

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DE CONHECIMENTO CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EDUARDO BRAMBILLA

Polarização dos macrófagos e sua associação com fatores prognósticos em casos de neoplasias colorretais, considerando a presença e ausência de mutações nas metaloproteinases.

CAXIAS DO SUL
2024

EDUARDO BRAMBILLA

Polarização dos macrófagos e sua associação com fatores prognósticos em casos de neoplasias colorretais, considerando a presença e ausência de mutações nas metaloproteinases.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Caxias do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Ciências da Saúde**.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Firmbac Pasqualoto

CAXIAS DO SUL

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

B815p Brambilla, Eduardo

Polarização dos macrófagos e sua associação com fatores prognósticos em casos de neoplasias colorretais, considerando a presença e ausência de mutações nas metaloproteinases [recurso eletrônico] / Eduardo Brambilla. – 2024.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2024.

Orientação: Fábio Firmbac Pasqualoto.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Neoplasias colorretais. 2. Macrófagos associados a tumor. 3. Adenocarcinoma. I. Pasqualoto, Fábio Firmbac, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 616.348-006

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

**POLARIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS
EM CASOS DE NEOPLASIAS COLORRETAIS, CONSIDERANDO A PRESENÇA E AUSÊNCIA
DE MUTAÇÕES NAS METALOPROTEINASES.**

Eduardo Brambilla

Tese de Doutorado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, Linha de Pesquisa: Investigação Clínica E Epidemiológica

Caxias do Sul, 26 de abril de 2024.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Henrique Sarubbi Fillman
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. André Reiriz
Universidade de Caxias do Sul - RS

Prof. Dr. Darcy Ribeiro Pinto Filho
Universidade de Caxias do Sul - RS

Prof. Dr. Fábio Pasqualotto
Universidade de Caxias do Sul - RS
Orientador

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive
Fernando Pessoa.*

RESUMO

Introdução: O macrófago é um componente presente no microambiente tumoral. Devido a sua plasticidade, o mesmo pode se apresentar como um fator de controle das células neoplásicas, bem como um fator de estímulo à progressão tumoral. Além disso, a polarização do macrófago pode ser um fator prognóstico e sua manipulação poderia ser usada para o controle das neoplasias colorretais. **Objetivos:** Avaliar as taxas de infiltração por macrófagos M1 e M2 em neoplasias colorretais com presença e ausência de mutação para metaloproteinases, além de investigar os fatores prognósticos associados a essa doença. **Métodos:** Para avaliar a quantidade e polarização dos macrófagos, foram incorporados dois conjuntos de pacientes diagnosticados com neoplasia colorretal: (i) 33 pacientes com mutação na metaloproteinase; e (ii) 33 pacientes sem mutação na metaloproteinase. Além disso, foram analisados os fatores prognósticos e de sobrevida associados ao câncer colorretal. **Resultados:** Em relação a presença de mutação das metaloproteinases, 33 pacientes (54,1%) não exibiram mutações, enquanto 28 pacientes (45,9%) apresentaram a referida mutação. O estadiamento para agrupamento das amostras, 10 eram provenientes de pacientes em estágio I (16,9%), 19 eram estágio II (34,2%), 25 eram do estágio III (42,4%) e cinco do estágio IV (8,5%). Ocorreram 12 óbitos (19,7%) durante o estudo, sete (21,2%) do grupo controle e cinco do grupo com mutação (17,9%). Os marcadores CD163 e CD206, indicativos para macrófagos polarizados M2, apresentaram médias de 23 e 17, com desvio padrão de 21 e 17, respectivamente. Já o marcador iNOS para macrófagos polarizados M1 apresentou média de cinco macrófagos por campo com desvio padrão de 11. **Conclusão:** A densidade de macrófagos obtida pelos marcadores não demonstrou diferença estatística significativa entre os agrupamentos com as variáveis estudadas de mutação para metaloproteinases, idade, sexo, localização do tumor, estadiamento, TILS, recidiva e desfecho clínico. Na amostra estudada não encontrou-se relação entre a presença de macrófagos polarizados e as variáveis prognósticas do câncer colorretal assim como na sobrevida. Em relação a mutação das metaloproteinases a mesma mostrou uma melhor sobrevida nos pacientes mutados.

Palavras-Chave: neoplasia colorretal; macrófago polarizado; adenocarcinoma colorretal; instabilidade de microssatélite.

ABSTRACT

Background: Macrophages are a component present at the tumoral microenvironment. Given their plasticity, macrophages can either be seen as a neoplastic cell controlling factor or a tumor progression stimulating factor. Furthermore, macrophage polarization may hold prognostic value and manipulation of this condition could potentially be explored to control colorectal neoplasms.

Objectives: Therefore, this work aimed to evaluate the M1 and M2 macrophage infiltration rates in colorectal neoplasia cases with presence and absence of metalloproteinase mutation, as well as investigate prognostic factors associated with the disease. **Methods:** In order to determine macrophage quantity and polarization, two sets of patients diagnosed with colorectal neoplasia were studied: (i) 33 patients with metalloproteinase mutation; and (ii) 33 patients without metalloproteinase mutation. Additionally, prognostic and survival factors associated with colorectal cancer were analyzed. **Results:** In terms of metalloproteinase mutation, 33 patients (54,1%) did not exhibit mutations, whereas 28 patients (45,9%) showed the referred mutation. When samples were grouped by tumoral stage, 10 were from patients in stage I (16,9%), 19 from stage II (34,2%), 25 from stage III (42,4%) and five from stage IV (8,5%). A total of 12 patient deaths (19,7%) were recorded during this study, seven of which were from the control group (21,2%) and five from the group with mutation (17,9%). The markers CD163 and CD206, indicative for M2 polarized macrophages, resulted in an average of 23 and 17, with a standard deviation of 21 and 17, respectively. On the other hand, the iNOS marker for M1 polarized macrophages returned a mean of five macrophages per site with a standard deviation of 11. **Conclusion:** The macrophage density observed through these markers did not demonstrate significant statistical differences between groupings with the variables employed in this study, including metalloproteinase mutation, age, gender, tumor region, tumor staging, TILS, tumor recurrence and clinical outcome. In the studied sample, no association was found between macrophage polarization and colorectal cancer prognostic variables, as well as survival. As for metalloproteinase mutation, a better survival rate was obtained for patients with the mutation.

Keywords: colorectal neoplasia; polarized macrophages; colorectal adenocarcinoma; microsatellite instability.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	CÂNCER COLORRETAL	1
1.2	MARCOS DO CÂNCER COLORRETAL	2
1.3	MICROAMBIENTE TUMORAL	3
1.4	MACRÓFAGOS	4
1.5	IMUNOGENICIDADE TUMORAL	7
2	OBJETIVOS	9
2.1	OBJETIVO GERAL	9
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3	MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1	GRUPO AMOSTRAL	10
3.2	ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	10
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	11
3.4	ASPECTOS ÉTICOS	12
4	RESULTADOS	13
5	DISCUSSÃO	22
6	CONCLUSÃO	28
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL

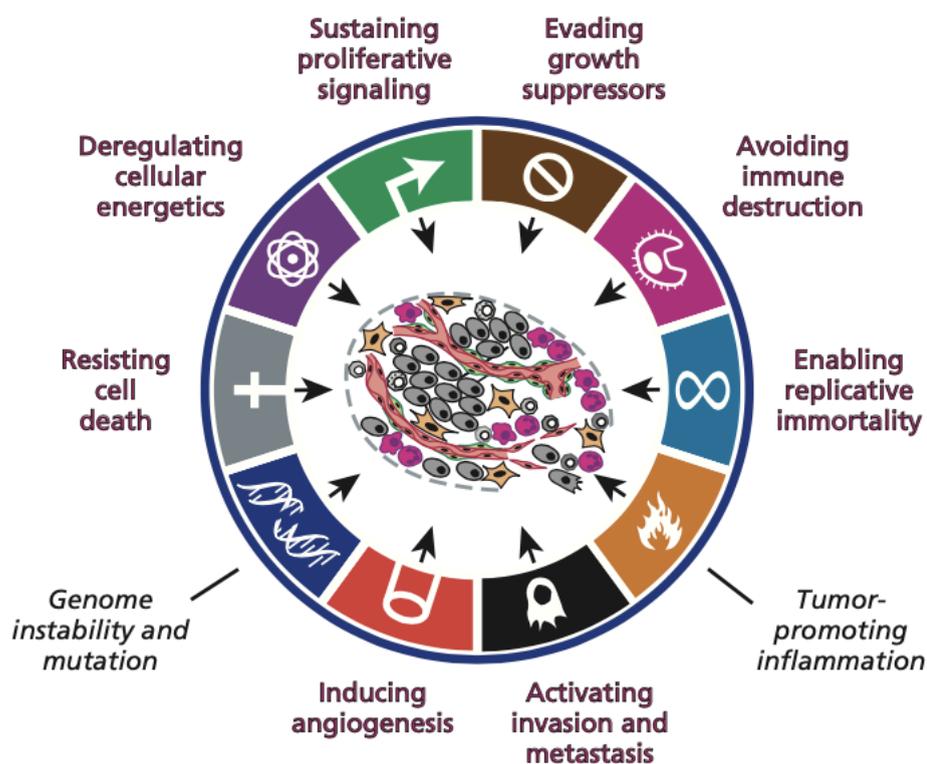
O câncer colorretal ocupa o terceiro lugar entre os tipos mais frequentes de tumores malignos em escala global. De acordo com a estatística global do câncer, divulgada pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*), foram diagnosticados aproximadamente 1,9 milhões de novos casos e 940 mil óbitos relacionados ao câncer colorretal no ano de 2020, demonstrando um aumento substancial em relação aos anos anteriores (Sung *et al.*, 2021). De forma similar, o número de casos no Brasil também apresenta incremento a cada ano. Os dados fornecidos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelam uma estimativa de aproximadamente 45,6 mil novos casos de câncer de cólon e reto para cada ano entre 2023 e 2025. Isso equivale a um risco estimado de 21,10 casos a cada 100 mil habitantes. Nessa estimativa, o número de casos será ligeiramente maior entre as mulheres comparado aos homens, com 23,6 e 22 mil casos respectivamente. Esses dados correspondem a uma taxa estimada de 20,78 novos casos para cada 100 mil homens e 21,41 para cada 100 mil mulheres (Instituto Nacional de Câncer, 2022).

Os principais fatores que contribuem para o risco de desenvolvimento do câncer colorretal incluem: avanço da idade, predisposição genética, estilo de vida, e outras condições ambientais. Os fatores de risco que contribuem para a instauração e evolução desse tipo de neoplasia podem ser classificados em intrínsecos e extrínsecos. As modificações genéticas e epigenéticas que podem ocorrer nas células, como a ativação de oncogenes e sinais proliferativos enviados pelo microambiente celular, desempenham um papel intrínseco. Por outro lado, o estilo de vida e os fatores ambientais, tais como obesidade, sedentarismo, tabagismo, alcoolismo e ingestão de alimentos processados, constituem fatores extrínsecos (Thanikachalam; Khan, 2019).

1.2 MARCOS DO CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal, assim como outras neoplasias, consiste em uma doença complexa envolvendo uma série de processos moleculares que resultam no estabelecimento de características patológicas desde seu início até seu último estágio, onde se apresenta como uma doença metastática (Figura 1). Essas características adquiridas compõem os marcos fundamentais do câncer, um conceito elaborado por Hanahan e Weinberg (2011). Além de permitirem o desenvolvimento tumoral e a disseminação metastática, as modificações podem apresentar diferentes comportamentos nos diversos órgãos do nosso corpo.

Figura 1 – Os marcos fundamentais do câncer. As dez características essenciais para o entendimento da biologia do câncer consistem em: instabilidade genômica; sinalização proliferativa sustentada; perda da função dos supressores tumorais; resistência a morte celular; aparecimento da imortalidade celular; promoção da angiogênese; capacidade de produzir metástases; modificação na utilização de energia; evitar a destruição pelo sistema imune; e inflamação produzida pelo tumor.



Fonte: Hanahan; Weinberg, 2011

Como podemos observar, nem todos os marcos dependem da célula carcinogênica, mas diversas etapas ocorrem devido às condições do microambiente tumoral (TME, *tumor microenvironment*).

1.3 MICROAMBIENTE TUMORAL

O processo de progressão do câncer é regido por múltiplos passos, incluindo mudanças genéticas e epigenéticas, as quais tradicionalmente atuam apenas nas células cancerígenas. Todavia, nas últimas décadas, o câncer tem sido reconhecido como um processo de interações dinâmicas entre células cancerígenas e o TME. Paget procurou explicar a atuação do TME, em 1889, por meio da analogia *seed and soil* (semente e solo), onde as sementes seriam as células cancerígenas e o solo seria o TME (Wang; Tian; Zhang, 2021). O TME compreende diversas células não cancerígenas presentes no tumor, abrangendo fibroblastos, células endoteliais, neurônios, adipócitos, células imunes adaptativas e inatas, além de componentes da matriz extracelular (ECM) e moléculas solúveis como citocinas, fatores de crescimento e vesículas extracelulares (Xiao; Yu, 2021).

A complexidade da estrutura tumoral é reconhecida pela presença simultânea de células oriundas de tecido normal ou neoplásico, assim como pela existência de outros processos não neoplásicos como infecciosos e cicatriciais. Assim como em tecidos normais, o estroma desempenha um papel na sustentação celular em tecidos cancerígenos. Esse estroma tumoral é constituído de vasos sanguíneos, fibroblastos e quase sempre de células imunes. Até agora, acreditava-se que o estroma tumoral produzia células endoteliais, através de um processo de angiogênese, para a formação de uma neovascularização, que por sua vez permitiria a chegada de oxigênio e nutrientes. Enquanto isso, fibroblastos associados ao câncer (CAFs) formariam a estrutura do tumor, além da presença de células imunes, que pareciam ser inefetivas para o combate imunológico das células tumorais (Hanahan; Weinberg, 2011).

O desenvolvimento e progressão do câncer dependem de múltiplas interações no TME. De fato, as características do TME e do estroma são responsáveis por desencadear processos que resultam em diversos marcos tumorais. Os CAFs, por exemplo, podem secretar proteases, sinais proliferativos e outras moléculas bioativas responsáveis pelos fenótipos tumorais. Os CAFs têm a capacidade de liberar as células do sistema supressivo de crescimento imposto pelo tecido normal adjacente. Eles desempenham um papel crucial na promoção da inflamação tumoral local, facilitando a invasão local ou à distância, além de fornecerem os elementos

necessários para o crescimento das células cancerígenas. Ademais, os CAFs promovem a angiogênese e atuam de maneira supressora no sistema imune, inibindo a atuação dos linfócitos T citotóxicos (CTL) (Hanahan; Weinberg, 2011).

Assim, devido à complexidade dos processos envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer, esforços têm sido realizados para entender as interações que ocorrem no TME e como podemos usá-las como fontes de terapias e controle para a doença. Considerando que células cancerígenas frequentemente desenvolvem resistência aos tratamentos utilizados atualmente, a busca por novos alvos terapêuticos pode ser benéfica. Nesse sentido, outros componentes do meio se destacam por apresentar células mais estáveis, vulneráveis e de mais fácil controle (Kim; Bae, 2016).

Os macrófagos são abundantemente encontrados nos tumores. Portanto, eles representam um alvo promissor para investigação, uma vez que a presença em grande número parece correlacionar-se com um prognóstico desfavorável em determinados tipos de câncer (Kim; Bae, 2016).

1.4 MACRÓFAGOS

A influência dos macrófagos no prognóstico de pacientes com câncer colorretal ainda permanece uma área de pesquisa pouco explorada, necessitando de melhores esclarecimentos. Os macrófagos constituem um grupo de células imunes encontradas em praticamente todos os tecidos. Em geral, são diferenciados de células mononucleares e exibem características fenotípicas distintas. Nos humanos, os macrófagos expressam marcadores como CD68, CD163, CD16, CD321, CD115 (Kim; Bae, 2016), CD206 (Scodeller *et al.*, 2017) e óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) (Viola *et al.*, 2019).

De uma perspectiva histórica, os macrófagos foram descobertos no século 19 pelo zoologista russo Metchnikoff em um estudo com larvas de estrelas do mar. Macrófagos foram encontrados e descritos como células residentes no tecido, patrulhando e removendo patógenos invasores, células apoptóticas e detritos. Assim, esse tipo celular contribui para a manutenção da integridade tecidual (Viola *et al.*, 2019).

Atualmente, se estabeleceu que, enquanto macrófagos derivados de monócitos têm sua origem na medula óssea por meio da hematopoiese, macrófagos

embrionários derivam do saco de yolk e do fígado fetal durante a hematopoiese primitiva. De forma interessante, enquanto os macrófagos embrionários possuem potencial de renovação própria, os derivados de monócitos são terminalmente diferenciados (DeNardo; Ruffell, 2019). A respeito dessa diferença, independente da origem dos macrófagos, ambos possuem um papel importante na homeostase tecidual e na regeneração pós inflamatória. A renovação tecidual chega a um milhão de células por segundo ao dia e cabe aos macrófagos teciduais a remoção das células apoptóticas através de um processo imunologicamente silencioso chamado eferocitose (Viola *et al.*, 2019).

A maioria dos agentes carcinogênicos promovem um processo inflamatório no sítio afetado. Majoritariamente, os processos inflamatórios são mediados pelo sistema imune inato, um mecanismo essencial para a proteção contra agentes externos, células defeituosas e detritos celulares. Macrófagos e neutrófilos são sensíveis a sinais deletérios, como bactérias e vírus, e reagem engolfando estes elementos. Como parte de sua resposta, essas células produzem moléculas como o óxido nítrico para degradação dos antígenos, além de promover a neovascularização e recrutar células mielóides e linfóides (DeNardo; Ruffell, 2019).

Dentre as células do sistema imunológico, os macrófagos constituem uma classe celular heterogênea e desempenham diversas funções, tanto no contexto da homeostase, quanto da resposta imunológica. O amplo espectro de funções está relacionado com a heterogeneidade e a plasticidade dessas células, o que dificulta a categorização. Contudo, eles podem ser agrupados de forma simplificada em dois extremos: M1 (pró-inflamatório), e M2 (anti-inflamatório ou pró-resolutivo) (Aras; Zaidi, 2017).

A inflamação aguda frequentemente envolve os chamados macrófagos M1, que produzem moléculas tumorílicas como o TNF- α . Os macrófagos M1 possuem capacidade de iniciar e manter a resposta inflamatória, por meio da secreção de enzimas pró-inflamatórias, ativação de células endoteliais e indução do recrutamento de outras células imunes para o tecido inflamado, como as células T (Kim; Bae, 2016) e macrófagos derivados de monócitos (Anderson *et al.*, 2021). No estudo de Strachan *et al.* (2013), o fator estimulante de colônias-1 (CSF-1) não somente reduziu a infiltração por macrófagos, mas também inibiu a progressão tumoral e o processo metastático. Por outro lado, a super expressão de CSF-1 aumentou a taxa de progressão tumoral e de metástase. Outro resultado do estudo, foi em relação a

inibição dos receptores de CSF-1, o que diminui a infiltração por macrófagos e aumentou o recrutamento de células T CD8+, reduzindo tumores de mama e cérvix (Strachan *et al.*, 2013).

Caso a inflamação aguda seja incapaz de controlar o tumor, são recrutados os macrófagos M2 (Viola *et al.*, 2019). Assim, os macrófagos M2 promovem a resolução do processo inflamatório, ao fagocitar células apoptóticas, regular a deposição de colágeno, coordenar a integridade tecidual, liberar mediadores anti-inflamatórios, remodelar a matriz extracelular e facilitar a migração (Ijsselsteijn *et al.*, 2019; Anderson *et al.*, 2021). Aproveitando-se destas funções, as células cancerígenas e TME produzem sinais que cooptam os macrófagos M2 para induzir seu desenvolvimento, bem como promover a invasão dos tecidos adjacentes (Pollard, 2004).

Os macrófagos são um dos principais componentes do TME e podem ser encontrados na porção central do tumor, em suas margens ou no estroma. Na maioria dos tumores, os macrófagos encontrados são do tipo M2, que geralmente favorecem o crescimento e desenvolvimento de um fenótipo invasivo (Kim; Bae, 2016). Os macrófagos associados ao tumor (TAM) são originados de monócitos recrutados para o tecido tumoral e, por sua vez, se diferenciam em resposta à sinalização por meio de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento produzidos em células do estroma e do TME (Mantovani *et al.*, 2004). Entretanto, achados sugerem que essa classificação deva ser revisada, sendo que um amplo espectro de TAMs possivelmente ainda não tenham sido descobertos (Kim; Bae, 2016).

A alta densidade TAMs do tipo M2 se correlaciona com um mau prognóstico, como observado nas neoplasias de bexiga, mama, ovário, estômago e próstata. Por outro lado, os macrófagos do tipo M1 em alta densidade têm sido correlacionados com um melhor prognóstico, como nos tumores de ovário e estômago. Entretanto, além do tipo de macrófago, o prognóstico está associado com a localização dos macrófagos em relação ao TME (Aras; Zaidi, 2017).

Ainda assim, esses padrões não demonstram consistência na literatura. Nos carcinomas colorretais, uma alta densidade de macrófagos do tipo M2 está associada a um melhor prognóstico. Essa discrepância também pode ser explicada pela diferença de marcadores usados nos diferentes estudos para definir os macrófagos e seus subtipos. É quase um consenso que a classificação dicotômica (macrófagos do tipo M1 e M2) é demasiadamente simplificada, principalmente, ao

levar em consideração a elevada plasticidade fenotípica encontrada nessas células (Aras; Zaidi, 2017).

1.5 IMUNOGENICIDADE TUMORAL

O TME no câncer colorretal é influenciado por mutações somáticas e genéticas, bem como eventos epigenéticos. Além disso, o sistema imunológico desempenha um papel crucial, exercendo uma pressão seletiva negativa sobre as células tumorais, devido ao reconhecimento de antígenos não próprios. Para manter esse controle, existem *checkpoints* imunológicos que podem levar à reparação celular ou à destruição das células que apresentam antígenos não reconhecidos como próprios. Falhas nesse processo de reconhecimento podem resultar na tolerância das células tumorais pelo sistema imunológico, contribuindo para a não detecção de defeitos e permitindo a persistência dessas células alteradas (Sillo *et al.*, 2019).

Inúmeros mecanismos podem levar a imunossupressão no câncer colorretal. O recrutamento de células imuno regulatórias, como as células supressoras mielo derivadas, células Treg e macrófagos do tipo M1, pode intensificar o dano às células cancerígenas. Por outro lado, existem fatores que podem comprometer os métodos de apresentação de antígenos. O TME favorece a utilização da via glicolítica para obtenção de energia, mesmo em condições de oxigenação adequada, conhecido como o efeito Warburg. Essa via anabólica favorece a proliferação neoplásica e propicia um ambiente hostil para as células T (Sillo *et al.*, 2019).

Tumores com instabilidade de microssatélites representam cerca de 15% dos tumores colorretais e apresentam um maior número de alterações genéticas, o que leva a uma apresentação de neoantígenos na superfície celular cerca de 50 vezes maior que tumores estáveis. Esse fator leva a uma maior antigenicidade, sendo estes tumores altamente infiltrados por linfócitos T citotóxicos. Devido a isso, esses tumores tendem a ter um melhor prognóstico, bem como possuírem mais alvos potenciais para imunoterapia (Taieb *et al.*, 2022).

As proteínas de reparo tem como função o reparo de pequenos defeitos no DNA. Na sua forma funcional ela formam heterodímeros: MLH1 constroi um complexo funcional com PMS2 e MSH2 com MSH6. As proteínas MLH1e PMS2 são parceiras obrigatorias de seus heterodímeros. Mutações nos genes MLH1 e PMS2

resultam em degradação de seus dímeros respectivos e conseqüentemente perda obrigatória de sua proteína parceira.

A alteração patogênica do gene das proteínas de reparo leva a acumulação de eventos mutacionais no DNA de genes relacionados ao câncer. Desta forma o acúmulo destas instabilidades de microsatélites são responsáveis pelo aparecimento do câncer (Taieb *et al.*, 2022).

Em uma metanálise publicada por Li e colaboradores, em uma avaliação de subgrupos 4 artigos avaliam a relação da alteração da metaloproteinases e a infiltração por macrófagos. Neste estudo pacientes selvagens para mutação apresentaram uma melhor sobrevida quando comparado com indivíduos mutados. Porém os artigos que geraram esta conclusão utilizam métodos de avaliação e técnicas diferentes para identificar os macrófagos, o que torna difícil uma conclusão (Li *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, observou-se significativos avanços no tratamento do câncer colorretal em pacientes com instabilidade de microsatélites, demonstrando respostas completas à imunoterapia sem recidivas após seis meses de acompanhamento (Cercek *et al.*, 2022). Porém, em tumores onde a instabilidade de microsatélites não é identificada, os resultados são menos expressivos, deixando assim uma lacuna para investigações de outros alvos terapêuticos. Dada a marcante influência que os macrófagos exercem sobre os tumores colorretais, é imperativo aprofundar nosso conhecimento sobre como esses elementos interagem. Assim, a avaliação dessas relações é crucial para o desenvolvimento de novos tratamentos para a neoplasia em questão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as taxas de infiltração de Macrófagos M1 e M2 nas neoplasias colorretais com e sem mutações nas metaloproteinases.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as diferentes taxas de infiltrações de macrófagos com fatores prognósticos do câncer colorretal;
- Avaliar as diferentes taxas de infiltrações de macrófagos com a sobrevida de pacientes com câncer colorretal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 GRUPO AMOSTRAL

Foram avaliados, retrospectivamente 33 casos, todos os casos de adenocarcinoma de cólon e reto que se demonstraram mutados para metaloproteinases MLH1, PMS2, MSH6, MSH2. 33 casos controle foram selecionados a partir do indivíduo subsequente que apresentou o diagnóstico de câncer colorretal e que mostrou um padrão selvagem para as mesmas metaloproteinases. Os prontuários foram utilizados do banco de dados da Unidade de Patologia do Hospital Geral de Caxias do Sul, registrados entre 01 de janeiro de 2018 e 31 de dezembro de 2021. Dados clínico-patológicos foram coletados e analisados a partir de prontuários eletrônicos. Foram analisadas as variáveis de idade ao diagnóstico (em anos), estadiamento clínico (estágio I-IV), data do diagnóstico, modalidade de tratamento realizado (cirurgia, quimiorradioterapia), tempo livre de doença (em anos) e tempo de sobrevida (em anos).

3.2 ANÁLISES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

As variáveis em estudo foram a presença de marcadores de membrana de macrófagos CD68, iNOS, CD206 e CD163. O marcador CD68 foi usado como marcador de linfócitos totais, enquanto CD206 e CD163 foram usados como marcadores de macrófagos polarizados M2 e o iNOS como marcador de macrófagos polarizados M1.

As lâminas de eosina-hematoxilina (HE) originais foram revisadas para confirmação diagnóstica. As áreas com maior concentração de macrófagos intratumorais foram identificadas e as mesmas áreas correspondentes examinadas nas lâminas de imuno-histoquímica.

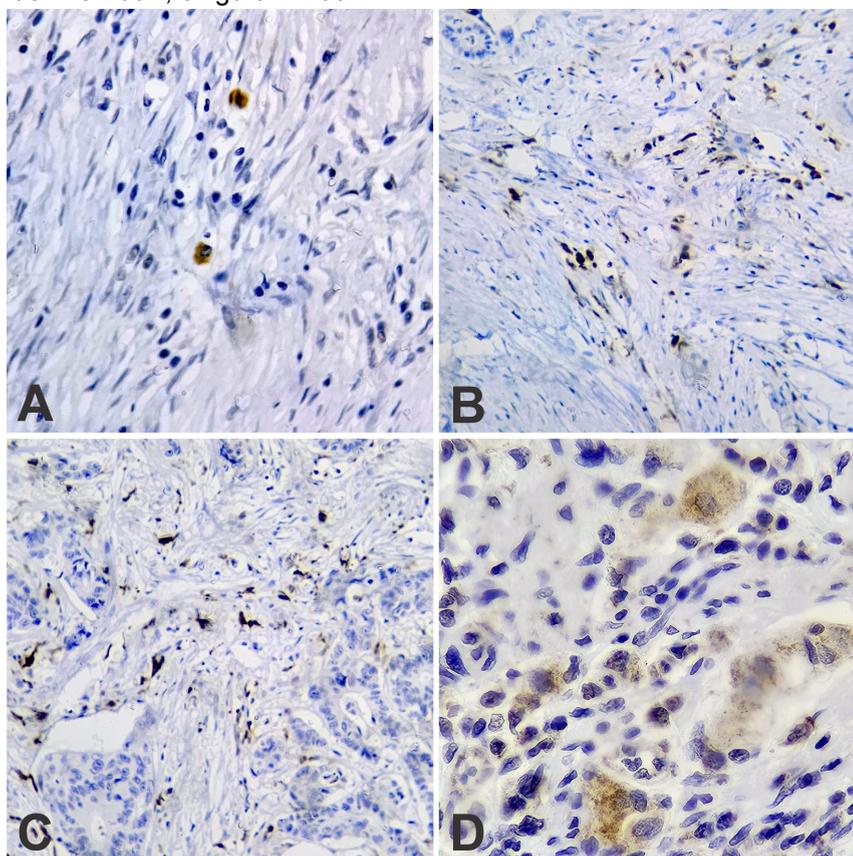
As lâminas de imuno-histoquímica foram confeccionadas por meio de cortes de 3 μm de espessura, obtidas de tecido fixado em formol tamponado a 10%, embocado em parafina. As lâminas foram desparafinizadas e re-hidratadas. A recuperação antigênica foi feita usando Tris-EDTA (Thermo Fischer, Waltham, MA) a 95°C por 20 min. Após, foram incubadas com anticorpos primários anti-iNOS (diluição 1:100, policlonal, Sigma-Aldrich®), CD206 (diluição 1/300, 5C11,

Sigma-Aldrich®), CD163 (diluição 1/200, Policlonal, ArigoBio ®) e CD68 (diluição 1/1500, K-p1, Cell Marque ®), em overnight e coradas com DAB. Macrófagos do próprio tecido foram usados como controle interno.

As lâminas de imuno-histoquímica foram examinadas por dois patologistas de forma independente para avaliar o percentual de macrófagos marcados (Figura 2). O percentual foi feito visualmente em um campo de grande aumento (aumento de 400X). Discordâncias de interpretação foram revisadas por ambos de forma simultânea e um consenso foi estabelecido.

Figura 2 – Análise imuno-histoquímica da expressão dos marcadores de membrana de macrófagos em tecido de câncer colorretal: (A) iNOS, (B) CD68, (C) CD163 e (D) CD206.

*Aumento: figuras A-C 200X, e figura D 400X.



3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados incluiu análises estatísticas descritivas e inferenciais de comparação entre os grupos. Para descrição das variáveis quantitativas foram utilizados os valores de média e desvio-padrão, enquanto para as variáveis qualitativas foram utilizados os valores de frequência absoluta e relativa.

As análises estatísticas inferenciais empregadas foram baseadas em métodos paramétricos e não paramétricos considerando o delineamento independente das variáveis. Para as variáveis quantitativas, foram realizados testes de comparação de médias de uma e duas vias, sendo as premissas de normalidade e homogeneidade das variâncias analisadas a fim de aplicar o teste adequado à distribuição dos dados. Testes multivariados como MANOVA também foram aplicados.

Para as variáveis qualitativas foi aplicado o teste do Qui-Quadrado para independência das variáveis. Para os casos de tabelas com dupla entrada foi aplicado o teste exato de Fischer e para tabelas com outras dimensões foi aplicado o qui-quadrado de Pearson de razão de verossimilhança máxima.

Adicionalmente, foi realizada uma análise de agrupamentos utilizando o algoritmo *k-means*. O número ideal de agrupamentos foi obtido pelo método *elbow*. Nesse caso, foi traçada a variação explicada em função do número de clusters para a escolha do número de grupos a utilizar. Para avaliar a qualidade interna do cluster, a estabilidade do cluster com solução ideal foi calculada usando valores de bootstrap Jaccard com 10.000 execuções.

Um valor de p bicaudal $< 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas usando linguagem de programação R (versão 4.3.1, The R Foundation for Statistical Computing).

3.4 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os pesquisadores assinaram o termo de sigilo e confidencialidade, após aprovação pelo Conselho Científico e Editorial do Hospital Geral e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) designado. Tratando-se de um estudo com biomarcadores, foram seguidas as normativas estabelecidas pelo REMARK do NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics, considerado padrão-ouro para publicações neste campo.

4 RESULTADOS

A amostra foi constituída de 66 casos. Deste total, cinco pacientes não preencheram todos os dados necessários e foram excluídos, restando 61 pacientes para a avaliação estatística. Em relação a presença de mutação das metaloproteinases, 33 pacientes (54,1%) não exibiram mutações, enquanto 28 pacientes (45,9%) apresentaram a referida mutação (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise das variáveis em relação à instabilidade (n=61)

	Instabilidade						Valor <i>p</i>
	n	%	Sem Mutação n=33		Com a Mutação n=28		
			n	%	n	%	
Idade							0,135 ⁺
até 60 anos	15	24,6	11	33,3	4	14,3	
maior que 60 anos	46	75,4	22	66,7	24	85,7	
Sexo							0,093 ⁺
Feminino	43	70,5	20	60,6	23	82,1	
Masculino	18	29,5	13	39,4	5	17,9	
Localização							0,154 ⁺
Cólon Direito	44	72,1	21	54,5	23	78,6	
Cólon Esquerdo	17	27,9	12	45,5	5	21,4	
Estadiamento							0,05 [*]
Estádio I	10	16,9	3	9,7	7	25,0	
Estádio II	19	32,2	7	22,6	12	42,9	
Estádio III	25	42,4	18	58,0	7	25	
Estádio IV	5	8,5	3	9,7	2	7,1	
Colectomia							0,248
Lado Direito	39	63,9	18	54,5	21	75,0	
Lado Esquerdo	15	24,6	10	30,3	5	17,9	
Total	7	11,5	5	15,2	2	7,1	
Linfócitos							0,24
Leve	30	50,0	18	54,6	12	44,4	
Moderado	18	30,0	7	21,2	11	40,7	
Intenso	12	20,0	8	24,2	4	14,9	
Recidiva							0,443 ⁺
Não	49	87,5	26	83,9	23	92,0	
Sim	7	12,5	5	16,1	2	8,0	
Desfecho clínico							1,0 ⁺
Livre de Doença	49	80,3	26	78,8	23	82,1	
Óbito	12	19,7	7	21,2	5	17,9	

*Valores de *p* obtidos por meio do teste exato de Fisher.

As amostras foram categorizadas em dois grupos: pacientes com idade até 60 anos e pacientes com idade superior a 60 anos. Essa divisão mostrou que 46 pacientes (75,4%) possuíam idade superior a 60 anos, e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem mutação das metaloproteinases ($p = 0,135$). Quanto ao sexo, 43 amostras (70,5%) foram

provenientes de pacientes do sexo feminino, também não havendo diferença estatística entre os grupos com e sem mutação para metaloproteinasas ($p = 0,093$).

Ao avaliar o quesito de localização do tumor, 44 pacientes (65,6%) possuíam lesão localizada no cólon direito, enquanto 17 pacientes (27,9%) a lesão estava localizada no cólon esquerdo, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem mutação das metaloproteinasas ($p = 0,062$). As cirurgias realizadas foram colectomia do lado direito em 39 casos (63,9%), colectomia do lado esquerdo em 15 casos (24,6%) e colectomia total para sete casos (11,5%). Das colectomias totais, quatro possuíam a neoplasia em cólon direito e três no cólon esquerdo. Não houve diferença estatística em relação a presença ou não de mutação nestes dois grupos ($p = 0,248$).

Ao utilizar o estadiamento para agrupamento das amostras, 10 eram provenientes de pacientes em estágio I (16,9%), 19 eram estágio II (34,2%), 25 eram do estágio III (42,4%) e cinco do estágio IV (8,5%). Quando levamos em conta a presença da mutação para as metaloproteinasas, os estádios I e II, conjuntamente, apresentaram o maior número de amostras com mutação (67,9%), enquanto os estádios III e IV possuem conjuntamente o maior número de amostras sem mutação (67,7%). Foi identificada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estadiamento com e sem mutação para metaloproteínase com $p=0,05$.

Ao final do período estipulado para coleta de dados, sete pacientes (12,5%) demonstraram doença recidivada, dos quais dois possuíam mutação para as metaloproteinasas (8%) e cinco não possuíam mutação (16,1%), sem diferença estatística entre os grupos ($p = 0,443$).

Ocorreram 12 óbitos (19,7%) durante o estudo, sete (21,2%) do grupo controle e cinco do grupo com mutação (17,9%). Não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de desfecho clínico e a presença e ausência de mutação ($p = 1,0$). Ao analisar pelo estadiamento, ocorreu um óbito em paciente no estágio I, cinco em pacientes no estágio II, três em pacientes no estágio III e três em pacientes no estágio IV.

A maior mortalidade ocorreu no estadiamento IV, somando 60% dos casos (Tabela 2). Do total de óbitos, três tiveram como causa COVID-19, não estando relacionados com recidiva tumoral. Entre os pacientes que vieram a óbito decorrente de complicações do COVID, um paciente estava no estágio I, e dois pacientes no estágio II, sendo que todos apresentavam mutação para metaloproteinasas. Cabe

destacar também que no grupo com mutação, dois pacientes foram a óbito pelo adenocarcinoma e ambos estavam no estágio IV.

Tabela 2 – Análise das variáveis em relação ao estadiamento (n=61).

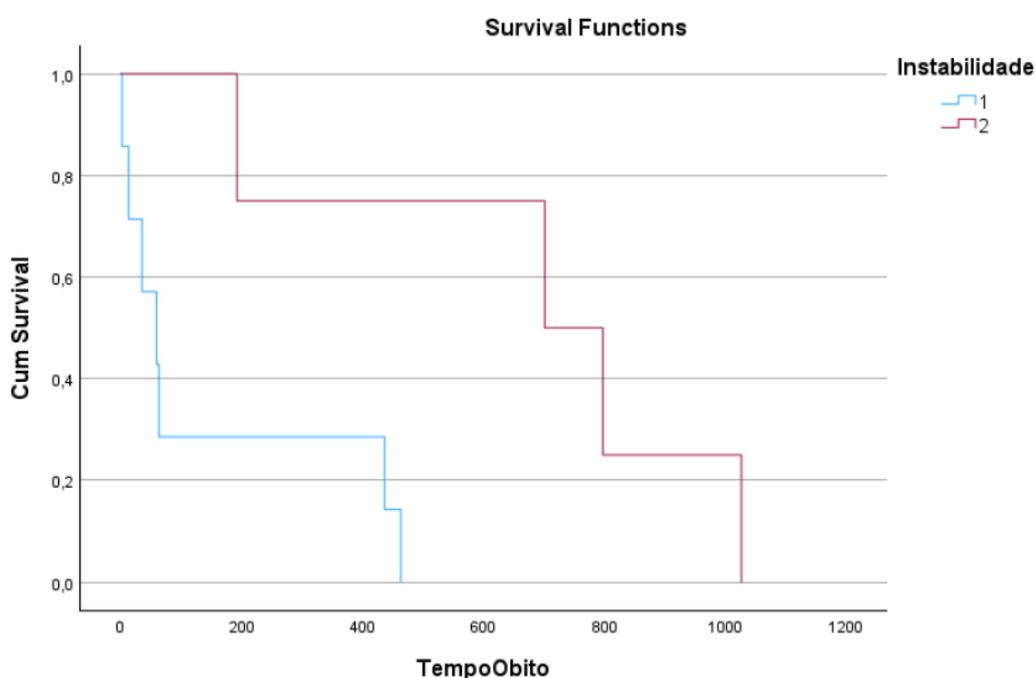
	Estadiamento										Valor-p
			Estádio I n=10		Estádio II n=19		Estádio III n=25		Estádio IV n=5		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Instabilidade											0,05*
Sem Mutação	33	52,5	3	30,0	8	40,0	18	72,0	4	66,66	
Com mutação	28	47,5	7	70,0	12	60,0	7	28,0	2	33,33	
Idade											0,61
até 60 anos	15	24,6	1	10,0	6	30,0	7	28,0	1	16,7	
maior que 60 anos	46	75,4	9	90,0	14	70,0	18	72,0	5	83,3	
Sexo											0,055
Feminino	43	70,5	9	90,0	17	85,0	14	56,0	3	50,0	
Masculino	18	29,5	1	10,0	3	15,0	11	44,0	3	50,0	
Localização											0,722
Cólono Direito	44	72,1	8	80,0	16	80,0	17	68,0	3	50,0	
Cólono Esquerdo	17	27,9	2	20,0	4	20,0	8	32,0	3	50,0	
Colectomia											0,342
Lado Direito	39	63,9	7	70,0	15	75,0	14	56,0	3	50,0	
Lado Esquerdo	15	24,6	3	30,0	3	15,0	6	24,0	3	50,0	
Total	7	11,5	0	0,0	2	10,0	5	20,0	0	0,0	
Linfócitos											0,874
Leve	30	50,0	3	33,3	10	50,0	14	56,0	3	50,0	
Moderado	18	30,0	4	44,4	6	30,0	7	28,0	1	16,6	
Intenso	12	20,0	2	22,2	4	20,0	4	16,0	2	33,3	
Recidiva											0,59
Não	49	87,5	9	100,0	16	89,0	19	82,6	5	83,3	
Sim	7	12,5	0	0,0	2	11,0	4	17,4	1	16,7	
Desfecho clínico											0,022*
Livre de Doença	49	80,3	8	80,0	17	85,0	22	88,0	2	33,3	
Óbito	12	19,7	1	10,0	3	15,0	3	12,0	4	66,6	

Variáveis qualitativas expressas em valores de frequência absoluta e frequência relativa.

O valor percentual apresentado para a frequência relativa é considerando o percentual de casos válidos, ou seja, excluindo os valores faltantes.

Em termos do tempo até óbito dos pacientes com e sem mutação para metaloproteinases (Figura 3), observamos que a distribuição das curvas de sobrevida para as condições apresentou diferença estatisticamente significativas ($p = 0,016$). O grupo de pacientes com mutação apresentam uma maior sobrevida, enquanto que os pacientes sem mutação demonstram uma tendência de ir a óbito mais precocemente.

Figura 3 – Curva de sobrevida dos pacientes com e sem mutação para metaloproteinase. A linha em azul é dos pacientes sem mutação (instabilidade 1), enquanto a linha em bordo é dos pacientes com mutação (instabilidade 2).



Os dados apresentaram uma considerável heterogeneidade quanto à presença de macrófagos nas neoplasias. Em geral, as variáveis quantitativas demonstraram um desvio padrão muito alto, o que tornou difícil sua avaliação. O marcador CD68 para macrófagos totais apresentou uma média de 32 macrófagos por campo com um desvio padrão de 26. Os marcadores CD163 e CD206, indicativos para macrófagos polarizados M2, apresentaram médias de 23 e 17, com desvio padrão de 21 e 17, respectivamente (Tabela 3). Já o marcador iNOS para macrófagos polarizados M1 apresentou média de cinco macrófagos por campo com desvio padrão de 11.

Tabela 3 – Análise fatorial da macrófagos Localização do tumor (n=61).

		N	%	Média ± Desvio-Padrão	Valor-p
CD68					0,757
Lado Direito	Sem Mutação	21	47,7	31,667 ± 25,997	
	Com Mutação	23	52,3	30,0 ± 25,849	
Lado Esquerdo	Sem Mutação	12	70,6	33,75 ± 28,534	
	Com Mutação	5	29,4	37,2 ± 32,042	
CD163					0,256
Lado Direito	Sem Mutação	21	47,7	23,881 ± 20,987	
	Com Mutação	23	52,3	20,109 ± 19,934	
Lado Esquerdo	Sem Mutação	12	70,6	21,750 ± 24,076	
	Com Mutação	5	29,4	33,3 ± 28,504	
CD206					0,117
Lado Direito	Sem Mutação	21	47,7	19,057 ± 19,358	
	Com Mutação	23	52,3	14,226 ± 15,599	
Lado Esquerdo	Sem Mutação	12	70,6	15,458 ± 12,648	
	Com Mutação	5	29,4	27,4 ± 23,954	
iNOS					0,179
Lado Direito	Sem Mutação	21	47,7	6,767 ± 13,487	
	Com Mutação	23	52,3	3,57 ± 4,831	
Lado Esquerdo	Sem Mutação	12	70,6	3,383 ± 4,522	
	Com Mutação	5	29,4	8,21 ± 15,199	

Ao examinar o efeito das variáveis dos pacientes em relação à densidade de macrófagos averiguada pelos marcadores CD163, iNOS e CD206 em conjunto, observou-se um efeito de interação estatisticamente significativo entre instabilidade e desfecho clínico (Tabela 4, $p = 0,019$). De forma individual, a densidade de macrófagos obtida pelos marcadores não demonstrou diferença estatística significativa entre os agrupamentos com as variáveis estudadas de mutação para metaloproteinasas, idade, sexo, localização do tumor, estadiamento, TILS, recidiva e desfecho clínico (Tabela 5).

Tabela 4 – Análise Manova de macrófagos CD163, iNOS e CD206 combinados (n=61).

	Graus de Liberdade	F	Teste Hotelling-Lawley	Valor-p
Instabilidade	1	0,314	0,005	0,958
Idade	1	0,537	0,028	0,659
Localização	1	0,058	0,003	0,936
Estadiamento	3	1,697	0,296	0,094
Recidiva	1	0,650	0,038	0,586
Desfecho clínico	1	1,929	0,102	0,305
Instabilidade * Localização	1	1,061	0,006	0,322
Instabilidade * Desfecho Clínico	1	2,592	0,141	0,019

Tabela 5 – Avaliação dos macrófagos (n=61).

	n	%	CD68 Média ± DP	Valor-p	CD163 Média ± DP	Valor-p	iNOS Média ± DP	Valor-p	CD206 Média ± DP	Valor-p
Instabilidade				0,753		0,868		0,524		0,690
Sem Mutação	33	54,1	32,424 ± 26,52		23,106 ± 21,809		5,536 ± 11,11		17,748 ± 17,097	
Com mutação	28	45,9	31,286 ± 26,541		22,464 ± 21,694		4,398 ± 7,518		16,579 ± 17,598	
Idade				0,483		0,706		0,993		0,251
até 60 anos	15	24,6	33,0 ± 21,696		22,5 ± 17,687		5,377 ± 9,082		20,067 ± 15,374	
maior que 60 anos	46	75,4	31,543 ± 27,861		22,913 ± 22,877		4,896 ± 9,819		16,280 ± 17,804	
Sexo				0,295		0,496		0,701		0,275
Feminino	43	70,5	33,953 ± 26,403		23,919 ± 21,043		4,526 ± 6,575		19,191 ± 18,764	
Masculino	18	29,5	27,0 ± 26,183		20,167 ± 23,208		6,181 ± 14,644		12,483 ± 11,825	
Localização				0,77		0,923		0,332		0,551
Cólon Direito	44	72,1	30,795 ± 25,63		21,909 ± 20,293		5,095 ± 4,803		16,532 ± 17,457	
Cólon Esquerdo	17	27,9	34,765 ± 28,619		25,147 ± 25,121		4,803 ± 8,772		18,971 ± 16,879	
Estadiamento				0,371		0,454		0,402		0,973
Estádio I	10	16,9	24,5 ± 21,141		15,65 ± 15,431		5,06 ± 6,184		16,1 ± 15,911	
Estádio II	19	32,2	37,368 ± 25,732		24,079 ± 21,545		6,029 ± 8,282		18,684 ± 17,811	
Estádio III	25	42,4	28,84 ± 26,226		22,42 ± 22,71		2,868 ± 3,554		17,808 ± 19,248	
Estádio IV	5	8,5	43,0 ± 38,987		34,4 ± 28,369		12,8 ± 28,066		10,94 ± 8,029	
Colectomia				0,93		0,994		0,59		0,634
Lado Direito	39	63,9	31,026 ± 26,462		22,474 ± 20,703		4,954 ± 10,326		18,069 ± 17,915	
Lado Esquerdo	15	24,6	33,4 ± 28,306		23,567 ± 24,243		3,777 ± 5,634		16,033 ± 14,502	
Total	7	11,5	33,571 ± 24,616		23,071 ± 23,816		8,0 ± 12,342		14,957 ± 20,454	
Linfócitos				0,636		0,593		0,544		0,417
Leve	30	50,0	33,867 ± 28,295		36,25 ± 27,89		6,555 ± 11,843		16,033 ± 16,511	
Moderado	18	30,0	26,944 ± 22,37		22,567 ± 23,103		2,339 ± 3,0		15,261 ± 15,029	
Intenso	12	20,0	36,25 ± 27,89		21,306 ± 20,569		5,583 ± 9,758		24,1 ± 21,661	
Recidiva				0,499		0,719		0,388		0,941
Não	49	87,5	33,98 ± 26,279		24,337 ± 22,125		5,637 ± 10,421		17,518 ± 16,553	
Sim	7	12,5	30,714 ± 31,282		22,929 ± 22,606		2,507 ± 3,446		22,286 ± 25,063	
Desfecho clínico				0,252		0,429		0,208		0,167
Livre de Doença	49	80,3	30,261 ± 25,51		23,378 ± 21,317		4,578 ± 6,32		10,392 ± 9,601	
Óbito	12	19,7	27,917 ± 30,261		20,5 ± 23,434		6,796 ± 17,917		18,882 ± 18,273	

Uma vez que existe um alto grau de heterogeneidade nos dados, métodos de aprendizado de máquina foram utilizados para avaliar possíveis padrões para a densidade de macrófagos. Nestes dados podemos averiguar a divisão em dois grupos distintos: (i) grupo 1 com maior densidade de macrófagos; e (ii) grupo 2 com menor densidade de macrófagos por campo (Tabela 6). Além disso, foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os dois agrupamentos para a densidade de macrófagos identificados por campo utilizando o marcador CD68 ($p < 0,01$). O grupo 1 apresentou média de 64 macrófagos por campo, enquanto o grupo 2 com média de 17 macrófagos por campo. Utilizando o marcador CD206 também foi identificada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,01$), o grupo 1 e 2 apresentaram em média 38 e 7 macrófagos por campos, respectivamente. Por fim, com o marcador CD163 foi evidenciado no grupo 1 em média 50 macrófagos por campo e no grupo 2 em média 15 macrófagos por campo ($p < 0,01$).

Tabela 6 – Análise das variáveis em relação ao resultado do agrupamento (n=61).

	Análise por Agrupamento		Valor-p
	Grupo 1 n=19	Grupo 2 n=42	
CD 68	64,737 ± 17,048	17,048 ± 12,61	< 0,01
CD163	50,053 ± 10,488	15,29 ± 8,897	< 0,01
iNos	9,474 ± 15,19	2,996 ± 4,389	0,064
CD 206	38,211 ± 14,635	7,712 ± 6,462	< 0,01
Idade (anos completos)	64,947 ± 11,038	66,405 ± 12,655	0,548
Tempo Óbito (dias)	161,333 ± 238,123	421,875 ± 391,745	0,279

Variáveis quantitativas expressas em valores de média ± desvio-padrão.

Os resultados da análise de agrupamento são corroborados com a análise que correlaciona as medições obtidas pelos diferentes marcadores para identificação dos macrófagos (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise de correlação entre variáveis de medição de macrófagos (n=61).

Comparação	Rho	Valor p
CD68 * CD163	0,897	<0,001***
CD68 * iNOS	0,556	<0,001***
CD68 * CD206	0,783	<0,001***
CD68 * Idade	-0,155	0,233
CD163 * iNOS	0,466	<0,001***
CD163 * CD206	0,796	<0,001***
CD163 * Idade	-0,156	0,229
iNOS * CD206	0,383	0,002**
iNOS * Idade	-0,206	0,112
CD206 * Idade	-0,233	0,07

* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Quando avaliamos estes dois grupos de cluster, notamos que as variáveis estudadas neste trabalho como presença de mutação para metaloproteinase, estadiamento, localização do tumor e sobrevida não demonstraram relação estatisticamente significativa Tabela 8.

Tabela 8 – Análise das variáveis em relação ao resultado do agrupamento (n=61).

	Análise por Agrupamento						Valor p
			Grupo 1		Grupo 2		
			n	%	n	%	
Instabilidade							0,785 ⁺
Sem Mutação	33	52,5	11	57,9	22	52,4	
Com Mutação	28	47,5	8	42,1	20	47,6	
Idade							1,0 ⁺
até 60 anos	15	24,6	5	26,3	10	23,8	
maior que 60 anos	46	75,4	14	73,7	32	76,2	
Sexo							0,14 ⁺
Feminino	43	70,5	16	84,2	27	64,3	
Masculino	18	29,5	3	15,8	15	35,71	
Localização							0,76 ⁺
Cólon Direito	44	72,1	13	68,4	31	73,8	
Cólon Esquerdo	17	27,9	6	31,6	11	26,2	
Estadiamento							0,96
Estádio I	10	16,9	3	16,7	7	17,1	
Estádio II	19	32,2	6	33,3	13	31,7	
Estádio III	25	42,4	7	38,9	18	43,9	
Estádio IV	5	8,5	2	11,1	3	7,3	
Colectomia							0,592
Lado Direito	39	63,9	13	68,4	26	61,9	
Lado Esquerdo	15	24,6	5	26,3	10	23,8	
Total	7	11,5	1	5,3	6	14,3	
Linfócitos							0,91
Leve	30	50,0	18	54,6	12	44,4	
Moderado	18	30,0	7	21,2	11	40,7	
Intenso	12	20,0	8	24,2	4	14,9	
Recidiva							0,679 ⁺
Não	49	87,5	16	84,2	33	78,5	
Sim	7	12,5	3	15,8	4	9,5	
Desfecho clínico							0,737 ⁺
Recuperado	50	82,0	16	84,2	34	81,0	
Óbito	11	18,0	3	15,8	8	19,0	

⁺Valores de p obtidos por meio do teste exato de Fisher.

5 DISCUSSÃO

Os macrófagos representam um tipo celular essencial para a manutenção da integridade, homeostasia e reparo dos tecidos. Eles desempenham funções especializadas nos tecidos de diferentes órgãos em que se localizam, o que é refletido em amplas variações em termos de expressão gênica (Biswas; Mantovani, 2010).

Originados de duas ondas de hematopoiese durante o desenvolvimento fetal, com formação no saco de yolk e no fígado (Nielsen; Schmid, 2017), os macrófagos incorporam-se nos tecidos. Essas células possuem capacidade de proliferação, o que mantém uma população estável. Entre os exemplos de macrófagos estão as células de Kupffer no fígado, as microglias no cérebro e células de Langerhans na pele. Contudo, nem todos tecidos mantêm macrófagos de origem embrionária de forma permanente. No cólon, por exemplo, eles são rapidamente substituídos por macrófagos derivados de monócitos. Nesse caso, o terceiro local de formação ocorre na medula óssea, onde células-tronco desse tecido produzem os monócitos que são liberados na corrente sanguínea. Esses monócitos podem ser recrutados para diferentes tecidos e subsequentemente se diferenciam em macrófagos. As células tronco da medula passam a ser fonte exclusiva de formação de macrófagos após o nascimento (DeNardo; Ruffell, 2019).

Dentre as principais funções dos macrófagos está sua atuação na homeostasia e resolução da inflamação. Eles não podem ser considerados uma população única com fenótipo e atividade biológica definida. De fato, macrófagos apresentam uma diversidade de funções dependentes do tecido em que se localizam e da condição patológica. Essa variação é regulada por uma série de respostas epigenéticas responsáveis pelo direcionamento de diferentes fenótipos, especialmente relacionadas ao interferon e metabolismo (DeNardo; Ruffell, 2019).

Os macrófagos desempenham outra função essencial ao regular a angiogênese e eliminar células apoptóticas. Além disso, exercem um papel dual na modulação da resposta inflamatória. Esses são responsáveis pela secreção de mediadores inflamatórios, como TNF- α , interleucina-1 β e óxido nítrico, que ativam os mecanismos de defesa antimicrobianos e contribuem para a destruição do organismo invasor (macrófagos do tipo M1). Os mecanismos pró-inflamatórios podem ser prejudiciais aos tecidos normais, podendo contribuir para a progressão

de determinadas doenças. Portanto, existe uma necessidade de regular os macrófagos, seja através da apoptose ou alterando sua plasticidade para um fenótipo anti-inflamatório (macrófago do tipo M2). Isso resulta na redução da resposta inflamatória e facilita o processo de cicatrização da lesão (Vinnakota *et al.*, 2017)

O TME compreende todas as células não tumorais, incluindo fibroblastos, células endoteliais, neurônios, adipócitos, células imunes inatas e adaptativas, além de componentes não celulares incluindo matriz extracelular e moléculas solúveis, tais como quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e vesículas extracelulares. Nesse contexto, é essencial investigar os macrófagos utilizando diversas abordagens, uma vez que suas funções e marcadores expressos variam conforme sua polarização (Lavin; Merad, 2013). De forma geral, os macrófagos são classificados em polarização M1 (pró-inflamatória) e M2 (anti-inflamatória). Todavia, existe um amplo espectro dentro dessas duas classificações. Os macrófagos M2 podem ser subdivididos em quatro categorias, sendo a categoria M2d designada como TAM (Viola *et al.*, 2019).

Os TAMs são abundantes no TME de diversas neoplasias e geralmente estão associados a um mau prognóstico. Nesse cenário, os TAMs estão estabelecidos como pró-tumorais, sendo que estimulam a inflamação, facilitam a evasão cancerígena do sistema imunológico, promovem a angiogênese e aceleram a invasão tumoral e a metástase. Uma vez que os TAMs compreendem o tipo celular imunológico predominante no ambiente tumoral, as interações entre esses macrófagos e as células cancerígenas modulam a progressão da neoplasia (Xiao; Yu, 2021). A extensão em que macrófagos regulam a progressão da neoplasia está criticamente ligada às propriedades da célula tumoral. Isso inclui a possibilidade de produção de fatores como o CSF1 e o CCL2 que promovem o recrutamento de macrófagos. As propriedades do TME, incluindo fibrose, hipóxia, disponibilidade de nutrientes e fatores derivados de linfócitos, parecem ser responsáveis pela alteração fenotípica dos macrófagos (DeNardo; Ruffell, 2019). Por esses motivos, o interesse no uso de TAMs como potenciais alvos para imunoterapia vêm crescendo progressivamente.

Neste trabalho, foi utilizado o marcador CD68, um pan marcador de macrófagos para identificação em sua totalidade em tecido tumoral (Heng *et al.*,

2023). Para avaliarmos a polarização utilizamos o marcador iNOS para classificar os macrófagos M1 e os marcadores CD163 e CD206 para os macrófagos M2.

Os macrófagos M1, também conhecidos como pró-inflamatórios ou anti-tumorigênicos, são tradicionalmente identificados pela elevada expressão de TNF- α , iNOS ou MHC classe II. Assim, a escolha de iNOS como marcador de macrófagos polarizados M1 é respaldada por diferentes estudos (e.g. Klug *et al.*, 2013; Lisi *et al.*, 2017; Xue *et al.*, 2018).

Os macrófagos do tipo M2 (anti-inflamatórios ou pró-tumorigênicos) expressam elevados níveis de arginina 1, IL-10, CD163, CD204, CD206. Dessa forma, essas moléculas apresentam potencial para uso como marcadores. O CD163 foi empregado como marcador em diversos estudos (Shabo *et al.*, 2009; Aras; Zaidi, 2017; Pinto *et al.*, 2019). Entretanto, Barros *et al.* (2013) sugere que CD163 pode não ser um marcador adequado para os macrófagos M2, visto a não especificidade (Barros *et al.*, 2013). Em relação ao marcador CD206, sua utilização para identificação de macrófagos do tipo M2 é respaldado por Viola *et al.* (2019), Xu *et al.* (2019), Konstantinov *et al.* (2022) e Heng *et al.* (2023). Assim, devido aos diferentes resultados obtidos com os marcadores na literatura, optamos por utilizar os dois marcadores, CD163 e CD206, para a avaliação de macrófagos M2 no presente estudo.

Existem diferentes metodologias para a avaliação de macrófagos no tecido tumoral. Neste estudo, a mensuração dos macrófagos seguiu a metodologia descrita no manual do ensaio PD-L1 IHC 22C3 pharmDx[®], o qual é originalmente empregado para a mensuração do marcador PDL-1 em amostras de câncer de pulmão (Agilent/Dako, 2018). Para mensuração dos macrófagos em amostras de câncer colorretal, dois patologistas determinaram a área de maior concentração de macrófagos no tumor usando a coloração do marcador CD68. Esta área foi então avaliada por ambos patologistas, que determinaram o percentual de macrófagos corados com CD163, CD206 e iNOS usando o escore *Tumor Proportion Score* (TPS). O TPS representa o percentual de células tumorais viáveis que apresentam coloração parcial ou completa (>1+), em relação ao total de células tumorais viáveis presentes na amostra.

No estudo conduzido por Forssell *et al.* (2007), que incluiu 488 casos de tumor colorretal, observou-se que níveis elevados de macrófagos na margem do tumor estavam correlacionados a um prognóstico mais favorável. Diferente da

proposta de Forssell *et al.* (2007), nossa avaliação não utilizou a localização dos macrófagos no tumor, uma vez que a área da amostra era pequena para realização de subdivisões. Importante ressaltar que no estudo Forssell *et al.* (2007), ao citar apenas a avaliação do marcador CD68, os autores não realizaram a diferenciação dos macrófagos em suas polarizações (M1 e M2).

Em paralelo à avaliação dos macrófagos, uma classificação dos tumores em respeito à mutação das metaloproteinases foi realizada visando contemplar as diferentes vias de progressão tumoral. Enquanto uma via ocorre devido às instabilidades cromossômicas envolvendo genes como o APC e o P53, outra origina a partir da perda de funcionalidade em proteínas de reparo do DNA. O déficit nas proteínas de reparo representa cerca de 15% de todos os tumores colorretais. No entanto, a amostragem do estudo de Varela *et al.* (2021) identificou a presença desse problema em 5,5% dos casos, um achado muito próximo dos resultados obtidos por Koelzer *et al.* (2016), em que 6,4% dos pacientes demonstraram mutação. Conforme os resultados obtidos em nosso estudo, a presença de mutação está relacionada com estádios mais precoces da doença, sendo que 68% se encontravam nos estádios I e II. Evidentemente, essa relação também foi observada em outras pesquisas (Zhao *et al.*, 2019; Taieb *et al.*, 2022).

Outra característica marcante dos tumores com mutação nas metaloproteinases é a maior sobrevida (IJsselsteijn *et al.*, 2019), que também foi observada no presente estudo ($p = 0,016$). Em nossa amostragem, apenas dois pacientes com mutações nas proteínas de reparo foram a óbito devido ao câncer colorretal. Os outros três óbitos desse grupo foram referentes a pacientes em estádios I e II do câncer e ocorreram devido a COVID-19. As outras variáveis do estudo, sendo elas idade, sexo, localização do tumor, cirurgia realizada, TILS e quantidade de macrófagos, não apresentaram associação significativa com a taxa de sobrevida. Vale notar que uma correlação entre sobrevida total e tempo livre de doença foi demonstrada por Feng *et al.* (2019), estudo que objetivou selecionar um grupo que se beneficiaria de quimioterapia adjuvante em pacientes do estágio II do câncer de cólon (Feng *et al.*, 2019).

A avaliação da densidade de macrófagos não demonstrou diferença significativa entre pacientes com e sem mutação para metaloproteinases. Nossos achados corroboram o estudo de Edin *et al.* (2012), o qual investigou a presença de macrófagos M1 e M2 em borda tumoral e não encontrou diferença no recrutamento

dessas células entre pacientes com e sem mutação para microssatélites (Edin *et al.*, 2012). Por outro lado, Bauer *et al.* (2011) encontraram uma maior infiltração por macrófagos em pacientes com instabilidade em microssatélites, porém não avaliaram sua relação com fatores prognósticos (Bauer *et al.*, 2011).

Em relação ao número de macrófagos obtido a partir da análise por imunohistoquímica, nossos resultados retratam uma correlação positiva entre a quantidade de macrófagos verificados com os marcadores CD68, CD163, CD206 e iNOS. Esses dados estão parcialmente de acordo com o estudo realizado por Koelzer *et al.* (2016), o qual obteve correlação entre CD68 e CD163, mas não entre CD68 e iNOS (Koelzer *et al.*, 2016).

Embora os TAMs sejam frequentemente apresentados como fator de mau prognóstico (Oosterling *et al.*, 2005; Jedinak; Dudhgaonkar; Sliva, 2010), essa relação ainda é controversa no câncer colorretal conforme demonstrado na metanálise realizada por Zhang *et al.* (2012), que comparou a presença de macrófagos e prognóstico para a doença (Zhang *et al.*, 2012). Essa incerteza permanece diante das divergências encontradas na literatura. No estudo de Khorana *et al.* (2003), os autores mostram que a infiltração por TAMs e VEGF estão associados com melhor prognóstico (Khorana *et al.*, 2003). Já no trabalho conduzido por Shabo *et al.* (2009), verificou-se uma maior recidiva e menor sobrevida para tumores de reto com maior expressão de CD163 (Shabo *et al.*, 2009). Os TAMs também apresentam potencial como preditores de metástases hepáticas, sendo que uma diminuição de M1 e aumento de M2 podem ser verificados em pacientes do estágio IIIB, mais propensos a desenvolver metástases (Cui *et al.*, 2013).

Em outra metanálise explorando 24 estudos, foi verificada uma elevada taxa de infiltração por TAMs associada com uma sobrevida favorável em cinco anos para casos de câncer colorretal (hazards ratio = 0,69, intervalo de confiança de 95% = 0,55-0,87), porém com um alto índice de heterogeneidade (79,3%) Li *et al.* (2020). Divididos em subgrupos, pacientes sem mutação para proteínas de reparo mostraram um melhor prognóstico em comparação com pacientes deficientes nestas proteínas (Li *et al.*, 2020). Na presente pesquisa, não foi encontrada diferença significativa na quantidade de macrófagos entre os possíveis agrupamentos com as variáveis estudadas, o que inclui relação com o prognóstico. Embora esses resultados sejam divergentes da metanálise, eles estão em concordância com 16 estudos dos 27 artigos selecionados para avaliação no trabalho de Li *et al.* (2020).

Os achados do presente artigo em combinação com informações da literatura sugerem que ainda não possuímos uma resposta definitiva para a relação de macrófagos com tumores.

A análise por agrupamentos retornou dois clusters bem definidos quanto a quantidade de macrófagos encontrados (Tabela 6). Ao cruzar os dados nesses agrupamentos, não obtivemos diferença significativa quanto ao resultado do prognóstico. Em contraste, a quantidade de macrófagos explorada no estudo de Koelzer *et al.* (2016) se correlaciona ao prognóstico. Outro trabalho que procurou investigar essa associação entre macrófagos e prognóstico utilizou a razão CD206/CD68 como um fator para o surgimento de metástases hepáticas (Feng *et al.*, 2019).

Em geral, foram observadas divergências na literatura em relação à quantidade de macrófagos. A polarização dos macrófagos parece ser um fator importante para a progressão tumoral e portanto apresenta potencial para predição do prognóstico. Além disso, vale destacar que o local de infiltração também deve ser levado em consideração, sendo esse no estroma ou no front tumoral. Embora os resultados deste estudo não tenham apresentado inferências estatísticas significativas, os achados abrem portas para uma investigação mais profunda. A identificação de padrões na quantidade de macrófagos sob o ponto de vista prognóstico, bem como a possibilidade de manipular essas células por meio de imunoterapia, compreendem as principais linhas de pesquisa que buscam avanços na área de estudo da medicina do câncer.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, não foi encontrada diferença na presença de macrófagos polarizados, seja M1 ou M2, entre os grupos de pacientes com ou sem mutação nos genes de reparo de DNA. Também não foi identificada diferença estatisticamente significativa, ao avaliar os fatores preditores com câncer colorretal e a sobrevida. Esses resultados podem ser atribuídos à amostra reduzida de pacientes, bem como ao período limitado de observação.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Nossos achados, embora iniciais e podem fornecer subsídios para futuros estudos. Em particular, ressaltamos a viabilidade de empregar técnicas de mineração de dados, como a clusterização, para uma caracterização mais aprofundada dos grupos com baixa e alta presença de macrófagos. Por fim, almejamos que em pesquisas futuras possamos aprimorar nosso entendimento sobre a manipulação dos macrófagos para o controle das neoplasias colorretais.

REFERÊNCIAS

- AGILENT/DAKO. **PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual – NSCLC**. Santa Clara, CA: Agilent Technologies, 2018.
- ANDERSON, N. R. et al. Macrophage-Based Approaches for Cancer Immunotherapy. **Cancer Research**, v. 81, n. 5, p. 1201–1208, 2021.
- ARAS, S.; ZAIDI, M. R. TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 11, p. 1583–1591, 2017.
- BARROS, M. H. M. et al. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PloS One**, v. 8, n. 11, p. e80908, 2013.
- BAUER, K. et al. Dendritic cell and macrophage infiltration in microsatellite-unstable and microsatellite-stable colorectal cancer. **Familial Cancer**, v. 10, n. 3, p. 557–565, 2011.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, 2010.
- CERCEK, A. et al. PD-1 Blockade in Mismatch Repair-Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 25, p. 2363–2376, 2022.
- CUI, Y.-L. et al. Correlations of tumor-associated macrophage subtypes with liver metastases of colorectal cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 14, n. 2, p. 1003–1007, 2013.
- DENARDO, D. G.; RUFFELL, B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. **Nature Reviews. Immunology**, v. 19, n. 6, p. 369–382, 2019.
- EDIN, S. et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. **PloS One**, v. 7, n. 10, p. e47045, 2012.
- FENG, Q. et al. Tumor-associated Macrophages as Prognostic and Predictive Biomarkers for Postoperative Adjuvant Chemotherapy in Patients with Stage II Colon Cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 25, n. 13, p. 3896–3907, 2019.
- FORSSELL, J. et al. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 5, p. 1472–1479, 2007.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HENG, Y. et al. CD206+ tumor-associated macrophages interact with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and predict adverse patient outcome in human laryngeal squamous cell carcinoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 21, n. 1, p. 167, 2023.
- IJSSELSTEIJN, M. E. et al. Colorectal cancer: A paradigmatic model for cancer immunology and immunotherapy. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 69, p. 123–129, 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional De Câncer, 2022.
- JEDINAK, A.; DUDHGAONKAR, S.; SLIVA, D. Activated macrophages induce metastatic behavior of colon cancer cells. **Immunobiology**, v. 215, n. 3, p. 242–249, 2010.

KHORANA, A. A. et al. Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis. **Cancer**, v. 97, n. 4, p. 960–968, 2003.

KIM, J.; BAE, J.-S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 6058147, 2016.

KLUG, F. et al. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS⁺/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. **Cancer Cell**, v. 24, n. 5, p. 589–602, 2013.

KOELZER, V. H. et al. Phenotyping of tumor-associated macrophages in colorectal cancer: Impact on single cell invasion (tumor budding) and clinicopathological outcome. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 4, p. e1106677, 2016.

KONSTANTINOV, A. S. et al. Role of macrophages in progression of colorectal cancer: a contrast with the traditional paradigm. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 15, n. 10, p. 403–411, 2022.

LAVIN, Y.; MERAD, M. Macrophages: gatekeepers of tissue integrity. **Cancer Immunology Research**, v. 1, n. 4, p. 201–209, 2013.

LI, J. et al. Tumor-associated macrophage infiltration and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 35, n. 7, p. 1203–1210, 2020.

LISI, L. et al. Expression of iNOS, CD163 and ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma. **Neuroscience Letters**, v. 645, p. 106–112, 2017.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.

NIELSEN, S. R.; SCHMID, M. C. Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 9624760, 2017.

OOSTERLING, S. J. et al. Macrophages direct tumour histology and clinical outcome in a colon cancer model. **The Journal of Pathology**, v. 207, n. 2, p. 147–155, 2005.

PINTO, M. L. et al. The Two Faces of Tumor-Associated Macrophages and Their Clinical Significance in Colorectal Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1875, 2019.

POLLARD, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 4, n. 1, p. 71–78, 2004.

SCODELLER, P. et al. Precision Targeting of Tumor Macrophages with a CD206 Binding Peptide. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 14655, 2017.

SHABO, I. et al. Expression of the macrophage antigen CD163 in rectal cancer cells is associated with early local recurrence and reduced survival time. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 8, p. 1826–1831, 2009.

SILLO, T. O. et al. Mechanisms of immunogenicity in colorectal cancer. **The British Journal of Surgery**, v. 106, n. 10, p. 1283–1297, 2019.

STRACHAN, D. C. et al. CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing infiltration by CD8⁺ T cells. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 12, p. e26968, 2013.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAIEB, J. et al. Deficient mismatch repair/microsatellite unstable colorectal cancer: Diagnosis, prognosis and treatment. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 175, p. 136–157, 2022.

THANIKACHALAM, K.; KHAN, G. Colorectal Cancer and Nutrition. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 164, 2019.

VARELA, G. B. et al. **Prevalência de Alterações nas Proteínas de Reparo do Adenocarcinoma Colorretal em Serviço de Referência no Sul do Brasil**. Journal of Coloproctology. *In*: 69A CONGRESSO BRASILEIRO 27° CONGRESSO LATINOAMERICANO DE COLOPROCTOLOGIA 2021, Online: Journal of Coloproctology, v. 41, p. S1-S235, 2021.

VINNAKOTA, K. et al. M2-like macrophages induce colon cancer cell invasion via matrix metalloproteinases. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 12, p. 3468–3480, 2017.

VIOLA, A. et al. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1462, 2019.

WANG, H.; TIAN, T.; ZHANG, J. Tumor-Associated Macrophages (TAMs) in Colorectal Cancer (CRC): From Mechanism to Therapy and Prognosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8470, 2021.

XIAO, Y.; YU, D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 221, p. 107753, 2021.

XU, Z.-J. et al. The M2 macrophage marker CD206: a novel prognostic indicator for acute myeloid leukemia. **Oncoimmunology**, v. 9, n. 1, p. 1683347, 2020.

XUE, Q. et al. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3805, 2018.

ZHANG, Q. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. **PloS One**, v. 7, n. 12, p. e50946, 2012.

ZHAO, P. et al. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 12, n. 1, p. 54, 2019.