN, S. C.; TACKETT, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology & Therapy**, v. 20, n. 11, p. 1366–1379, 1 ago. 2019.

DENARDO, D. G.; RUFFELL, B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, 4 fev. 2019.

DHATCHINAMOORTHY, K.; COLBERT, J. D.; ROCK, K. L. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 9 mar. 2021.

DOLINA, J. S. et al. CD8+ T Cell Exhaustion in Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 20 jul. 2021.

DOMÍNGUEZ CONDE, C. et al. Cross-tissue immune cell analysis reveals tissue-specific features in humans. **Science**, v. 376, n. 6594, 13 maio 2022.

DURANTE, M. A. et al. Single-cell analysis reveals new evolutionary complexity in uveal melanoma. **Nature Communications**, v. 11, p. 496, 24 jan. 2020.

EDDY, K.; CHEN, S. Overcoming Immune Evasion in Melanoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 8984, 26 nov. 2020.

ELDER, D. E. et al. The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 144, n. 4, p. 500–522, 14 fev. 2020.

GAO, C.; ZHANG, M.; CHEN, L. The Comparison of two Single-cell Sequencing Platforms: BD Rhapsody and 10x Genomics Chromium. **Current Genomics**, v. 21, 25 jun. 2020.

GAYOSO, A. et al. A Python library for probabilistic analysis of single-cell omics data. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 163–166, 1 fev. 2022.

GILKES, D. M.; SEMENZA, G. L.; WIRTZ, D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 6, p. 430–439, 1 jun. 2014.

GIOVANNA RESK MAKLOUF et al. Identification of novel myeloid-derived cell states with implication in cancer outcome. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, 4 jan. 2023.

GIUSY DI CONZA et al. Tumor-induced reshuffling of lipid composition on the endoplasmic reticulum membrane sustains macrophage survival and pro-tumorigenic activity. **Nature Immunology**, v. 22, n. 11, p. 1403–1415, 22 out. 2021.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY. **Global Cancer Observatory**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>.

GOYDOS, J. S.; SHOEN, S. L. Acral Lentiginous Melanoma. **Melanoma**, v. 167, p. 321–329, 25 nov. 2015.

GREENWALD, H. S.; FRIEDMAN, E. B.; OSMAN, I. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities. **Melanoma Research**, v. 22, n. 1, p. 1–8, fev. 2012.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity**, v. 51, n. 1, p. 27–41, jul. 2019.

GRISANTI, S.; TURA, A. **Uveal Melanoma**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK506991/>>.

GU, Y. et al. The emerging roles of interstitial macrophages in pulmonary fibrosis: A perspective from scRNA-seq analyses. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 923235, 22 set. 2022.

GUBIN, M. M. et al. High-Dimensional Analysis Delineates Myeloid and Lymphoid Compartment Remodeling during Successful Immune-Checkpoint Cancer Therapy. **Cell**, v. 175, n. 4, p. 1014-1030.e19, 1 nov. 2018.

GUILLIAMS, M. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. **Immunity**, v. 49, n. 4, p. 595–613, 16 out. 2018.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, jan. 2022.

HAO, Y. et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. **Cell**, v. 184, n. 13, maio 2021.

HELMINK, B. A. et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. **Nature**, v. 577, n. 7791, p. 549–555, 15 jan. 2020.

HUANG, S. mTOR Signaling in Metabolism and Cancer. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 2278, 13 out. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de pele melanoma**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma>>. Acesso em: set. 10DC.

JERBY-ARNON, L. et al. A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade. **Cell**, v. 175, n. 4, p. 984-997.e24, nov. 2018.

JIA, L. et al. Single-cell profiling of infiltrating B cells and tertiary lymphoid structures in the TME of gastric adenocarcinomas. **Oncolmmunology**, v. 10, n. 1, 1 jan. 2021.

KARIMKHANI, C. et al. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. **British Journal of Dermatology**, v. 177, n. 1, p. 134–140, 12 jun. 2017.

KRETSCHMER, M.; RÜDIGER, D.; ZÄHLER, S. Mechanical Aspects of Angiogenesis. **Cancers**, v. 13, n. 19, p. 4987, 1 jan. 2021.

KUKSIN, M. et al. Applications of single-cell and bulk RNA sequencing in onco-immunology. **European Journal of Cancer**, v. 149, p. 193–210, maio 2021.

LAHA, D. et al. The Role of Tumor Necrosis Factor in Manipulating the Immunological Response of Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 27 abr. 2021.

- LAUMONT, C. M. et al. Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 22, n. 7, p. 414–430, 7 abr. 2022.
- LEONARDI, G. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, 27 fev. 2018.
- LIANG, W. S. et al. Integrated genomic analyses reveal frequent TERT aberrations in acral melanoma. **Genome Research**, v. 27, n. 4, p. 524–532, abr. 2017a.
- LIANG, W. S. et al. Integrated genomic analyses reveal frequent TERT aberrations in acral melanoma. **Genome Research**, v. 27, n. 4, p. 524–532, abr. 2017b.
- LIBERZON, A. et al. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. **Cell Systems**, v. 1, n. 6, p. 417–425, dez. 2015.
- LIU, F. et al. Key Factor Regulating Inflammatory Microenvironment, Metastasis, and Resistance in Breast Cancer: Interleukin-1 Signaling. **Mediators of Inflammation**, v. 2021, p. 7785890, 23 set. 2021.
- LIU, Z. et al. Lipid-associated macrophages in the tumor-adipose microenvironment facilitate breast cancer progression. **Onc Immunology**, v. 11, n. 1, 8 jun. 2022.
- LOVÉN, J. et al. Revisiting Global Gene Expression Analysis. **Cell**, v. 151, n. 3, p. 476–482, out. 2012.
- MAO, L. et al. Immunotherapy in Acral and Mucosal Melanoma: Current Status and Future Directions. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 4 jun. 2021.
- MATTHEWS, N. H. et al. Epidemiology of Melanoma. **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy**, p. 3–22, 5 dez. 2017.
- MCLAUGHLIN, C. C. et al. Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. **Cancer**, v. 103, n. 5, p. 1000–1007, 2005.
- MERAD, M. et al. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 563–604, 21 mar. 2013.

MOLGORA, M. et al. TREM2 Modulation Remodels the Tumor Myeloid Landscape Enhancing Anti-PD-1 Immunotherapy. **Cell**, v. 182, n. 4, p. 886-900.e17, ago. 2020.

MORGAN, A. M.; LO, J.; FISHER, D. E. How does pheomelanin synthesis contribute to melanomagenesis? **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 35, n. 8, p. 672–676, 1 ago. 2013.

MULDER, K. et al. Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. **Immunity**, v. 54, n. 8, p. 1883-1900.e5, ago. 2021.

NAIK, P. P. Cutaneous Malignant Melanoma: A Review of Early Diagnosis and Management. **World Journal of Oncology**, v. 12, n. 1, p. 7–19, 1 fev. 2021.

OLINGY, C. E.; DINH, H. Q.; HEDRICK, C. C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 2, p. 309–322, 1 ago. 2019.

OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 2, p. 87–98, 30 dez. 2010.

PAGÈS, H. et al. **AnnotationDbi: Manipulation of SQLite-based annotations in Bioconductor**. Disponível em: <<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/AnnotationDbi.html>>. Acesso em: 13 set. 2023.

PAN, Y. et al. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 3 dez. 2020.

PETROVA, V. et al. Modern Aspects of Immunotherapy with Checkpoint Inhibitors in Melanoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2367, 30 mar. 2020.

QIAN, B.-Z. et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 222–225, 8 jun. 2011.

QIAN, J. et al. A pan-cancer blueprint of the heterogeneous tumor microenvironment revealed by single-cell profiling. **Cell Research**, v. 30, n. 9, p. 745–762, 19 jun. 2020.

RABBIE, R. et al. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. **The Journal of Pathology**, v. 247, n. 5, p. 539–551, 15 fev. 2019.

RANADIVE, N. S. et al. Effects of Melanin-Induced Free Radicals on the Isolated Rat Peritoneal Mast Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 86, n. 3, p. 303–307, 1 mar. 1986.

RASKOV, H. et al. Cytotoxic CD8 + T cells in cancer and cancer immunotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 124, p. 1–9, 15 set. 2020.

RODRIGUEZ, J. et al. Intrinsic Dynamics of a Human Gene Reveal the Basis of Expression Heterogeneity. **Cell**, v. 176, n. 1-2, p. 213-226.e18, jan. 2019.

ROSS, M. I.; GERSHENWALD, J. E. Evidence-based treatment of early-stage melanoma. **Journal of Surgical Oncology**, v. 104, n. 4, p. 341–353, 19 ago. 2011.

SAIDI, B. et al. Non-Cutaneous Melanoma, Findings and Prognostic Value of FDG PET/CT: A Case Series of 23 patients and review of the literature. **Asia Oceania Journal of Nuclear Medicine and Biology**, v. 10, n. 2, p. 91–99, 2022.

SARNA, T.; MENON, I. A.; SEALY, R. C. PHOTSENSITIZATION OF MELANINS: A COMPARATIVE STUDY. **Photochemistry and Photobiology**, v. 42, n. 5, p. 529–532, nov. 1985.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, p. 15003, 23 abr. 2015.

SKYTTHE, M. K.; GRAVERSEN, J. H.; MOESTRUP, S. K. Targeting of CD163+ Macrophages in Inflammatory and Malignant Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5497, 31 jul. 2020.

TANAKA, A.; SAKAGUCHI, S. Targeting Treg cells in cancer immunotherapy. **European Journal of Immunology**, v. 49, n. 8, 5 jul. 2019.

TANG, Q. et al. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 964442, 2022.

THE COLLABORATIVE OCULAR MELANOMA STUDY GROUP. Assessment of Metastatic Disease Status at Death in 435 Patients With Large Choroidal Melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS). **Archives of Ophthalmology**, v. 119, n. 5, p. 670, 1 maio 2001.

TÍMÁR, J.; LADÁNYI, A. Molecular Pathology of Skin Melanoma: Epidemiology, Differential Diagnostics, Prognosis and Therapy Prediction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5384, 11 maio 2022.

TIROSH, I. et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. **Science**, v. 352, n. 6282, p. 189–196, 7 abr. 2016.

TRAAG, V. A.; WALTMAN, L.; VAN ECK, N. J. From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 26 mar. 2019.

TUONG, Z. K. et al. Resolving the immune landscape of human prostate at a single-cell level in health and cancer. **Cell Reports**, v. 37, n. 12, p. 110132, 21 dez. 2021.

WANG, X. et al. Direct Comparative Analyses of 10X Genomics Chromium and Smart-seq2. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 19, n. 2, mar. 2021.

WOLF, F. A.; ANGERER, P.; THEIS, F. J. SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis. **Genome Biology**, v. 19, n. 1, 6 fev. 2018.

WOLOCK, S. L.; LOPEZ, R.; KLEIN, A. M. Scrublet: Computational Identification of Cell Doublets in Single-Cell Transcriptomic Data. **Cell Systems**, v. 8, n. 4, p. 281-291.e9, abr. 2019.

WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 450–462, mar. 2016.

XIA, L. et al. The cancer metabolic reprogramming and immune response. **Molecular Cancer**, v. 20, n. 1, 5 fev. 2021.

XIONG, X. et al. Landscape of Intercellular Crosstalk in Healthy and NASH Liver Revealed by Single-Cell Secretome Gene Analysis. **Molecular Cell**, v. 75, n. 3, p. 644-660.e5, ago. 2019.

YANG, S. et al. Decontamination of ambient RNA in single-cell RNA-seq with DecontX. **Genome Biology**, v. 21, n. 1, 5 mar. 2020.

YOU, Y. et al. M1-like tumor-associated macrophages cascade a mesenchymal/stem-like phenotype of oral squamous cell carcinoma via the IL6/Stat3/THBS1 feedback loop. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 41, n. 1, 6 jan. 2022.

ZHANG, C. et al. A single-cell analysis reveals tumor heterogeneity and immune environment of acral melanoma. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 25 nov. 2022.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 17, n. 8, p. 1–15, 1 jul. 2020.

ZHAO, Y.; HUANG, T.; HUANG, P. Integrated Analysis of Tumor Mutation Burden and Immune Infiltrates in Hepatocellular Carcinoma. **Diagnostics**, v. 12, n. 8, p. 1918, 8 ago. 2022.

ZHOU, L. et al. Integrated Analysis Highlights the Immunosuppressive Role of TREM2+ Macrophages in Hepatocellular Carcinoma. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 14 mar. 2022a.

ZHOU, Q. et al. Macrophages in melanoma: A double-edged sword and targeted therapy strategies (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 24, n. 4, p. 640, 26 ago. 2022b.

ZIEGENHAIN, C. et al. Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. **Molecular Cell**, v. 65, n. 4, p. 631-643.e4, fev. 2017.