

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GABRIELA RUVA FAGUNDES

DIFERENCIAÇÃO MACROFÁGICA INDUZIDA POR NANOPARTÍCULAS DE
FOSFATIDILSERINA/7-CETOCOLESTEROL

PONTA GROSSA
2026

GABRIELA RUVA FAGUNDES

DIFERENCIAÇÃO MACROFÁGICA INDUZIDA POR NANOPARTÍCULAS DE
FOSFATIDILSERINA/7-CETOCOLESTEROL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas na área de Fisiopatologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Janz.

PONTA GROSSA
2026

F156 Fagundes, Gabriela Ruva
Diferenciação macrofágica induzida por nanopartículas de fosfatidilserina/7-cetocolesterol / Gabriela Ruva Fagundes. Ponta Grossa, 2026.
74 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.
Coorientador: Prof. Dr. Felipe Janz.

1. Cultivo celular. 2. Imunoterapia. 3. Nanotecnologia farmacêutica. 4. Fosfatidilserina. 5. 7-cetocolesterol. I. Favero, Giovani Marino. II. Janz, Felipe. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

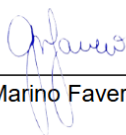
CDD: 615.19

GABRIELA RUVA FAGUNDES

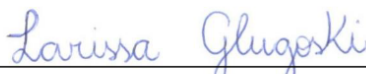
**DIFERENCIAÇÃO MACROFÁGICA INDUZIDA POR NANOPARTÍCULAS DE
FOSFATIDILSERINA/7-CETOCOLESTEROL**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de
Mestre(a) no Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, nível Mestrado e Doutorado, Associação
Ampla entre a
Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e a
Universidade do Centro-Oeste (UNICENTRO).

Ponta Grossa, 05 de fevereiro de 2026.



Prof. Dr. Giovani Marino Favero – UEPG – Presidente



Profa. Dra. Larissa Glugoski – UEPG – Membro titular interno



Prof. Dr. Michel Fleith Otuki – UFPR – Membro titular externo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF
Bloco M Sala 93 B – Campus Universitário em Uvaranas – Fone (42) 2102-8937
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 – CEP: 84030-900 – PONTA GROSSA – PR – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus, minha fonte de força, discernimento e sabedoria. A presença de Deus me ajudou a superar os momentos mais difíceis de fraqueza e insegurança, guiando-me pelo caminho certo, segundo a Sua vontade. Ele me deu um novo olhar para o meu futuro profissional e a certeza de que estou trilhando a direção correta. Sua graça e misericórdia foram fundamentais para a realização deste projeto.

Agradeço ao meu companheiro, Matheus Ribeiro, por toda a força, estímulo e por sempre me impulsionar a ser uma pessoa melhor. Mesmo nos momentos em que pensei em desistir, você esteve ao meu lado. Sempre digo, e reforço, que, se meu caminho acadêmico parece mais leve, é porque você é um dos pilares que o mantém de pé. Obrigada por sempre me encorajar a buscar excelência e superar meus limites, por ser meu porto seguro. Seu amor foi meu maior estímulo para a dedicação a este trabalho.

Aos meus pais, Ana Ruva e Miguel Fagundes, e aos meus avós, Marlene Ruva e Oscar Ruva, minha eterna gratidão. Vocês me ensinaram o valor da disciplina, do esforço e da dedicação, apoiando-me em todas as decisões que tomei. Saibam que são meu maior exemplo de vida. Se busco ser uma pessoa melhor e construir um futuro digno, é por vocês. Obrigada por serem minha motivação para seguir tentando e superar os desafios até aqui.

Agradeço também aos meus sogros, Marcos Ribeiro e Núbia Ribeiro, por serem como segundos pais nessa caminhada. Obrigada por não deixarem que eu desistisse, por me lembrarem da importância de focar no futuro, por me ajudarem a enriquecer meu conhecimento, compartilhando alegrias e tristezas e proporcionando momentos de leveza e descontração.

Ao meu orientador, professor Giovani Marino Favero, registro minha mais sincera gratidão. Obrigada pela paciência, dedicação e, sobretudo, pela confiança em mim desde a graduação. Agradeço por aceitar me orientar neste trabalho. Suas sugestões e ideias foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa. Sem sua orientação, este trabalho não teria alcançado a profundidade e a qualidade que conquistou. Obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelos desafios que superamos, por estimular minha autonomia e por me ajudar a acreditar no meu próprio potencial. Serei eternamente grata.

Ao meu coorientador, professor Felipe Janz, meu sincero agradecimento. Desde os tempos de graduação até agora no mestrado, sua parceria, comprometimento e auxílio constante foram fundamentais para que este trabalho se concretizasse. Obrigada por estar presente em cada etapa com atenção, dedicação e apoio genuíno.

Aos professores Juliana Olivato e Pedro Miranda, minha eterna gratidão pelo apoio, pelo compartilhamento de conhecimento, pela orientação generosa e, principalmente, pela paciência durante todo o processo. Suas contribuições foram fundamentais para minha formação.

À Larissa Glugoski, muito obrigada por toda a ajuda, por sua constante disposição e por estar sempre pronta a colaborar. Sem você, este trabalho não teria sido concluído da forma como foi. A sua dedicação e apoio foram verdadeiramente indispensáveis.

Ao professor Marcos Pileggi, muito obrigada por toda sabedoria compartilhada, pelas ideias enriquecedoras e por ter me incluído em seu grupo de pesquisa. Sua contribuição foi fundamental para meu crescimento acadêmico, e serei eternamente grata por todo o apoio.

Aos meus colegas, muito obrigada por todos os momentos de descontração, trocas de conhecimento e companheirismo. Vocês tornaram meus dias mais leves, felizes e cheios de risos. A presença de vocês foi essencial para que essa jornada fosse mais agradável e significativa.

Agradeço também a todos os profissionais da UEPG, em especial a Josemira, Maria Aparecida e Eli, que além de me proporcionarem momentos de muitas risadas, contribuíram diretamente para a realização deste trabalho. Ao Marcelo, juntamente com a professora Carla Kanunfre, meu agradecimento especial pela colaboração nos experimentos. Aos profissionais do Laboratório Multiusuário, minha eterna gratidão.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UEPG/UNICENTRO pela oportunidade de cursar o mestrado. À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), minha segunda casa desde 2019, da graduação à ao mestrado e posteriormente doutorado, agradeço por oferecer um ensino público de qualidade e por fazer parte da minha formação acadêmica e pessoal. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço pelo suporte financeiro por meio da bolsa de mestrado.

“A doença é o lado noturno da vida, uma cidadania mais onerosa. Quem nasce tem a dupla cidadania, uma do reino da saúde, outra do reino da enfermidade. Preferimos usar o passaporte da saúde, mas somos obrigados, ao menos por um instante, a nos identificar como cidadãos daquele outro lugar.”

Susan Sontag

RESUMO

O câncer permanece como uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo caracterizado pelo crescimento celular descontrolado que resulta na formação de um microambiente tumoral (TME) imunossupressor. Entre os elementos celulares do TME, destacam-se os macrófagos associados a tumores (TAMs), que podem apresentar perfis pró-inflamatórios (M1) ou anti-inflamatórios (M2). Estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas para reprogramar os TAMs ao fenótipo M1, favorecendo uma resposta antitumoral. O presente estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma formulação lipossomal contendo fosfatidilserina (PS) e 7-cetocolesterol (7-KC), bem como avaliar seu potencial imunomodulador na polarização macrofágica associada ao microambiente tumoral, visando sua aplicação em estratégias de imunoterapia antitumoral. Os lipossomas PS/7-KC foram obtidos por evaporação de solventes orgânicos seguida de hidratação, e sua caracterização físico-química foi realizada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), potencial zeta, diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI). Os lipossomas PS/7-KC foram obtidos por evaporação de solventes orgânicos seguida de hidratação. A caracterização por FTIR confirmou a incorporação dos compostos. O potencial zeta demonstrou estabilidade coloidal superior da formulação PS/7-KC em comparação à PS isolada após 90 dias. As partículas apresentaram tamanho médio inferior a 300 nm e índice de polidispersão inferior a 0,5. O ensaio de viabilidade celular (MTT) indicou baixa citotoxicidade nas concentrações de 50 e 93 µg/mL, com efeito citotóxico significativo apenas em 187,6 µg/mL. Esse perfil está correlacionado à expressão gênica observada. Nas concentrações de 50 e 93 µg/mL, houve redução de MCR, enquanto 187,6 µg/mL induziu aumento expressivo de IL-12, além da redução de IL-10. Os resultados sugerem que a formulação PS/7-KC apresenta potencial modulador da polarização macrofágica, favorecendo o fenótipo M1 nas suas concentrações mais elevadas, com perfil com toxicidade reduzida em concentrações intermediárias. Esses achados evidenciam seu potencial como plataforma para estratégias de imunoterapia antitumoral, embora sejam necessários outros estudos futuros, como ensaios *in vivo* e sistemas de liberação controlada para corroborar tal hipótese.

Palavras-chave: cultivo celular; imunoterapia, nanotecnologia; fosfatidilserina; 7-cetocolesterol.

ABSTRACT

Cancer remains one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide, characterized by uncontrolled cell growth and the establishment of an immunosuppressive tumor microenvironment (TME). Among the immune components within the TME, tumor-associated macrophages (TAMs) play a pivotal role by exhibiting either a pro-inflammatory (M1) or an anti-inflammatory (M2) phenotype. Therapeutic strategies have been developed to reprogram TAMs toward the M1 phenotype, thus enhancing antitumor immune responses. In this context, liposomal nanosystems containing phosphatidylserine (PS) and 7-ketocholesterol (7-KC) emerge as a promising approach. In this study, PS/7-KC liposomes were prepared using organic solvent evaporation followed by hydration. FTIR characterization confirmed the successful incorporation of both compounds. Zeta potential analysis demonstrated superior colloidal stability of the PS/7-KC formulation compared with PS alone after 90 days (-37.13 mV vs. -47.40 mV; $p = 0.0035$). The particles exhibited an average size below 300 nm and an acceptable polydispersity index (< 0.5). Cell viability assessed by the MTT assay indicated low cytotoxicity at concentrations of 50 and 93 $\mu\text{g/mL}$, with significant cytotoxic effects observed only at 187.6 $\mu\text{g/mL}$. This pattern was consistent with the gene expression profile. At 50 and 93 $\mu\text{g/mL}$, there was a reduction in MCR expression (-3.43 and -4.51 $\log_2\text{FC}$, respectively), whereas 187.6 $\mu\text{g/mL}$ induced a robust increase in iNOS ($+3.44$ $\log_2\text{FC}$; $p < 0.01$) and IL-12 ($+1.66$ $\log_2\text{FC}$), along with a decrease in IL-10 (-2.52 $\log_2\text{FC}$). These findings suggest that PS/7-KC liposomes can modulate macrophage polarization, promoting the M1 phenotype at higher concentrations while maintaining a favorable safety profile at intermediate concentrations. Overall, this nanoplatform demonstrates potential for antitumor immunotherapy strategies, warranting further in vivo studies and the development of controlled-release systems to optimize therapeutic outcomes.

Keywords: cell culture; immunotherapy; nanotechnology; phosphatidylserine; 7-ketocholesterol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Polarização de macrófagos a partir de diferentes estímulos	16
Figura 2. Papel dos TAMs no microambiente tumoral.	19
Figura 3. Regulação da assimetria de fosfatidilserina na membrana plasmática	21
Figura 4. Regulação da exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática durante a apoptose mediada por caspases	22
Figura 5. Reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas por macrófagos mediado pela exposição de fosfatidilserina	24

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Caracterização molecular de PS, 7-KC e PS/7-KC por FTIR.....	35
Gráfico 2. Viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de tratamento com a formulação lipossomal de fosfatidilserina (PS) em diferentes concentrações, avaliada por ensaio de MTT em comparação ao controle (0 ug/mL).	36
Gráfico 3. Viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de tratamento com a formulação lipossomal de fosfatidilserina/7-cetocolesterol (PS/7-KC) em diferentes concentrações, avaliada por ensaio de MTT em comparação ao controle (0 ug/mL).....	38
Gráfico 4. Viabilidade celular em 24 horas com tratamento de PS e PS/7-KC em diferentes concentrações, avaliada por ensaio de MTT em comparação ao controle (0 ug/mL).	39
Gráfico 5. Viabilidade celular em 48 horas com tratamento de PS e PS/7-KC em diferentes concentrações, avaliada por ensaio de MTT em comparação ao controle (0 ug/mL).	41
Gráfico 6 -Viabilidade celular em 72 horas com tratamento de PS e PS/7-KC em diferentes concentrações, avaliada por ensaio de MTT em comparação ao controle (0 ug/mL).	42
Gráfico 7 - Curva de Eficiência de genes IL-10, MCR e Rpl32	45
Gráfico 8. Curva de dissociação dos genes IL-10, MCR e Rpl32.....	46
Gráfico 9. Expressão do gene MCR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) em macrófagos tratados com a formulação lipossomal de fosfatidilserina/7-cetocolesterol (PS/7-KC) em diferentes concentrações, em comparação ao grupo controle (PS-50ug/mL).....	48
Gráfico 10. Expressão relativa do gene iNOS ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) em macrófagos tratados com a formulação lipossomal de fosfatidilserina/7-cetocolesterol (PS/7-KC) em diferentes concentrações, em comparação ao grupo controle (PS-50ug/mL).	49
Gráfico 11. Expressão relativa do gene IL-10 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) em macrófagos tratados com a formulação lipossomal de fosfatidilserina/7-cetocolesterol (PS/7-KC) em diferentes concentrações, em comparação ao grupo controle (PS-50ug/mL).	51
Gráfico 12. Expressão relativa do gene IL-12 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) em macrófagos tratados com a formulação lipossomal de fosfatidilserina/7-cetocolesterol (PS/7-KC) em diferentes concentrações, em comparação ao grupo controle (PS-50ug/mL).	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos primers, eficiência de amplificação e slope utilizados na RT-qPCR para os genes IL10, IL12, iNOS, Mrc1 e Rpl32.....	31
Tabela 2 - Caracterização físico-química das formulações lipossomais contendo fosfatidilserina e fosfatidilserina/7-cetocolesterol quanto ao potencial zeta, diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) nos dias 30 (30D) e 90 (90D) para as formulações de Fosfatidilserina (PS) e Fosfatidilserina e 7-Cetocolesterol (7-KC).....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 MACRÓFAGOS	14
2.2 POLARIZAÇÃO MACROFÁGICA	15
2.3 MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES	18
2.4 FOSFATIDILSERINA	20
2.5 7-CETOCOLESTEROL	24
2.6 IMUNOTERAPIA ANTITUMORAL E REPROGRAMAÇÃO MACROFÁGICA	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVOS GERAIS	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 CULTIVO CELULAR	29
4.2 LIPOSSOMA DE FOSFATIDILSERINA E 7-CETOCOLESTEROL	29
4.3 ANÁLISE DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA	29
4.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.	29
4.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE POR MTT	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 DESENVOLVIMENTO DO LIPOSSOMA DE FOSFATIDILSERINA E 7- CETOCOLESTEROL	32
5.2 ANÁLISE DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA	33
5.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.	35
5.4 TESTE DE CITOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT	36
5.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL QUANTITATIVA (RT- qPCR)	43
5.5.1 Receptor de Manose tipo C (Mcr)	46
5.5.2 Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS)	48
5.5.3 Interleucina 10 (IL-10)	50
5.5.4 Interleucina 12 (IL-12)	51
5.6 ANÁLISE GLOBAL	53
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

“O câncer é a sombra do nosso próprio código biológico, rebelde, adaptativo e persistente” (Adaptado de Imperador de todos os Males de Siddhartha mukherjee, 2012).

A primeira referência aos tumores malignos remonta ao Papiro de Edwin Smith, datado de aproximadamente 1600 a.C., no qual uma massa saliente no seio é descrita como incurável (Ades; Tryfonidis; Zardavas, 2017). Especialmente antes do século XIX as referências são raras, visto que, o câncer era raramente diagnosticado, sendo ofuscado por doenças infecciosas como tuberculose, cólera e peste. Com o avanço da expectativa de vida e das tecnologias diagnósticas, o câncer tornou-se uma das doenças mais prevalentes da civilização moderna (Nwosu, 2024; Sakai; Morimoto, 2022).

Muito além de um crescimento desordenado, o câncer pode ser compreendido como uma forma de "vida paralela", composta por células que, embora oriundas do próprio organismo, adquirem características de sobrevivência exagerada, proliferação contínua, evasão imune e adaptação metabólica e imunológica (Ji *et al.*, 2025).

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, caracterizando-se por um crescimento celular descontrolado e pela formação de um microambiente tumoral (TME) altamente complexo e orquestrado para o crescimento tumoral (Hanahan, 2022). Esse microambiente é composto por células tumorais, fibroblastos, endotélio vascular, componentes da matriz extracelular e uma diversidade de células do sistema imune, entre elas os macrófagos, que têm papel central na regulação da progressão tumoral e na resposta à terapia (Bejarano; Jordão; Joyce, 2021).

Os macrófagos associados a tumores (TAMs) representam de 30 a 50% das células imunes infiltradas em tumores sólidos e exibem notável plasticidade funcional. Essa plasticidade permite que TAMs apresentem perfis que vão desde um fenótipo pró-inflamatório e antitumoral (M1) até um fenótipo imunossupressor e pró-tumoral (M2) (Cassetta; Pollard, 2018). Diversos sinais presentes no TME, como citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β), metabólitos (lactato, colesterol oxidado) e interações com células tumorais, favorecem a polarização dos TAMs para o fenótipo M2, contribuindo para a evasão imune e a progressão da neoplasia (Huang; Song; Xu, 2020).

Nesse contexto, a reprogramação fenotípica dos TAMs para o perfil M1 tem ganhado destaque como estratégia terapêutica emergente na imunoterapia antitumoral. Diferente dos inibidores de checkpoints imunológicos, que atuam majoritariamente sobre a imunidade adaptativa, a reeducação de TAMs busca restaurar a funcionalidade da resposta inata contra o

tumor, promovendo fagocitose, liberação de citocinas inflamatórias e apresentação de antígenos. No entanto, essa abordagem ainda enfrenta desafios, como a reversibilidade do fenótipo M1 e a resistência induzida por componentes do TME.

Entre as alternativas promissoras, destaca-se o uso de nanossistemas lipossomais funcionalizados com biomoléculas capazes de modular o comportamento dos macrófagos. A fosfatidilserina (PS), por exemplo, é um fosfolípido normalmente exposto na superfície de células pré-apoptóticas, atuando como sinal de "coma-me" para os macrófagos (Čopič; Dieudonné; Lenoir, 2023). Quando incorporada a lipossomas, a PS favorece a internalização da carga terapêutica por macrófagos, entretanto por si só, a PS oferece um perfil anti-inflamatório (Chung *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Por outro lado, o 7-cetocolesterol (7-KC), um oxisterol derivado da oxidação do colesterol, apresenta propriedades imunomodulatórias relevantes, incluindo a ativação de vias inflamatórias (como *NF-κB* e inflamassoma NLRP3), geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e indução da polarização macrofágica para o fenótipo M1 (Choi; Finlay, 2020; Pereira *et al.*, 2019).

A combinação de PS e 7-KC em lipossomas representa, portanto, uma estratégia racional para induzir reprogramação macrofágica direcionada, aliando reconhecimento macrofágico à ativação inflamatória. Considerando a necessidade de alternativas mais eficazes e seguras para imunoterapia, sobretudo em tumores sólidos refratários, este trabalho propõe investigar os efeitos da formulação lipossomal de fosfatidilserina/7-cetocolesterol (PS/7-KC) sobre a polarização macrofágica, utilizando a linhagem J774 como modelo experimental.

A hipótese central é que o tratamento com PS/7-KC é capaz de induzir de forma eficaz a ativação de vias inflamatórias e a diferenciação de TAMs para um fenótipo M1 funcional, contribuindo para o desenvolvimento de novas abordagens imunoterapêuticas baseadas na reprogramação da imunidade inata.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MACRÓFAGOS

As células mieloides evoluíram como componentes centrais dos sistemas imune inato e adaptativo, caracterizando-se por sua notável diversidade funcional, capacidade migratória e ampla distribuição tecidual (Vlerken-Ysla *et al.*, 2023). Um tipo de célula mieloide são os monócitos, precursores derivados da medula óssea (MO) com capacidade de migrar para os tecidos periféricos após a maturação. No sangue circulante, constituem uma população celular funcionalmente heterogênea, distinguível por características morfológicas e pela expressão diferencial de marcadores de superfície (Vlerken-Ysla *et al.*, 2023).

Após migrarem para os tecidos, os monócitos podem se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas, dependendo dos estímulos presentes no microambiente local (Wang *et al.*, 2025). Os macrófagos, especificamente, constituem uma população altamente especializada e adaptada a diferentes órgãos, como as células de Kupffer no fígado, a micróglia no sistema nervoso central, os macrófagos alveolares nos pulmões e os osteoclastos no tecido ósseo (Guan *et al.*, 2025).

Os macrófagos exercem atividades centrais na manutenção da homeostase e defesa do hospedeiro devido a potente atividade fagocítica, permitindo a remoção de patógenos, células apoptóticas e debris celulares (Chen *et al.*, 2023). Entretanto, sua atividade vai muito além disso, pois funcionam como células apresentadoras de antígenos (APCs), expressando moléculas ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC classe II) e coestimuladoras como CD80 e CD86, essenciais para a ativação de linfócitos T e a orquestração da resposta imune adaptativa (Wang *et al.*, 2025).

Os macrófagos residentes em tecidos (RTMs) participam de diversos processos fisiológicos, como neurogênese, angiogênese, osteogênese e até mesmo eritropoiese. Essa ampla atuação evidencia sua capacidade única de adaptação e contribuição específica ao microambiente tecidual. Tal versatilidade decorre de sua elevada plasticidade, que permite ajustar sua resposta funcional de acordo com os sinais locais, ao mesmo tempo em que preserva a capacidade de realizar fagocitose de forma eficiente (Cohen *et al.*, 2018)

De modo geral, praticamente todos os tecidos do organismo são densamente povoados por macrófagos, os quais desempenham funções essenciais na manutenção da homeostase tecidual. Essa atuação ocorre por meio da detecção e remoção de células estromais e epiteliais danificadas ou disfuncionais, através do reconhecimento mediado por receptores específicos

(Roberts *et al.*, 2017). Em situações de lesão tecidual, os macrófagos podem expandir seus pseudópodes para envolver dendritos pró-inflamatórios, removendo-os antes que sejam fagocitados por neutrófilos circulantes, o que poderia resultar em uma resposta inflamatória exacerbada e potencialmente prejudicial ao tecido (Uderhardt *et al.*, 2019).

Algumas citocinas, como IL-6, IL-8, IL-33 e TSLP, promovem a mielopoiese e favorecem o recrutamento de monócitos (Dagher *et al.*, 2020). Determinados metabólitos lipídicos, como os oxisteróis, atuam como quimioatraentes, recrutando monócitos via o receptor GPR183 em contextos patológicos como aterosclerose, câncer e doenças neurodegenerativas. Esse recrutamento ocorre por meio de loops autócrinos mediados pela enzima CH25H e pela mobilização de cálcio intracelular (Griffiths *et al.*, 2021). Por outro lado, os macrófagos também desempenham funções opostas no desenvolvimento e resolução de processos patológicos. Sua ativação desregulada ou polarização inadequada está associada à patogênese de doenças infecciosas crônicas, câncer e distúrbios autoimunes (Chen *et al.*, 2022).

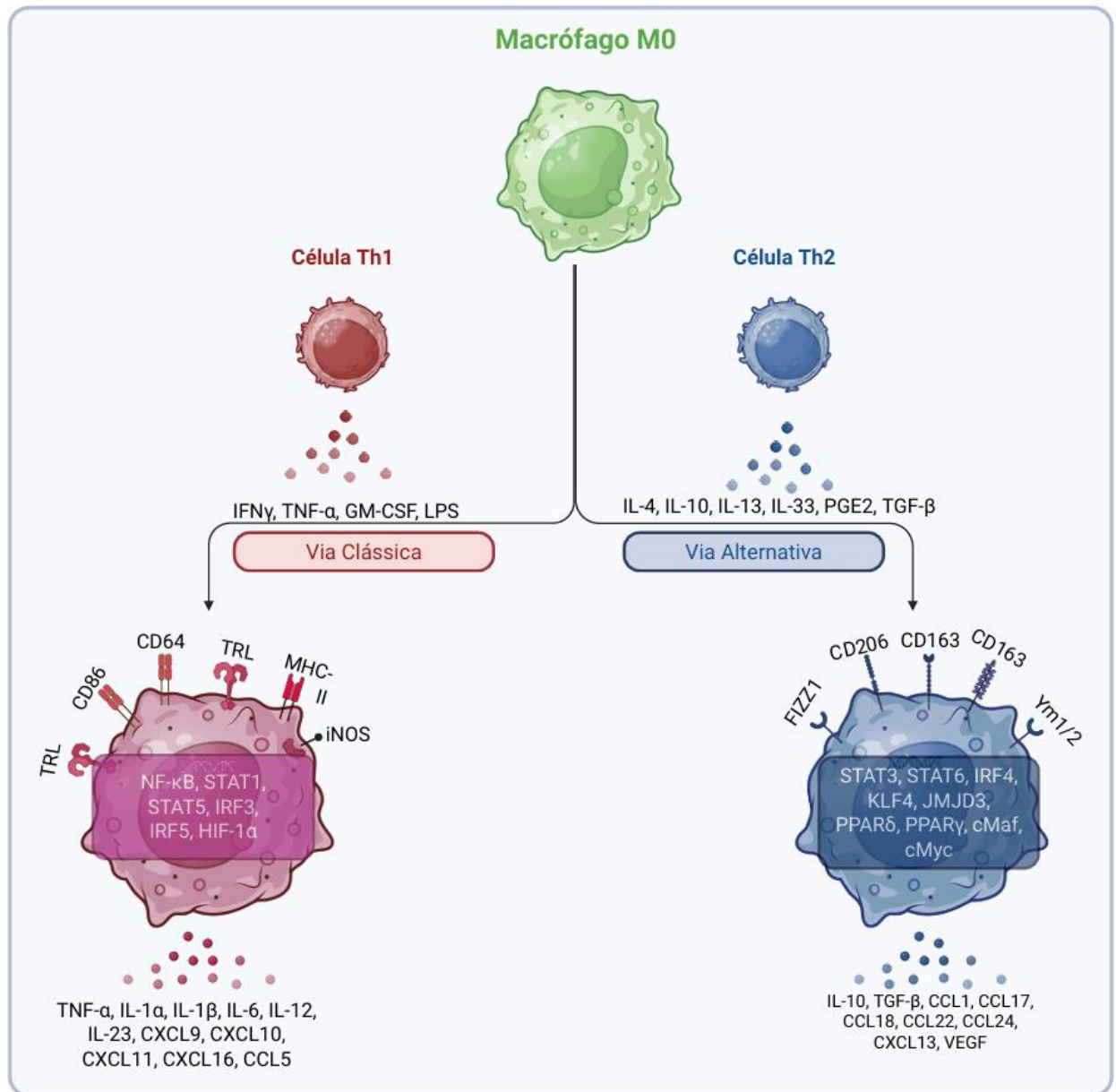
Esse recrutamento de monócitos para substituir macrófagos residentes perdidos em situações de dano tecidual leva à diferenciação de novas populações macrofágicas, cuja função será amplamente determinada pelos sinais moleculares presentes no microambiente local (Wang *et al.*, 2025).

2.2 POLARIZAÇÃO MACROFÁGICA

A polarização macrofágica representa o estado funcional de ativação do macrófago em um determinado ponto no tempo. No entanto, devido à sua elevada plasticidade, esse estado não é fixo e pode ser modificado em resposta à integração de múltiplos sinais provenientes de outras células, do tecido circundante e de estímulos exógenos (Basak *et al.*, 2023).

A polarização dos macrófagos (Figura 1) baseia-se unicamente na alteração fenotípica devido ao estímulo do microambiente orquestrado (Mohd Yasin *et al.*, 2022). Devido serem células versáteis do sistema imunológico, os macrófagos podem ser ativados por duas vias distintas: a via clássica e a via alternativa, originando populações macrofágicas funcionalmente e fenotipicamente divergentes classificadas em macrófagos M1 e M2, respectivamente. Essa capacidade de adaptação é essencial para o funcionamento do sistema imunológico, exigindo um equilíbrio entre os diferentes estados de polarização (Xu *et al.*, 2022).

Figura 1. Polarização de macrófagos a partir de diferentes estímulos



Fonte: A autora. Imagem criada com BioRender.com.

A identificação dos diferentes fenótipos de macrófagos pode ser realizada por meio da análise de marcadores de superfície e moléculas solúveis associadas à sua ativação. Os macrófagos M1, de perfil pró-inflamatório, são tipicamente caracterizados pela expressão de CD86, CD64, o receptor de macrófagos com estrutura colágena, além da produção de quimiocinas da família CXC, como CXCL9, CXCL10 e CXCL11. Também expressam enzimas e reguladores inflamatórios como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e SOCS1 (Boutillier; Elswa, 2021; Wang *et al.*, 2019). Por outro lado, os macrófagos M2, de perfil anti-inflamatório

e reparador, expressam marcadores, como CD206 (receptor de manose) e CD163 (receptor da haptoglobina-hemoglobina), além de produzirem moléculas imunorreguladoras como TGF- β , PPAR γ , CCL14, CCL22 e arginase-1 (ARG-1) (Boutillier; El Sawwa, 2021; Rószler, 2015).

Dessa forma, a polarização extrínseca configura-se como um dos principais mecanismos de distinção fenotípica dos macrófagos, sendo mediada predominantemente por sinais externos, como citocinas e interações com outras células do sistema imune. Dentre essas, destacam-se as células T CD4⁺ dos subtipos Th1 e Th2, que desempenham papéis fundamentais na indução dos fenótipos M1 e M2, respectivamente (Cui *et al.*, 2024).

A polarização para fenótipo M1, ou pela via de ativação clássica, é induzida por estímulos como LPS e citocinas do tipo Th1, notadamente o IFN- γ e TNF- α (Chen *et al.*, 2023). A ativação da via clássica desencadeia a sinalização de fatores de transcrição como NF- κ B, AP-1 e STAT1, os quais promovem a transcrição de genes associados a um perfil pró-inflamatório, incluindo iNOS, IL-6, IL-12, TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-23 e CXCL10, essa resposta é crucial para o combate de infecções de células tumorais (Hirayama; Iida; Nakase, 2017).

A iNOS, em particular, catalisa a produção de óxido nítrico (NO), um mediador de atividade antimicrobiana e antitumoral. Esses mediadores conferem aos macrófagos M1 uma robusta capacidade de promover inflamação, destruir patógenos e modular a atividade de outras células imunocompetentes (Yan *et al.*, 2024). Essas citocinas desempenham um papel importante na amplificação da resposta imune, na inflamação e na ativação de outras células do sistema imunológico, caracterizando sua resposta pró-inflamatória (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018).

Em contraposição, os macrófagos M2 são derivados da ativação alternativa, geralmente induzida por citocinas como IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β , PGE2 ou corticosteroides (Strizova *et al.*, 2023). A polarização para M2 é impulsionada pelas células Th2 através da secreção de IL-4 e IL-13. Esse eixo IL-4/IL-13 atua por meio do receptor IL-4R α , ativando o fator de transcrição STAT6, que, por sua vez, induz a expressão de genes como o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ) (Bouhlef *et al.*, 2007). O PPAR γ atua como regulador do metabolismo lipídico e reforça o fenótipo M2, promovendo funções como supressão de respostas inflamatórias, remodelamento da matriz extracelular e promoção de angiogênese (Engelen *et al.*, 2022).

Além disso, o aumento da concentração de IL-4 e IL-13 modula a produção de NO através da depleção de arginina. Isso ocorre por meio da indução de arginase-1 (ARG-1), uma enzima que compete com a iNOS pelo uso da arginina (Martí i Líndez; Reith, 2021). Como

resultado, há inibição da produção de NO e consequente supressão da polarização M1, redirecionando o perfil funcional para M2 (Murray, 2017). Essa regulação representa um mecanismo-chave da reprogramação funcional dos macrófagos em ambientes não inflamatórios ou tolerogênicos, como tecidos tumorais.

Portanto, a ativação de transcritores como STAT6, STAT3, PPAR γ , IRF4 e KLF4, os quais promovem a expressão de mediadores anti-inflamatórios e imunorreguladores (Orecchioni *et al.*, 2019) ativa a polarização para macrófagos M2 que expressam níveis elevados de IL-10, IL-1Ra, CCL17, CCL22 e TGF- β , além de marcadores como CD163 e CD206. Esses mediadores desempenham funções críticas na resolução da inflamação, reparo tecidual, imunossupressão e modulação da resposta adaptativa (Bento *et al.*, 2025).

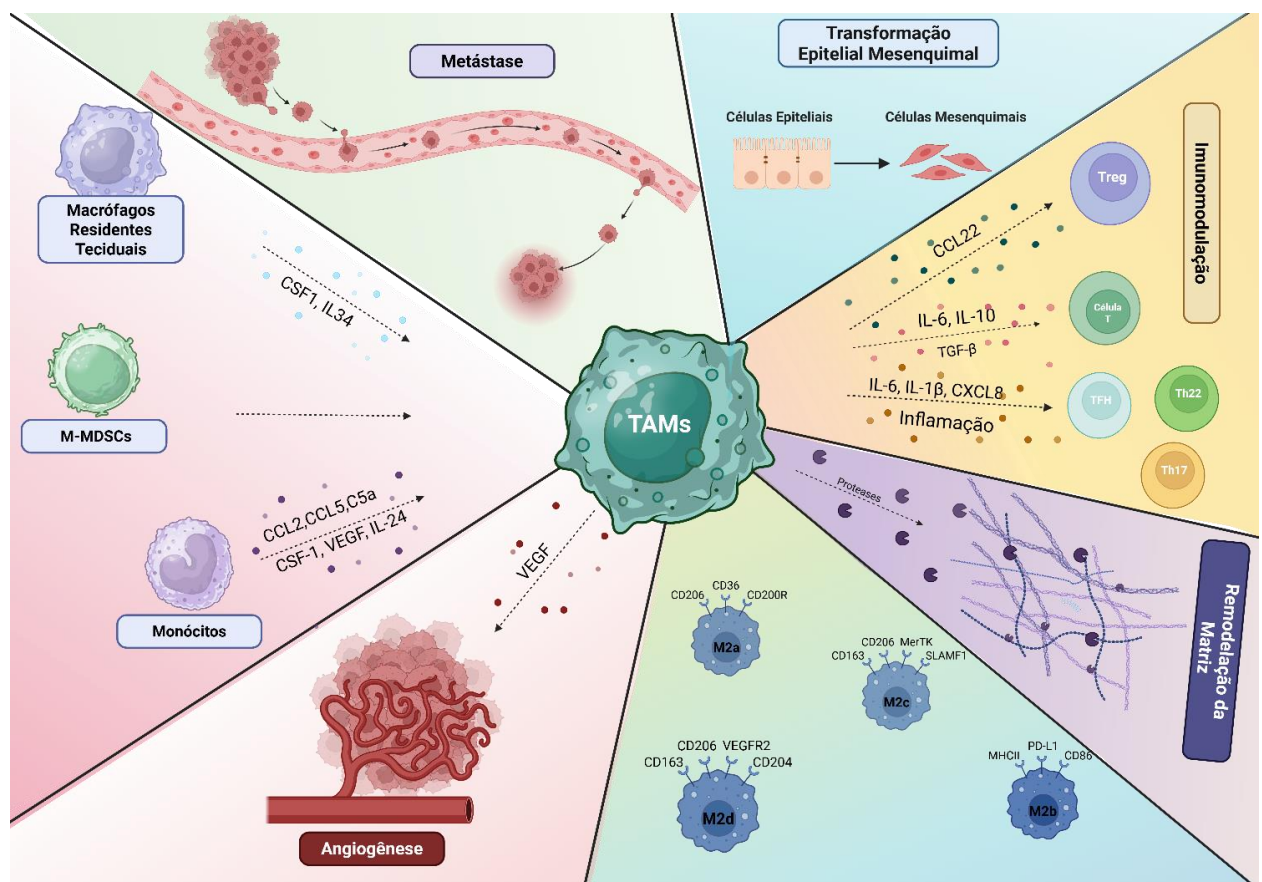
Em tecidos infectados os macrófagos são inicialmente polarizados para M1, ou seja, com carácter inflamatório, auxiliando na remoção do patógeno. Posteriormente os macrófagos sofrem polarização para o fenótipo M2 para remodelação tecidual, favorecendo a regulação imunológica e a homeostase do organismo (Yunna *et al.*, 2020). Embora a polarização macrofágica seja frequentemente discutida com base na classificação clássica M1/M2, é importante reconhecer que os macrófagos apresentam capacidade de remodelar seu fenótipo em resposta às condições do microambiente. Por exemplo, um macrófago polarizado para M1 pode voltar para o fenótipo M2, e vice-versa, dependendo de fatores como a presença ou ausência de inflamação, lesão tecidual, hipóxia, fatores de crescimento e o perfil de citocinas secretadas localmente. Dessa forma, a polarização macrofágica constitui um espectro que não se limita na classificação tradicional (Boutillier; Elswa, 2021).

2.3 MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES

Os macrófagos associados a tumores (TAMs) (Figura 2) constituem uma das populações mais abundantes e funcionalmente relevantes no microambiente tumoral (TME), podendo representar 50% das células hematopoiéticas infiltradas em tumores sólidos (Robinson *et al.*, 2021). Esse tipo de macrófago possui dupla ação, a depender do contexto molecular, estágio da doença e sinais recebidos do TME. Os TAMs do tipo M1 exibem atividade citotóxica promovendo imunidade antitumoral e destruição de células neoplásicas, em contrapartida, TAMs do tipo M2 favorecem a progressão tumoral, angiogênese, remodelamento tecidual e evasão imunológica (Pan *et al.*, 2020). A plasticidade dos TAMs é um determinante para o curso da neoplasia e consequentemente uma via promissora para intervenção terapêutica que visem reeducar ou redirecionar sua polarização (Khan *et al.*, 2023; Lee; Rojas; Gommerman, 2021)

Os TAMs com carácter M1 retêm propriedades de células APC, incluindo alta expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHCII), atividade fagocítica e secreção de citocinas pró inflamatórias como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-12 (Anand; Peh; Kolesar, 2023). Essa polarização é associada a atividade antitumoral, favorecendo a destruição de células neoplásicas e promove a ativação de linfócitos T citotóxicos e outras células imunes, o que reforça um ambiente contra o tumor (Mantovani *et al.*, 2021).

Figura 2. Papel dos TAMs no microambiente tumoral.



Fonte: A autora. Imagem criada com BioRender.com.

Por outro lado, TAMs com caráter M2 estão correlacionados a um perfil imunossupressor no TME. Esses TAMs apresentam baixa expressão de MHCII e expressão de receptores inibitórios como PD-1, PD-L1, VISTA, B7-H4 e Tim3, que contribuem para a inibição da resposta antitumoral (Dixon *et al.*, 2021; Gordon *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018). Além disso, os TAMs com fenótipo M2 promovem a tolerância imunológica, angiogênese, remodelamento da matriz extracelular e evasão vigilância imunológica, facilitando a progressão tumoral (Dougan; Dranoff; Dougan, 2019). A presença predominante desse subtipo de macrófago está associada a um pior prognóstico em diversos tipos de câncer.

Sinais do TME, incluindo citocinas, fatores de crescimento, metabólitos tumorais e moléculas derivadas da matriz extracelular tem papel central na reprogramação funcional dos TAMs, promovendo um fenótipo pró-tumoral (Veglia; Sanseviero; Gabrilovich, 2021). Macrófagos M2 possuem circuitos transcricionais que reforçam a imunossupressão no TME. Como é o caso do fator de transcrição YY1 induzido via IL-4/STAT6 promovem liberação de IL-6 sustentada por TAMs resultando em maior infiltração de M2 e supressão da atividade citotóxica pelos linfócitos T CD8⁺ (Chen *et al.*, 2023).

A inflamação persistente no TME pode contribuir para o crescimento do tumor e os TAMs são agentes centrais nesse processo. Indica-se que os TAMs modulam a resposta imune ao promover um subconjunto de células T auxiliares, como as células T foliculares (TFH)(Jin *et al.*, 2025). A ativação de TLR4 desencadeia um eixo inflamatório para indução de células TFH produtoras de IL-21 que operam por vias dependentes de IL-21 e IFN- γ . Essa sinalização estimula a proliferação de plasmócitos favorecendo a progressão tumoral quanto a polarização de macrófagos para o fenótipo M2 com atividade imunossupressora (Chen *et al.*, 2016).

Nos tumores sólidos, tanto os macrófagos residentes quanto os derivados de monócitos (MDMs) estão presentes, embora desempenhem funções distintas, que variam conforme o estágio e a localização da lesão (Park *et al.*, 2022). Em neoplasias como os cânceres de pulmão e pâncreas, os macrófagos residentes parecem contribuir para a progressão tumoral nas fases iniciais. À medida que o processo inflamatório se desenvolve, essas populações são progressivamente substituídas por macrófagos derivados de monócitos (Baer *et al.*, 2022).

2.4 FOSFATIDILSERINA

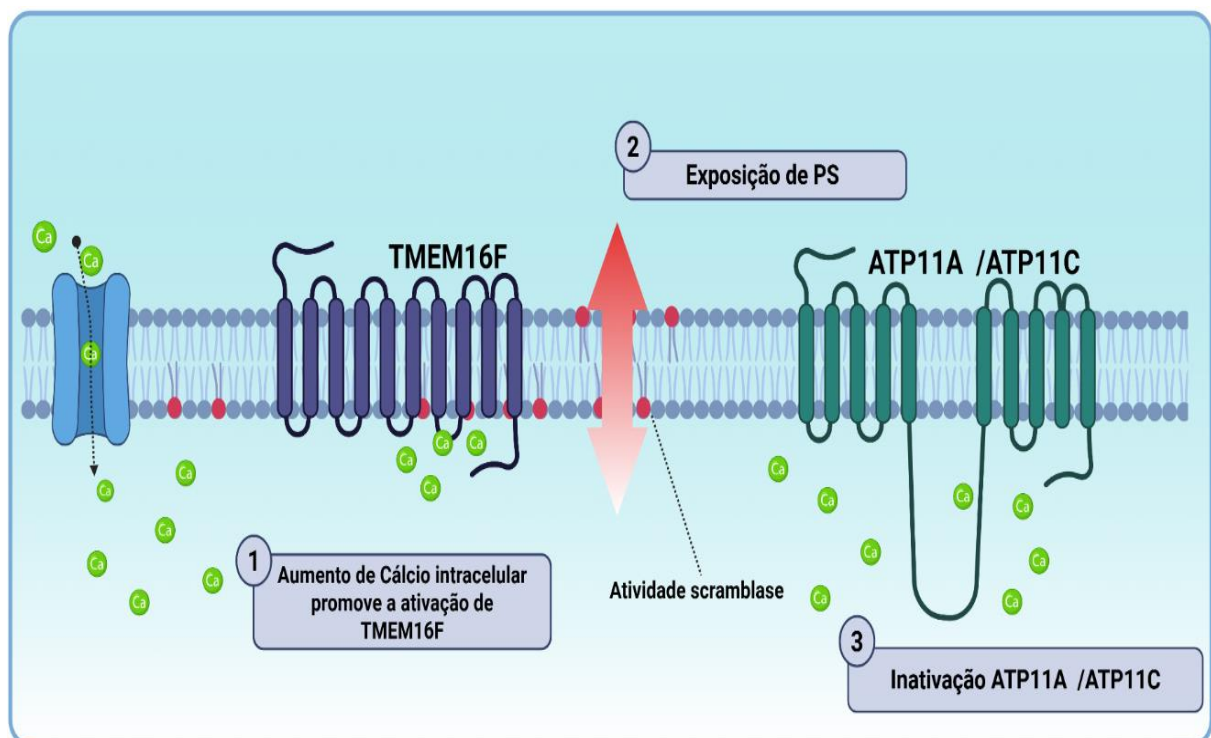
A fosfatidilserina (PS) é um fosfolipídio de carga negativa e exerce funções estruturais, na transdução de sinais, orientação da translocação proteica, ativação de enzimas e eliminação de organelas celulares (Xiao; Chang, 2023).

O transporte de PS entre os folhetos da membrana plasmática é regulado por enzimas especializadas, destacando-se as flippases e scramblases. Essas proteínas, caracterizadas pelo domínio de reconhecimento de lipídios (ORD), promovem a troca de PS por fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P) (Chung *et al.*, 2015; Moser von Filseck *et al.*, 2015). O PI4P é continuamente sintetizado na membrana plasmática e convertido de volta em fosfatidilinositol no RE, mantendo um ciclo funcional que viabiliza o transporte direcional da PS contra seu gradiente de concentração.

A *flippase* pertence à família das ATPases tipo IV (P4-ATPases), como ATP11A (adenosina trifosfatase tipo 11A) e ATP11C (adenosina trifosfatase tipo 11C), e realiza a translocação da PS do folheto externo para o folheto citosólico da membrana plasmática, processo dependente da proteína auxiliar transmembrana TMEM30A (Andersen *et al.*, 2016). Em contraposição, as scramblases, como TMEM16F e XKr8 (*XK-related protein 8*), atuam de forma bidirecional e não dependente de ATP, promovendo a redistribuição da PS entre os folhetos interno e externo da bicamada lipídica, particularmente em contextos de ativação celular ou apoptose (Segawa; Nagata, 2015).

O transporte intramembranar é modulável e sensível ao cálcio intracelular (Figura 3). Durante a despolarização da membrana celular, o aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico ativa a scramblase TMEM16F, a qual promove a exposição da PS na face externa da membrana, inativando simultaneamente a *flippase* ATP11A/C (Suzuki *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2020). Com retorno à polarização, ou seja, restauração do potencial de membrana e homeostase de cálcio a TMEM16F é inativada, permitindo a reativação de ATP11C e, consequentemente, restauração da assimetria lipídica (Čopič; Dieudonné; Lenoir, 2023; Shao *et al.*, 2015).

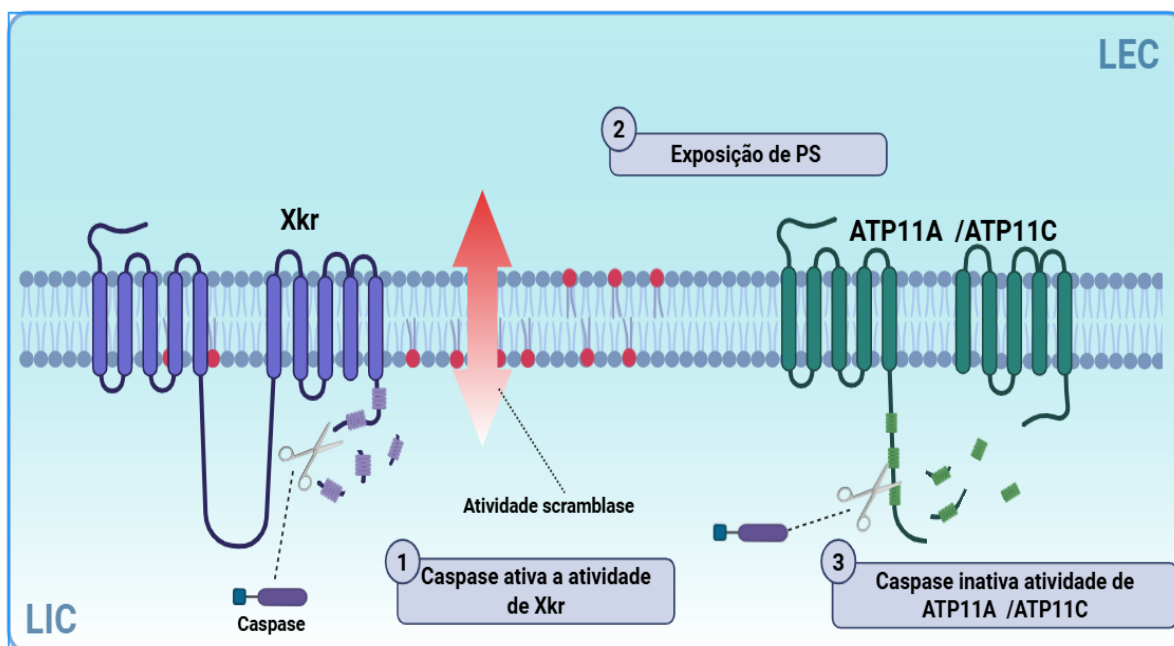
Figura 3. Regulação da assimetria de fosfatidilserina na membrana plasmática



Fonte: A autora. Imagem criada com BioRender.com.

Em paralelo, as proteínas da família Xkr como a Xkr4, Xkr8 e Xkr9, promovem exposição sustentada de PS em apoptose (Figura 4). Essas proteínas são clivadas por caspases na extremidade C-terminal sendo então ativadas. A Xkr8 interage com a proteína transmembrana tipo I basigin, enquanto a Xkr9 não possui a mesma interação (Straub *et al.*, 2021; Suzuki *et al.*, 2013). As Xkr possuem uma estrutura com uma via hidrofílica interna e sítios de clivagem conservados para caspase-3/6/7 conforme revelado por (Straub *et al.*, 2021). Já a Xkr4 necessita de fragmentos de proteína nuclear derivados de XRCC4, ativados por caspase para iniciar sua função scramblase (Maruoka *et al.*, 2021). As caspases também podem atuar no bloqueio das flippases como a ATP11C via clivagem proteolítica, o que intensifica a exposição de PS durante a apoptose (Shlomovitz; Speir; Gerlic, 2019)

Figura 4. Regulação da exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática durante a apoptose mediada por caspases



Fonte: A autora. Imagem criada com BioRender.com.

De ponto de vista funcional endógeno, como a PS está localizada dentro das células ela serve para o recrutamento e ativação de vias de sinalização, incluindo a família PKC, fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K)/AKT e Ras/RafPor exemplo, os membros da família da proteína quinase C (PKC) ligam-se à PS através dos seus domínios C2, enquanto a proteína 6

específica para paragem do crescimento (Gas6) liga-se à PS através do domínio do ácido gama-carboxiglutâmico (Ma *et al.*, 2022a).

Entretanto, a exposição de PS na face externa da membrana plasmática tem sido amplamente associada à ativação de vias apoptóticas, tanto intrínsecas quanto extrínsecas (Ma *et al.*, 2022b). A via intrínseca de apoptose é desencadeada por sinais de estresse mitocondrial, que culmina na liberação do citocromo c para o citosol. Esse evento promove a formação do apoptossomo, ativando o fator apoptótico associado à protease-1 (Apaf-1) e iniciando a cascata de caspases, notadamente a caspase-9, seguida pela ativação das caspases efetoras 3 e 7, conduzindo à morte celular programada (Kashyap; Garg; Goel, 2021). Por outro lado, a via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores de morte celular, como o receptor do fator de necrose tumoral tipo 1 (*TNFR1*), o receptor Fas (CD95) e os receptores para o ligante TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (Lossi, 2022). A interação desses receptores com seus respectivos ligantes leva à ativação da caspase-8, a qual, por sua vez, promove a clivagem e ativação das caspases 3 e 7. Essas caspases efetoras são determinantes para a execução do processo apoptótico, incluindo a exposição da PS como marcador da morte celular iminente (Boada-Romero *et al.*, 2020).

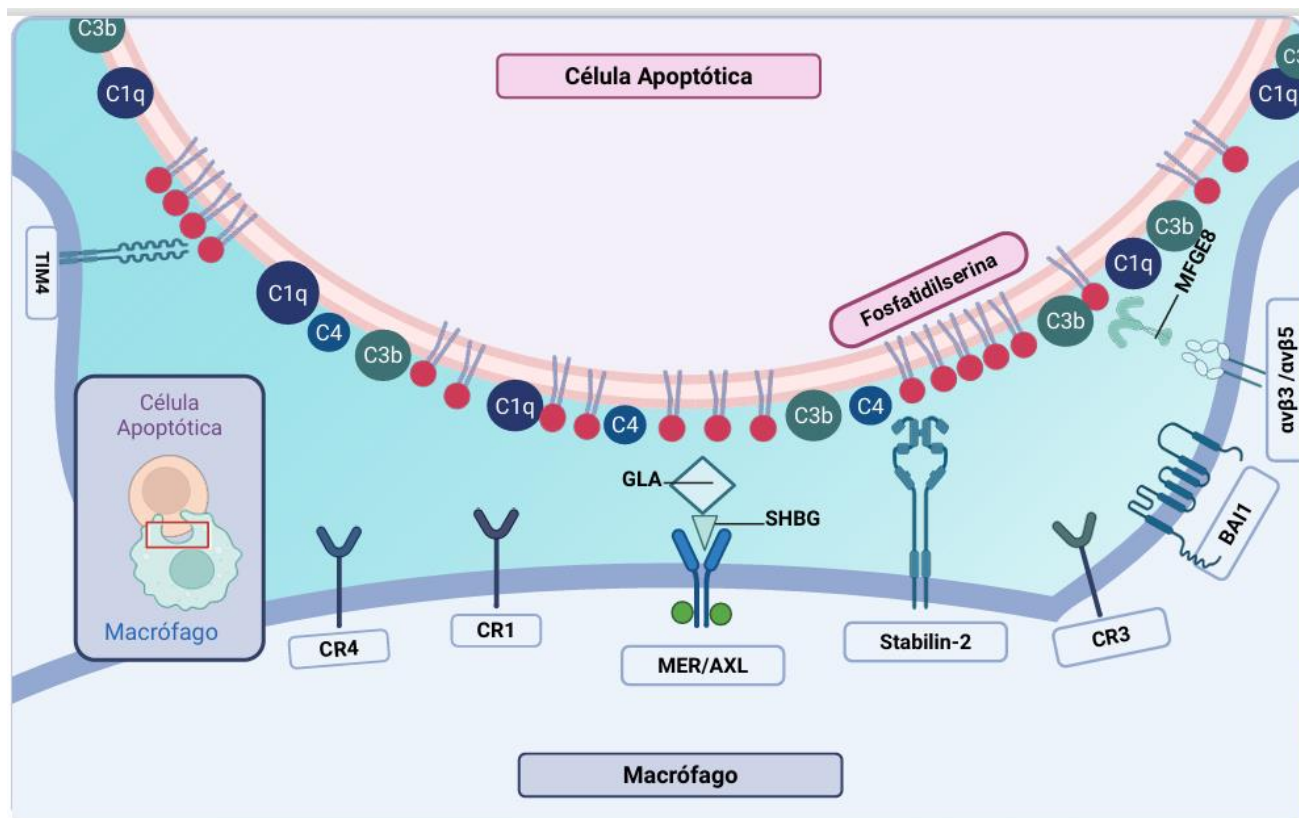
Durante o processo apoptótico, as caspases inativam as enzimas ATP11C e ATP11A, e ativam as scramblases da família Xkr, promovendo a translocação irreversível da PS para o folheto externo da membrana, resultando em sua exposição sustentada na superfície celular (Lossi, 2022). Essa exposição é vista como um sinal de “coma me” sendo altamente reconhecido pelos macrófagos através dos receptores de PS (Morioka; Maueröder; Ravichandran, 2019)

O reconhecimento macrofágico ocorre através de proteínas como TIM4, BAI1 e Stabilin-2 que se ligam à PS (Figura 5). A ligação pode ser mediada por opsoninas como MFGE8, que conecta diretamente a PS às integrinas $\alpha\beta3$ ou $\alpha\beta5$, ou pelas proteínas GAS6 e PROS1 que ligam-se a receptores tirosina-quinase da família TAM (MER e AXL) pelos domínios GLA e SHBG (Mehrotra; Ravichandran, 2022). Juntamente a esse sistema, as proteínas do sistema complemento (C1q, C3b e C4) podem depositar-se sobre a célula apoptótica permitindo o reconhecimento pelos receptores CR1, CR3 e CR4 macrofágicos (Lemke, 2019).

Algumas moléculas supressoras podem funcionar como sinal “não me coma”, como por exemplo a expressão excessiva de CD47 em células tumorais e SIRP α em células macrófagos que inibem a fagocitose e evasão tumoral. Entretanto, essa característica pode ser utilizada para

direcionamento de novas estratégias como bloqueio do eixo CD47–SIRP α , promovendo a fagocitose e tolerância de TAMs (Zheng *et al.*, 2023).

Figura 5. Reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas por macrófagos mediado pela exposição de fosfatidilserina



Fonte: A autora. Imagem criada com BioRender.com.

Nesse cenário, o uso de lipossomas contendo PS exógena tem sido proposto como uma abordagem mimética da apoptose (Ramos *et al.*, 2007). A exposição artificial de PS na superfície desses lipossomas permite fácil detecção pelos receptores dos fagócitos facilitando a internalização pelos macrófagos. Esse sistema pode desencadear vias de sinalização anti e pró inflamatórias contribuindo para modulação imune desejada (Harel-Adar *et al.*, 2011; Ma; Wu; Nakanishi, 2011).

2.5 7-CETOCOLESTEROL

O colesterol é um lipídio esteroide amplamente distribuído nos tecidos do organismo, sendo componente essencial da membrana plasmática, precursor de ácidos biliares e envolvido na síntese de hormônios esteroides. A maior parte do colesterol corporal é obtida por meio de

síntese endógena a partir da acetil-CoA, catalisada pela HMG-CoA redutase. Uma fração menor é proveniente da dieta (Liu *et al.*, 2022).

Quimicamente, o colesterol, tanto endógeno como exógeno, apresenta suscetibilidade à oxidação. Esse processo se deve à presença de uma dupla ligação entre os carbonos C5 e C6 e de um grupo hidroxila na posição C3 do anel esteróide, que contribui para sua reatividade a agentes oxidantes (Münch *et al.*, 2021).

A oxidação do colesterol é resultado da presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), com ataque preferencial ao carbono C7, resultando na formação de radicais peroxila (ROO-) (Martemucci *et al.*, 2022). Esses radicais reagem com átomos de hidrogênio, formando hidroperóxidos de colesterol, especialmente os isômeros 7 α -hidroperóxi-colesterol (7 α -OOHC) e 7 β -hidroperóxi-colesterol (7 β -OOHC) (Testa *et al.*, 2018). Entretanto, devido a instabilidade da ligação peróxido, esses intermediários são convertidos em produtos secundários mais estáveis, como o 7-cetocolesterol (7-KC), e pequenas quantidades de 7 α -hidroxicolesterol e 7 β -hidroxicolesterol (Guillemot-Legris; Muccioli, 2022).

O 7-KC é um dos esteróis mais prevalentes em lesões ateroscleróticas humanas, sendo amplamente reconhecido como marcador de estresse oxidativo lipídico e disfunção endotelial (Ravi *et al.*, 2021). O 7-KC é conhecido por sua citotoxicidade e por sua capacidade de inibir a proliferação celular. Fisiologicamente, atua como um regulador endógeno da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), além de exercer outras funções metabólicas (Ghzaiel *et al.*, 2021).

Os efeitos *in vitro* do 7-KC incluem inibição da liberação de colesterol celular, redução da permeabilidade à glicose, interrupção do fluxo intracelular de cálcio (Ca²⁺), alterações na integridade da barreira endotelial, inibição da expressão do receptor de LDL (LDLr), redução na produção de NO, indução de morte celular por citotoxicidade, apoptose, necrose e autofagia (Deng *et al.*, 2023).

O 7-KC induz o aumento da expressão das moléculas de adesão E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, via ativação de p38 MAPK e ATF-2, promovendo a ligação de leucócitos em células endoteliais THP-1 sobre HUVECs, intensificando a resposta inflamatória (Tani *et al.*, 2018). Além disso, a exposição ao 7-KC induz a polarização macrofágica para M1, caracterizado pelo aumento de iNOS, uma enzima chave na resposta imune mediada por macrofagos ativados. Essa reprogramação inflamatória favorece um microambiente mais citotóxico (Calle *et al.*, 2019).

2.6 IMUNOTERAPIA ANTITUMORAL E REPROGRAMAÇÃO MACROFÁGICA

As células imunológicas inatas reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e dano (DAMPs) por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como TLRs e NLRs (Li; Wu, 2021). Esses mecanismos não dependem somente de antígenos específicos e podem ser ativados inclusive em contextos de inflamação estéril, como ocorre em tumores sólidos (Lin; Shen; Liang, 2023).

Quando ativados, por DAMPs ou PAMPs, os PRRs induzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como *IL-6*, *IL-1 β* e *TNF- α* . Essas citocinas contribuem para a ativação de células apresentadoras de antígenos e favorecem a geração de epítomos antigênicos, os quais, por sua vez, estimulam a resposta imune adaptativa, promovendo uma resposta específica ao antígeno após o reconhecimento (Ochando *et al.*, 2023). Entretanto, a imunidade inata frequentemente é suprimida no TME, o qual é enriquecido com fatores imunossupressores como *IL-10*, *TGF- β* e lactato (Vitale *et al.*, 2019).

O uso do sistema imunológico contra o crescimento tumoral, por meio da imunoterapia antitumoral, representa uma nova alternativa para o tratamento, entretanto existem fatores que implicam diretamente na sua aplicação como por exemplo baixa taxa de resposta e eventos adversos incluindo neurotoxicidade, liberação excessiva de citocinas e disfunção orgânica (Guo *et al.*, 2024).

Entre os componentes do TME, os TAMs representam aproximadamente 50% do infiltrado imune, e desempenham papel diretamente na progressão ou regressão tumoral (Cassetta; Pollard, 2018; Chen *et al.*, 2023). Apesar de serem células imunocompetentes, os TAMs são influenciados por sinais do TME que os reprogramam para um fenótipo M2-like, ou seja, com caráter pró-tumoral e imunossupressor, com capacidade de atrair células Tregs, contribuindo para evasão imunológica (Feng *et al.*, 2019). Além disso, os tumores frequentemente expressam CD47 na superfície celular que atua como sinal de “não me coma” ao interagir com receptor SIRP α macrofágico inibindo a sinalização fagocítica (Jiang *et al.*, 2024).

Dentro desse contexto, a plasticidade macrofágica representa um desafio, visto que, a polarização é facilitada sob influência de citocinas anti e inflamatórias presentes no TME. Algumas estratégias surgem para modular esse efeito, como o caso do desenvolvimento do sistema lipossomal ARMFUL (*Anti-phagocytosis-blocking Repolarization-resistant Membrane-Fusogenic Liposome*) que visa a polarização voltada para fenótipo M1, mesmo diante a estímulos que influenciam o fenótipo M2. Os autores demonstram a incorporação de

inibidores da via JAK1/STAT6 no núcleo lipossomal para bloquear a atividade pró-M2, favorecendo uma resistência à polarização anti-inflamatória (Zheng *et al.*, 2023) .

Outras abordagem envolvem o uso de nanovesículas híbridas que combinam EVs de macrófagos M1 com lipossomas, os quais vêm surgindo como plataforma versátil para ‘*triple immunotherapy*’ (fotodinâmica, ferroptose e ativação cGAS-STING), obtendo remissão tumoral robusta em modelos 4T1 (Guo *et al.*, 2024). Esse sistema confirma potencial para reprogramação de TAMs e reforça a relevância de moduladores lipídicos devido sua capacidade de adaptação corporal e facilidade de modificação.

Intervenções direcionadas ao nível epigenético também têm mostrado eficácia. Por exemplo, o silenciamento de YY1 em TAMs M2, por meio de lipossomas carregados com siRNA anti-YY1, foi capaz de reduzir a metástase e bloquear o eixo PD-1/PD-L1, restaurando a resposta imune citotóxica (Chen *et al.*, 2023). Paralelamente estudos demonstram que o tratamento com nanopartículas funcionalizadas com anticorpos anti-CD47 promove a fagocitose tumoral, além de melhorar a eficácia de inibidores de checkpoint imunológicos (Luo *et al.*, 2023)

Nesse cenário, o uso de lipossomas compostos por fosfatidilserina e 7-cetocolesterol (PS/7-KC) desponta como uma alternativa promissora. A PS mimetiza o sinal de apoptose, sendo prontamente reconhecida por receptores fagocíticos em macrófagos, enquanto o 7-KC atua como modulador da polarização para o fenótipo M1, promovendo liberação de ROS, ativação de caspases e sinalização inflamatória. Essa combinação oferece um modelo simplificado e escalonável para a reprogramação imunometabólica de TAMs, com grande potencial translacional.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e caracterizar uma formulação lipossomal contendo fosfatidilserina e 7-cetocolesterol, avaliando seu potencial imunomodulador na polarização macrofágica associada ao microambiente tumoral, com vistas à aplicação em estratégias de imunoterapia antitumoral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma formulação lipossomal contendo fosfatidilserina e 7-cetocolesterol;
- Caracterizar físico-quimicamente o sistema lipossomal obtido, avaliando tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, visando assegurar estabilidade coloidal e adequação para aplicações biológicas.
- Avaliar a citotoxicidade da formulação em diferentes concentrações por meio do ensaio de viabilidade celular (MTT), determinando seu perfil de citotoxicidade e a existência de uma janela terapêutica adequada para estudos *in vitro*.
- Investigar o efeito da formulação na modulação da polarização macrofágica, por meio da análise da expressão gênica de marcadores associados aos fenótipos M1 e M2 em diferentes concentrações.
- Correlacionar os efeitos dose-dependentes da formulação com alterações no perfil inflamatório e imunológico dos macrófagos, identificando condições favoráveis à indução de um fenótipo pró-inflamatório e antitumoral.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

A linhagem de macrófagos murinos J774 foi cultivada em meio cultura RPMI 1640, suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e complementado com antibióticos a 1% (v/v) de penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 ug/mL. Foram acondicionadas em garrafas estéreis de cultivo celular de 125 cm² e foram mantidas em estufa a 37°C com uma atmosfera de dióxido de carbono (CO₂) à 5%.

4.2 LIPOSSOMA DE FOSFATIDILSERINA E 7-CETOCOLESTEROL

O lipossoma foi preparado a partir da pesagem de 90mg de fosfatidilserina e 5mg de 7-cetocolesterol. Os lipídeos foram fluidificados em solução de concentração 9:1 de clorofórmio e metanol, estes foram postos para evaporação em dessecador até formação de película. A ressuspensão da amostra foi realizada em PBS até atingir a concentração de 6mg/mL. A amostra foi homogeneizada através de sonicador com configuração de tempo em 300 segundos, potência de 80% micropona e pulsador de 2.

4.3 ANÁLISE DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

O diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta foram medidos por DLS e eletroforese de mobilidade (Zetasizer Nano ZS, Malvern) por Micro-eletroforese de Laser Doppler. As amostras foram diluídas (1:100) em água ultrapura a 25 °C. Os resultados foram apresentados como a média ± DP de três medições independentes. Para análise de PDI considerou-se o valor abaixo de 0,5 como padrão de homogeneidade.

4.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Os lipossomas foram liofilizados utilizando como agente protetor 1g de lactose para cada 10mL de composto. O lipossoma em pó foi analisado em por FTIR (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier) modelo IRPrestige-21 com acessório de refletância difusa (SHIMADZU, Quito, Japão). As análises foram realizadas com 4 mg de lipossoma liofilizado, fosfatidilserina, 7-cetocolesterol e 196 mg de KBr em intervalo de 400 a 4000 cm⁻¹, 32 scan.min⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹.

4.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE POR MTT

O teste de citotoxicidade dos lipossomas frente a linhagem de macrófagos foi realizado através do método de MTT. Para tanto os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços, os ensaios foram realizados em quadruplicata. Após 24 horas de incubação, condição de cultivo, para adesão celular foi colocado o tratamento juntamente com o grupo controle. As concentrações foram divididas respeitando a diluição seriada partindo de uma concentração inicial de 6mg/mL.

A leitura foi realizada no período de 24h. Adicionou-se MTT 0,5 mg mL⁻¹; incubou-se 3 h. O meio foi removido, e o cristal de formazan foi dissolvido em DMSO e a absorbância lida (espectrofotômetro SynergyTM) a 590 nm. A viabilidade (%) foi calculada em relação ao controle veículo. O mesmo processo foi repetido nos períodos de 48 e 72 horas após a inoculação do tratamento.

4.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL QUANTITATIVA (RT-qPCR)

Para compreender o efeito dos lipossomas contendo fosfatidilserina e 7-cetocolesterol (PS/7-KC) sobre o perfil funcional de macrófagos, foi realizada uma análise integrada da expressão de cinco genes-alvo: *iNOS*, *MCR*, *IL-10*, *IL-12* e *RPL32* (controle endógeno) (Tabela 1).

A síntese do DNA complementar (cDNA) da linhagem celular macrofágica J774 foi realizada a partir da conversão enzimática de mRNA, segundo as instruções do fabricante (kit *GoTaq® Probe 2-Step RT-qPCR System* - *PROMEGA*).

O teste de eficiência dos primers (tabela 1) foi realizado por meio de análise de curva padrão após diluição seriada de uma amostra obtida de cDNA (20 ng iniciais) (1 ×, 0,1 ×, 0,01 ×, 0,001 × e 0,0001 ×), considerando valores de eficiência aceitáveis entre 90 e 110% (*slop* 3,105 – 3,276). A reação de eficiência dos primers consistiu em 2 × *Go Taq qPCR Master mix* (Promega), 0,3 μM de primer forward e reverse, cDNA (20 ng) e água q.s.p. para completar um volume final de 20 μl. As condições de RT-qPCR foram uma etapa de desnaturação a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação de 15 s a 95°C, anelamento a 60°C por 30 s e uma extensão final a 72 °C por 30 s, terminando com uma análise da curva de dissociação.

Tabela 1. Sequências dos primers, eficiência de amplificação e slope utilizados na RT-qPCR para os genes *IL10*, *IL12*, *iNOS*, *Mrc1* e *Rpl32*

Gene	Sequência (5'- 3')	Eff%	Slope
<i>IL10</i>	FW- CGGGAAGAACAATAACTGCACCC; RV- CCGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC	108,769 %	-3,128
<i>IL12</i>	FW- TTGAACTGGCGTTGGAAGCACG; RV- CCACCTGTGAGTTCTTCAAAGGC	109,918 %	-3,105
<i>Inos</i>	FW- GAGACAGGGAAGTCTGAAGCAC; RV- CCAGCAGTAGTTGCTCCTCTTC	101,905 %	-3,277
<i>Mcr</i>	FW-GTTCACCTGGAGTGATGGTTCTC; RV- AGGACATGCCAGGGTCACCTTT	107,541 %	-3,154
<i>Rpl32</i>	FW- GCCTCTGGTGAACCCAAG; RV- TTGTTGCTCCCATAACCGATGT	107,905	-3,146

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa foi realizada em equipamento *QuantStudio 5 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Singapore)*. Após a confirmação da eficiência, a RT-qPCR foi conduzida em duplicata para cada amostra, utilizando $2 \times$ *Go Taq qPCR Master Mix* (Promega), primer *forward* e *reverse* 0,5 μ M, 20 ng de cDNA e água q.s.p. para completar um volume final de 20 μ L. A ciclagem na RT-qPCR foi a mesma utilizada para o teste de eficiência do primer.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada, utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (Delta-Delta C_t). Inicialmente, foi calculado o ΔC_t de cada amostra, obtido pela subtração entre o valor de C_t (threshold cycle) do gene de interesse e o C_t do gene endógeno de referência, *RPL32*. Posteriormente, o $\Delta\Delta C_t$ foi determinado pela equação:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{amostra}) - \text{média do } \Delta C_t \text{ do grupo controle}$$

A partir desse valor, foi calculado o *fold change* (FC) relativo da expressão gênica utilizando a fórmula:

$$FC = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Como os dados apresentaram distribuição não paramétrica, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, adotando-se nível de significância de $p < 0,05$. Para identificação dos grupos com diferenças significativas entre si, utilizou-se o teste de Dunn como pós-teste. A elaboração dos gráficos e análise estatística foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DO LIPOSSOMA DE FOSFATIDILSERINA E 7-CETOCOLESTEROL

A formação dos lipossomas ocorreu de forma espontânea devido à natureza anfifílica dos fosfolipídios. Em meio aquoso, essas moléculas organizam-se em bicamadas, guiadas principalmente pelas forças de van der Waals entre as cadeias carbônicas, pelas interações dipolo-íon envolvendo as cabeças polares e pela ação do efeito hidrofóbico, que promove o afastamento das caudas apolares da água (Bozzuto; Molinari, 2015; Nicolson, 2014). Esse comportamento físico-químico favorece a formação de estruturas esféricas com cavidade interna aquosa, capazes de encapsular simultaneamente compostos hidrofílicos e lipofílicos, como o 7-KC. Essa propriedade foi essencial para o desenvolvimento da formulação lipossomal PS/7-KC proposta neste estudo, com a encapsulação do biocomposto na parte lipofílica.

A estrutura geométrica dos fosfolipídios é representada pelo “cone truncado” onde a cabeça polar hidrofílica possui um diâmetro superior em relação às caudas hidrofóbicas. Esse arranjo é o que favorece a auto-organização das moléculas em meio aquoso onde as cabeças são voltadas ao lado exterior e as caudas para o lado interior, afastadas da água. Essa disposição reduz o custo energético e garante uma maior estabilidade para a molécula (Kobierski *et al.*, 2022).

O formato em cone com duas cadeias acíclicas, grupo acila (R-CO-) ligados ao grupo funcional, é determinante para sua curvatura e fechamento da bicamada permitindo a formação do compartimento aquoso interno, adequado para o encapsulamento de moléculas hidrofílicas, possibilitando a inserção de compostos lipofílicos no interior da bicamada (Asfia; Seemann; Fleury, 2023)

Diante de estratégias lipossomais, há o uso de lipossomas fusogênicos de membrana híbrida, os quais mimetizam a superfície de macrófagos M1 sendo capazes de fundir diretamente a membrana células de TAMs residentes. Esse processo permite a entrega sinérgica de elementos funcionais de membrana e cargas moleculares ativas, como inibidores da repolarização e anticorpos bloqueadores, em um único evento de fusão (Zheng *et al.*, 2023). O lipossoma PS/7-KC pode encaixar-se nesse sistema, visto que, a fosfatidilserina, estimula a fagocitose, engolfamento e liberação do fármaco, induzindo a polarização macrofágica. Além do mais, ambas as abordagens compartilham a terapêutica de mimetizar o ambiente tumoral e induzir o fenótipo M1, tornando mais atrativo o desenvolvimento de uma formulação mais

eficaz, com liberação controlada e que consiga uma toxicidade maior com o uso do 7-KC por exemplo.

5.2 ANÁLISE DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

Os resultados obtidos a partir da análise das partículas, envolvendo o potencial zeta, análise do diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização físico-química das formulações lipossomais contendo fosfatidilserina e fosfatidilserina/7-cetocolesterol quanto ao potencial zeta, diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) nos dias 30 (30D) e 90 (90D) para as formulações de Fosfatidilserina (PS) e Fosfatidilserina e 7-Cetocolesterol (7-KC).

Formulações	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro Médio (nm)	PDI
PS D30	$-29,90 \pm 7,57$	$172,93 \pm 16,9$	$0,345 \pm 0,11$
PS D90	$-47,4 \pm 2,03$	$233,23 \pm 7,35$	$0,215 \pm 0,007$
PS/7-KC D30	$-37,10 \pm 2,59$	$221,77 \pm 20,88$	$0,362 \pm 0,036$
PS/7-KC D90	$-37,13 \pm 4,30$	$271,2 \pm 8,54$	$0,414 \pm 0,018$

A análise do potencial zeta (mV) revelou diferença significativa na estabilidade entre ambos os sistemas lipossomais ao longo do tempo. O potencial zeta é uma medida fundamental para a caracterização de nanopartículas estando diretamente relacionado com a repulsão eletrostática entre as partículas, ou seja, importante na estabilidade da formulação. De forma geral, nanopartículas com potencial zeta maiores apresentam maior repulsão eletrostática ajudando na estabilidade e permitindo que as partículas não se agreguem (Öztürk; Kaplan; Çalış, 2024).

Ambas formulações aos 30 dias apresentaram valores negativos de $-29,90$ mV e $-37,10$ mV para PS e PS/7-KC, respectivamente. Esses valores indicam carga superficial negativa compatível com os grupos fosfato da fosfatidilserina. Após 90 dias o sistema contendo a PS isolada teve uma queda significativa no potencial zeta, atingindo $-47,40$ mV ($p = 0,0035$, diferença média de $17,50$ mV).

Ao analisar o sistema PS/7-KC, observa-se que a estabilidade foi maior ao longo do tempo, mantendo-se praticamente os mesmos valores de potencial zeta aos 30 e 90 dias ($-37,10$ mV e $-37,13$ mV, respectivamente; $p > 0,9999$). Essa estabilidade é atribuída à presença de 7-KC, visto que, esse oxisterol possui estrutura rígida e apolar onde ao ser inserido entre as cadeias do fosfolípídeo promove interações hidrofóbicas ao reduzir a afinidade de ligação de superfícies e aumento do empacotamento lipídico, o que reduz a exposição de grupos iônicos à água e preserva a carga superficial da partícula (Briuglia *et al.*, 2015)

O oxisterol incorporado na bicamada por aumentar a rigidez limitando a mudança de conformação do fosfolípídeo ao longo do tempo, esse efeito estabilizador foi observado com colesterol em outras formulações (Doole *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2000; Nsairat *et al.*, 2024)

Em relação a análise do espalhamento dinâmico de luz (DLS) demonstrou um aumento significativo no diâmetro médio, em nanômetros, em ambas as formulações lipossomais após os 90 dias. A formulação com apenas PS apresentou um aumento de $172,9$ nm para $233,2$ nm ($p = 0,0019$), enquanto a formulação de PS/7-KC teve um aumento de $221,8$ nm para $271,2$ nm ($p = 0,0064$). A análise permitiu observar que ambas as formulações sofreram variações ao longo do tempo, esse fenômeno pode estar diretamente relacionado com a fusão vesicular, reorganização da bicamada lipídica ou coalescência de partículas, muito comum em lipossomas “envelhecidos” (Chun *et al.*, 2013; Reza Mozafari *et al.*, 2008).

De modo adicional foi observado que independente do tempo a formulação de PS/7-KC apresentou tamanho maior que PS isolada, sugere-se que a incorporação do 7-KC na formulação implicou na estrutura da bicamada fosfolipídica com maior espessamento da bicamada e aumento do diâmetro (Jovanović *et al.*, 2018). Entretanto, ainda sim os tamanhos permaneceram abaixo de 300 nm, o que é adequado para aplicações em nanossistemas de liberação, visto que, o tamanho médio da partícula influencia diretamente na permeabilidade e efeito EPR (Efeito de Permeabilidade e Retenção Aprimoradas) aumentando diretamente a biodisponibilidade do princípio ativo, onde é considerado a faixa ideal de 100 a 200 nm para o melhor efeito EPR em tumores sólidos (Wu, 2021).

A estabilidade coloidal das formulações lipossomais foi avaliada por meio da análise de índice de polidispersão (PDI) nos dias 30 e 90 após a produção da nanopartícula. Foi observado que a formulação contendo somente PS apresentou redução significativa do PDI ao longo do tempo, passando de $0,3453$ para $0,2154$, indicando homogeneidade e estabilização do sistema ($p=0,0469$). Esse resultado sugere que a reorganização da bicamada pode favorecer uma encapsulação eficaz ao longo do tempo. Entretanto, a formulação de PS/7-KC apresentou um

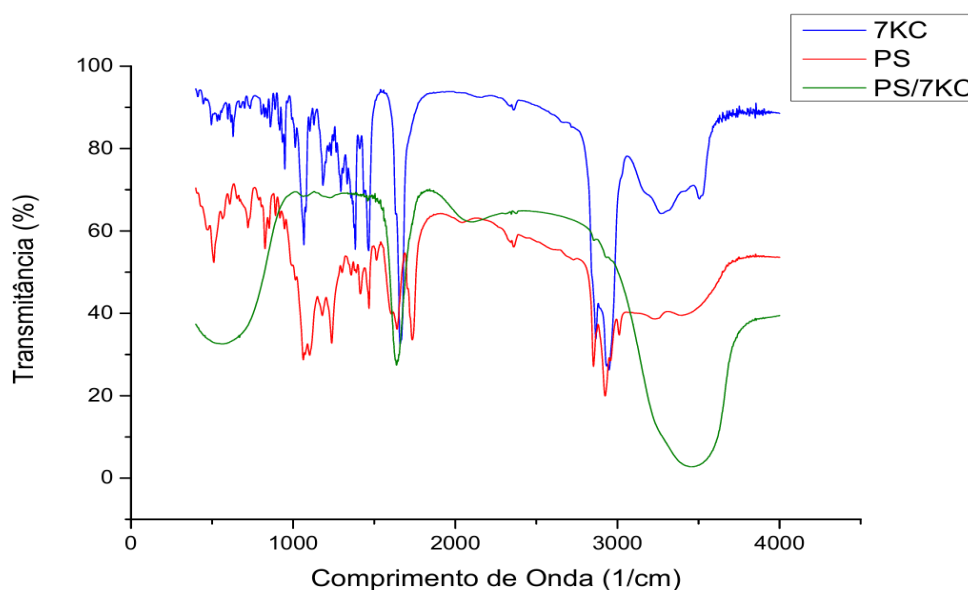
leve aumento de PDI de 0,3620 para 0,4140, indicando que o uso de 7-KC no sistema nanoencapsulado não compromete sua estabilidade ao longo do tempo.

Por outro lado, ambos os valores se mantiveram abaixo do limite de 0,5, o que é considerado adequado para os sistemas lipossomais indicando uma maior viabilidade na formulação. Entretanto, a heterogeneidade observada na formulação PS/7-KC pode estar relacionada com a interferência direta do 7-KC na compactação da bicamada, o que já está previamente descrito em formulações com esteróis.

5.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para confirmação da presença da PS e 7-KC no lipossoma, caracterizando também uma interação intermolecular entre os compostos (Gráfico 1).

Gráfico 1. Caracterização molecular de PS, 7-KC e PS/7-KC por FTIR.



No espectro da PS foi observado uma banda na região de aproximadamente 3400 cm^{-1} característico das ligações O-H e N-H, além disso, é possível observar bandas em aproximadamente $2850\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ que são referentes às vibrações C-H alifáticas. A banda em $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$ é atribuída ao grupo C=O, já as bandas ~ 1250 e $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$ são correspondentes às vibrações dos grupos fosfatos (PO_2^-) (Dou *et al.*, 2022).

No espectro do 7-KC foi observado uma banda em $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$ referente a carbonila cetogênica com sinais associados ao esqueleto esteroideal na faixa de ~ 2850 a 2950 cm^{-1} (Okayama *et al.*, 2024).

Como é possível observar no gráfico 1 as bandas de carbonila entre PS e 7-KC se sobrepõem e foi registrado no espectro lipossomal, o que reforça a incorporação dos componentes. O espectro do lipossoma PS/7-KC há bandas características de ambos os componentes sugerindo a incorporação de 7-KC na bicamada. A redução da intensidade da banda em $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ indica uma possível interação entre os grupos hidroxila e amina da PS com o grupo carbonila do 7-KC (Arsov; Quaroni, 2007).

Além disso, a modificação da intensidade e do perfil das bandas fosfato sugere uma reorganização da bicamada fosfolipídica, o que é compatível com a formação de estruturas supramoleculares auto-organizadas (Dou *et al.*, 2022).

Estudos com sistemas lipossomais com incorporação de esteróis demonstram interação não covalente entre os fosfolípeos e esses compostos por meio das ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, contribuindo para a estabilidade estrutural do lipossoma (Ayee; Levitan, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

Esses padrões são consistentes com os padrões observados no nosso espectro, onde não foram detectados bandas novas ou deslocamento sugerindo formação de novas ligações covalentes o que condiz com a formação lipossomal (Birkenfeld *et al.*, 2024).

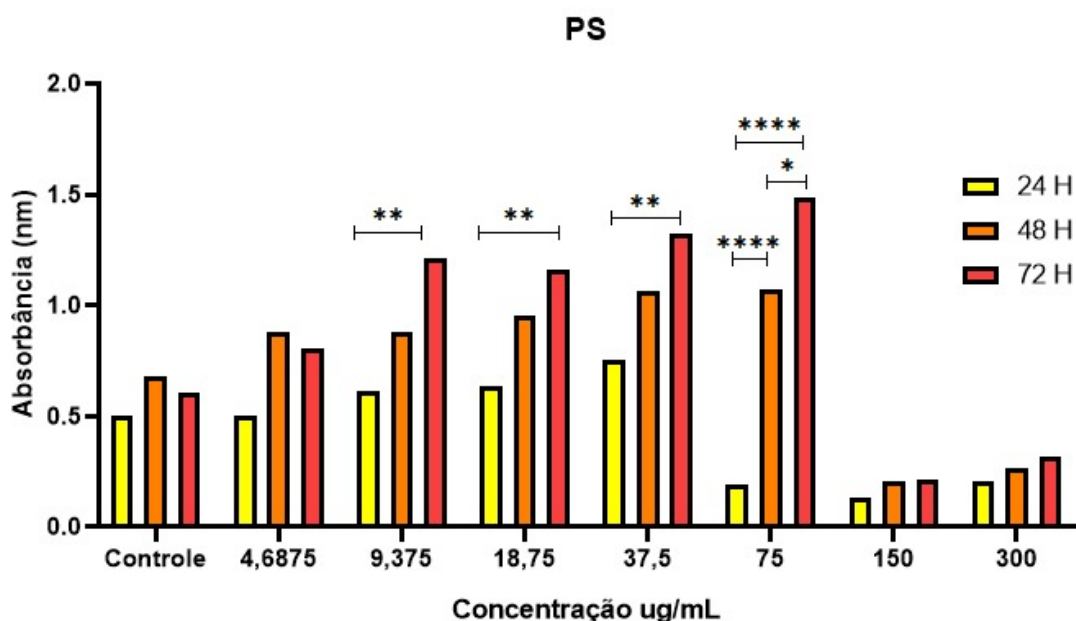
Os dados oriundos do FTIR confirmaram a formação lipossomal do PS/7-KC, com preservação das bandas características de cada componente e indicações evidentes de interações intermoleculares que favorecem a estabilidade estrutural e funcional da bicamada lipossomal. Esses resultados favorecem a aplicação do sistema como veículo de liberação como também modelo de interação bioativa entre sistemas biomiméticos.

5.4 TESTE DE CITOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT

O ensaio de MTT realizado com a formulação contendo apenas fosfatidilserina (PS) evidenciou um perfil bifásico, dependente tanto da concentração quanto do tempo de exposição (Gráfico 2). Em baixas concentrações (4,6875 a 37,5 $\mu\text{g/mL}$), a viabilidade celular foi semelhante ou discretamente superior ao grupo controle até 48h, sem diferenças estatísticas relevantes. No entanto, em 72h, observou-se um aumento significativo da viabilidade em 9,375 $\mu\text{g/mL}$, 18,75 $\mu\text{g/mL}$, e 37,5 $\mu\text{g/mL}$ e 75 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$), indicando que, nessas doses, o PS pode atuar como fator de suporte celular, favorecendo a sobrevivência e a proliferação dos macrófagos J774.

Na concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$, o efeito foi ainda mais pronunciado, com aumento significativo da viabilidade já em 48h e intensificado em 72h ($p < 0,0001$ para 24h vs. 48h e 24h vs. 72h), sendo o ponto de maior resposta proliferativa observado no ensaio.

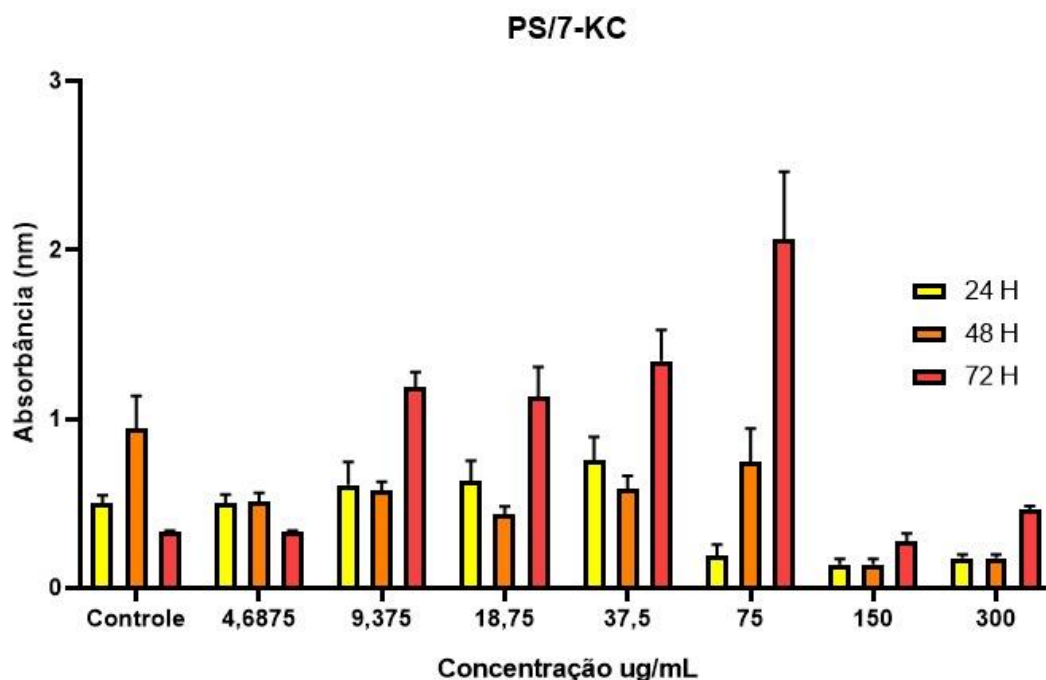
Gráfico 2. Viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de tratamento com a formulação lipossomal de fosfatidilserina (PS) em diferentes concentrações, avaliada por ensaio de MTT em comparação ao controle (0 $\mu\text{g/mL}$).



Em contrapartida, nas concentrações mais elevadas (150 e 300 $\mu\text{g/mL}$), a viabilidade celular foi consideravelmente reduzida, sem diferenças significativas entre os tempos, caracterizando um efeito tóxico do PS em altas concentrações. Esses resultados indicam que a ação da fosfatidilserina é dose e tempo-dependente, promovendo proliferação em baixas a moderadas concentrações e toxicidade em concentrações elevadas.

A avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT demonstrou um perfil dose e tempo-dependente na resposta dos macrófagos J774 tratados com a formulação lipossomal contendo PS/7-KC (Gráfico 3). Observa-se que em concentrações mais baixas, como 4,6875 $\mu\text{g/mL}$, a variação de absorbância entre os tempos de incubação foi mínima, indicando que a formulação, nessas condições, não apresentou efeito citotóxico relevante. Essa ausência de diferença significativa foi confirmada estatisticamente, com valores de p não significativos entre os tempos de 24 h, 48 h e 72 h ($p > 0,05$).

Gráfico 3. Viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de tratamento com a formulação lipossomal de fosfatidilserina/7-cetocolesterol (PS/7-KC) em diferentes concentrações, avaliada por ensaio de MTT em comparação ao controle (0 ug/mL).



A partir de 9,375 $\mu\text{g/mL}$, inicia-se um padrão de alteração significativo na viabilidade celular. Em 72 h, a absorbância foi significativamente maior em relação a 24 h e 48 h ($p < 0,0001$), sugerindo um possível estímulo proliferativo inicial ou aumento da atividade metabólica. Esse efeito foi ainda mais evidente nas concentrações intermediárias, especialmente 18,75 e 37,5 $\mu\text{g/mL}$, onde a diferença entre os tempos foi acentuada ($p < 0,0001$), demonstrando que a formulação pode, em concentrações moderadas, induzir ativação celular antes do início de um processo de morte celular.

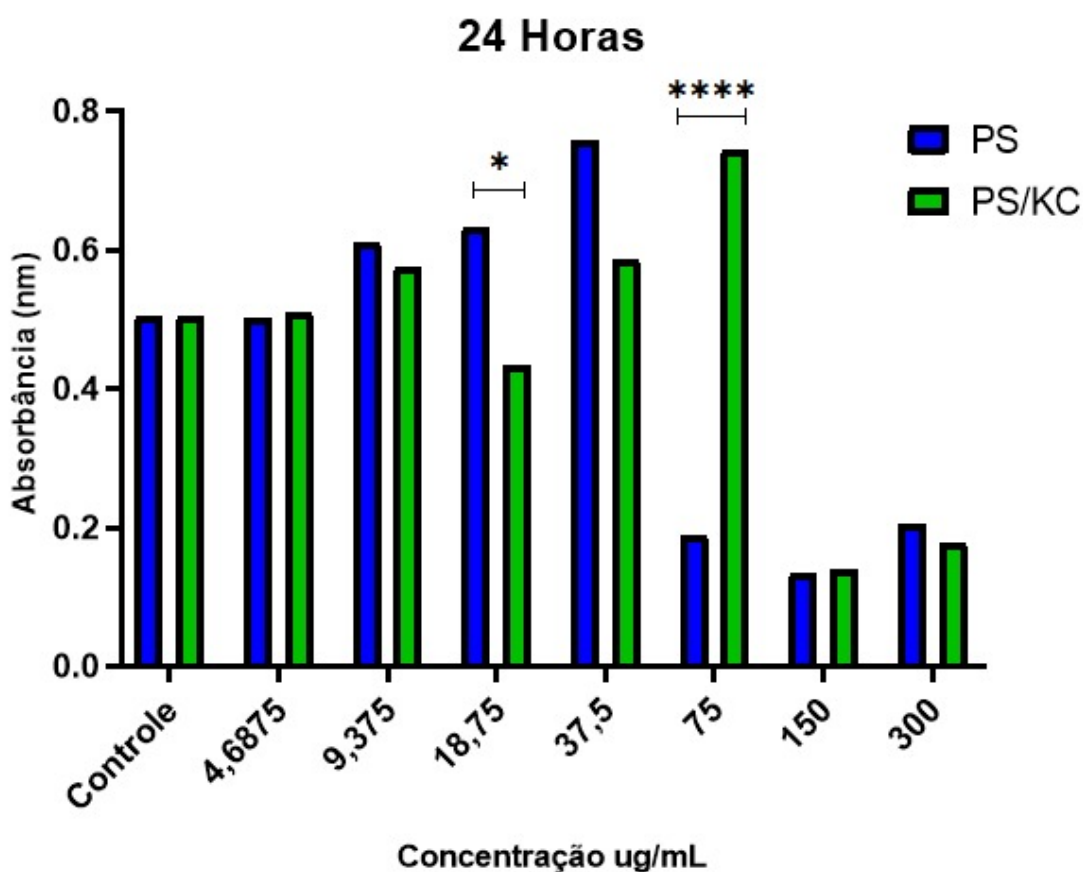
Nas concentrações de 75 $\mu\text{g/mL}$, houve uma mudança marcante no perfil de resposta. Em 72 h, a absorbância apresentou um aumento abrupto e altamente significativo ($p < 0,0001$), indicando um efeito robusto, possivelmente relacionado à ativação intensa ou proliferação celular exacerbada. Esse padrão sugere que, nessas concentrações, a formulação PS/7-KC pode desencadear mecanismos de ativação imune intensa, condizentes com o papel imunomodulador esperado do 7-KC associado à fosfatidilserina.

Por outro lado, nas concentrações muito altas, 150 $\mu\text{g/mL}$ e 300 $\mu\text{g/mL}$, houve uma redução na viabilidade, embora houvesse uma diferença significativa entre os tempos de 24 h e 72 h ($p = 0,014$), os valores absolutos de absorbância permaneceram baixos em relação às

concentrações intermediárias, sugerindo um efeito citotóxico progressivo, com queda na viabilidade celular ao longo do tempo. Esse comportamento indica que, acima de determinado limiar de concentração, o efeito do 7-KC deixa de ser apenas imunomodulador e passa a induzir morte celular, possivelmente via estresse oxidativo e apoptose, conforme descrito na literatura para essa molécula.

A comparação entre os lipossomas contendo PS e aqueles com adição de 7-KC após 24 horas evidenciou respostas diferentes e concentração dependente (Gráfico 4). Em concentrações mais baixas como 4,6875 $\mu\text{g/mL}$ e 9,375 $\mu\text{g/mL}$ não foi observado diferença significativa na viabilidade celular ($p > 0,9999$), indicando baixa citotoxicidade inicial, indicando que em concentrações baixas, ambas as formulações apresentam um perfil adequado para a linhagem celular macrofágica.

Gráfico 4. Viabilidade celular em 24 horas com tratamento de PS e PS/7-KC em diferentes concentrações, avaliada por ensaio de MTT em comparação ao controle (0 $\mu\text{g/mL}$).



Na concentração de 18,75 $\mu\text{g/mL}$, a formulação de PS apresentou absorvância superior a observada no grupo PS/7-KC ($p = 0,0349$) sugerindo que, em níveis intermediários, a PS isolada

pode favorecer a atividade metabólica e proliferação celular enquanto a presença do 7-KC demonstra modular essa resposta. Acredita-se que esse fenômeno ocorra a partir do redirecionamento do comportamento celular pelo 7-KC, sem a promoção do aumento na viabilidade. É possível observar uma tendência semelhante na concentração de 37,5 µg/mL, onde o grupo PS apresentou valores elevados em comparação com o grupo PS/7-KC, entretanto não apresentou significância estatística ($p = 0,1114$). Esse padrão presente em ambas as concentrações indica que o 7-KC pode influenciar o comportamento celular, induzindo estresse oxidativo e sinalização associado a polarização da linhagem macrofágica.

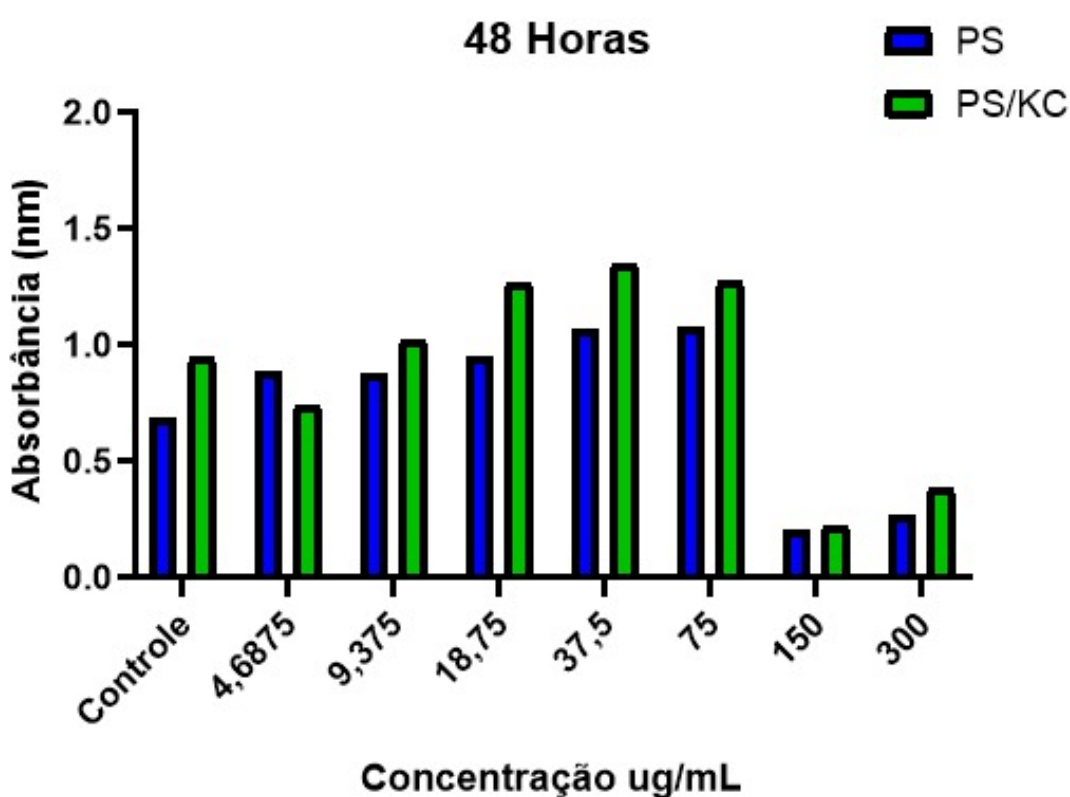
Quando é observado a concentração de 75 µg/mL é visto uma inversão, onde a formulação de PS/7-KC apresenta valores de absorbância superiores à PS ($p < 0,0001$). Esse aumento se deve a ativação celular induzida pelo 7-KC, corroborando com a hipótese que esse oxisterol atua como um sinalizador pró-inflamatório. Alternativamente, o aumento de absorbância pode indicar elevação transitória da atividade mitocondrial, também detectada pelo ensaio de MTT, que precede eventos de morte celular em períodos mais longos ou concentrações mais altas. Em concentrações mais elevadas como 150 µg/mL e 300 µg/mL não teve diferença significativa ($p > 0,9999$), ambos apresentaram valores reduzidos, propondo que em concentrações mais altas há um aumento na citotoxicidade levando a diminuição da viabilidade celular.

Em 48 horas, confirma-se que a concentração foi o fator de predominância na variação da resposta celular, explicando 78,23% da variação total ($p < 0,0001$), indicando um comportamento dose dependente. O tipo da formulação também apresentou efeito significativo ($p = 0,0014$). A média geral de absorbância foi maior no grupo tratado com PS/7-KC (0,9016) em comparação ao grupo PS (0,7511), com diferença estatisticamente significativa de -0,1504 (IC95%: -0,2397 a -0,06118). Esses resultados sugerem que o 7-KC pode modular a resposta celular resultando em maior manutenção da viabilidade em determinadas condições.

Em concentrações baixas, variando de 4,6875 a 9,375 µg/mL, ambas as formulações apresentaram perfis semelhantes, sem indícios de citotoxicidade. Em concentrações intermediárias, entre 18,75 e 75 µg/mL, observou-se uma tendência de maior viabilidade nos grupos tratados com PS/7-KC, especialmente nas concentrações de 18,75 e 37,5 µg/mL, ainda que sem significância estatística. Esse padrão pode refletir um efeito imunomodulador inicial promovido pelo 7-KC em associação à PS, favorecendo a manutenção da atividade metabólica celular. Em concentrações elevadas, como 150 e 300 µg/mL, ocorreu queda acentuada na

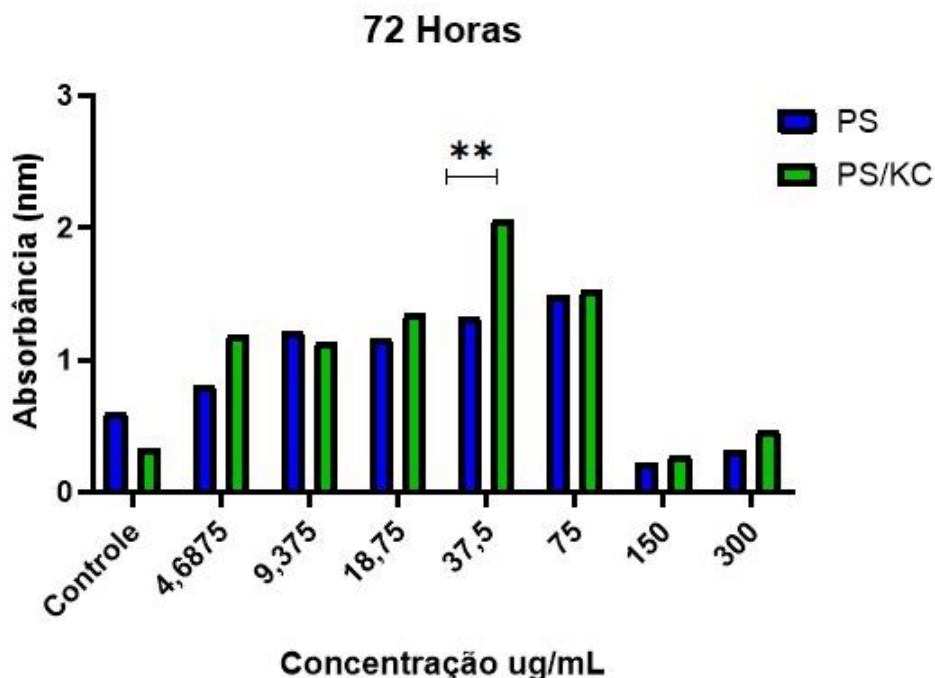
viabilidade celular em ambos os grupos. De forma geral, em 48 horas, a formulação PS/7-KC demonstrou potencial para preservar a viabilidade celular em concentrações intermediárias, reforçando a hipótese de que o 7-KC atua como modulador da resposta celular. Entretanto, em concentrações elevadas, predomina um efeito citotóxico (Gráfico 5).

Gráfico 5. Viabilidade celular em 48 horas com tratamento de PS e PS/7-KC em diferentes concentrações, avaliada por ensaio de MTT em comparação ao controle (0 ug/mL).



Após 72 horas o padrão dose-dependente foi novamente confirmado, com a concentração explicando 74,98% da variação total ($p < 0,0001$) além de manter o efeito significativo do tipo de formulação ($p = 0,0416$) (Gráfico 6). A média geral de absorbância foi superior no grupo PS/7-KC (1,040) em relação ao PS isolado (0,8918), com diferença estatisticamente significativa de -0,1477 (IC95%: -0,2896 a -0,005879).

Gráfico 6 -Viabilidade celular em 72 horas com tratamento de PS e PS/7-KC em diferentes concentrações, avaliada por ensaio de MTT em comparação ao controle (0 ug/mL).



Esses achados reforçam o papel do 7-KC como modulador da viabilidade celular, possivelmente por meio de sinalização inflamatória controlada ou alterações no metabolismo intracelular. Diferentemente das análises anteriores, foi detectada interação significativa entre concentração e tipo de formulação ($p = 0,0396$), sugerindo que a resposta celular às diferentes concentrações varia conforme a presença do 7-KC. A análise post-hoc pelo teste de Sidak identificou diferença significativa em 37,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0049$), com valores mais elevados no grupo PS/7-KC. Esse resultado indica que, nessa faixa intermediária, o 7-KC promove maior manutenção da viabilidade, possivelmente por mecanismos regulatórios mediados por estresse oxidativo moderado ou sinalização pró-inflamatória.

Os resultados obtidos nas concentrações mais baixas de PS isolada sugerem um possível efeito protetor sobre a linhagem macrófágica, provavelmente relacionado à estabilização da membrana plasmática e à ativação de vias pró-sobrevivência, como a PI3K/Akt (Segawa; Nagata, 2015). Além disso, a fosfatidilserina também pode atuar como molécula sinalizadora, interagindo com receptores fagocíticos, como MerTK e TIM-4, favorecendo um microambiente anti-inflamatório e contribuindo para a manutenção da viabilidade celular.

Em contrapartida, dados na literatura sugerem que a exposição a concentrações elevadas de 7-KC tende a induzir estresse oxidativo, ativação de vias inflamatórias como NF- κ B e

aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias. (Uchikawa *et al.*, 2022). No presente estudo testes futuros podem ser aplicados para corroborar com essa informação, ademais que esses processos podem reduzir a viabilidade celular, como foi observado em concentrações mais elevadas deste estudo, mostrando que o 7-KC apresenta uma janela terapêutica de uso. Dentro desse intervalo, concentrações moderadas podem modular a resposta imune de forma benéfica, enquanto níveis mais elevados desencadeiam inflamação e dano celular (Ghzaiel *et al.*, 2022).

Além disso, concentrações elevadas de 7-KC em linhagem celular macrofágica pode levar ao acúmulo lipídico, estresse oxidativo e morte celular, complementando a queda da viabilidade celular conforme o aumento de dose proposto nesse trabalho, o que permite sugerir que o estresse celular possa estar associado a ROS, macrófago disfuncional ou disfunção mitocondrial (Bhargava *et al.*, 2023). Esses efeitos explicam a queda da viabilidade observada com o aumento da concentração, sugerindo que o estresse celular resultante esteja associado a processos oxidativos e à perda da função da linhagem macrofágica.

Os oxisteróis, de forma geral, têm papel modulador no metabolismo macrofágico, podendo direcionar a célula para perfis inflamatórios ou apoptóticos dependendo da dose (Biasi *et al.*, 2004; Choi; Finlay, 2020). Essa característica pode justificar a interação observada entre formulação e concentração no período de 72 horas. Em concentrações moderadas, a presença do 7-KC pode ativar mecanismos de sinalização adaptativos que favorecem a manutenção da viabilidade celular.

Quando é observado a presença de PS juntamente com 7-KC na formulação lipossomal é visto que a fosfatidilserina pode contribuir para uma liberação mais controlada funcionando como um contrapeso ao potencial citotóxico do 7-KC. Em concentrações intermediárias, esse equilíbrio resultou em maior viabilidade celular, sugerindo que a PS atue como agente estabilizador de membrana e sinalizador imunológico atuando com receptores fagocíticos, regulando vias de sinalização anti-inflamatórias, podendo explicar a manutenção em concentrações moderadas da formulação (Sharma; Kanwar, 2018).

5.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL QUANTITATIVA (RT-qPCR)

Em procedimentos de qPCR é importante a análise inicial dos primers quanto a suas propriedades termodinâmicas e eficiência de amplificação (Harshitha; Arunraj, 2021). Inicialmente cada par de primer foi testado individualmente para definir eficiência de

amplificação, linearidade da curva padrão e especificidade do produto amplificado, por meio da construção de curvas de eficiência a partir de diluições seriadas do cDNA, bem como da análise das curvas de dissociação (*melting curve*).

No presente estudo, todos os primers avaliados apresentaram eficiência dentro da faixa recomendada (90–110%) e *slopes* próximos ao valor teórico ideal, indicando desempenho adequado das reações. Os valores de eficiência e *slope* obtidos para os genes *IL10*, *IL12*, *iNOS*, *Mcr* e *Rpl32* estão apresentados na Tabela 1.

Outra análise realizada foi a curva de dissociação, no qual foram avaliados os picos de amplificação e a temperatura de fusão (*melting temperature*, ou T_m). A análise da curva de dissociação é fundamental para confirmar a especificidade da amplificação, permitindo verificar a ausência de produtos inespecíficos ou a formação de dímeros de primers, assegurando assim, a sensibilidade e a confiabilidade da reação de RT-qPCR (Ma; Bell; Loker, 2020).

Todos os genes analisados apresentaram um único pico na curva de dissociação, indicando amplificação específica dos produtos de PCR, conforme demonstrado no Gráfico 8. As temperaturas de fusão (T_m) observadas para cada gene ($MCR = 80,44\text{ }^{\circ}\text{C}$; $IL-10 = 84,97\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Rpl32 = 84,36\text{ }^{\circ}\text{C}$) foram distintas e compatíveis com as características individuais dos primers utilizados, sendo influenciadas pelo comprimento da sequência, composição de bases e concentração de sais na reação (He et al., 2026).

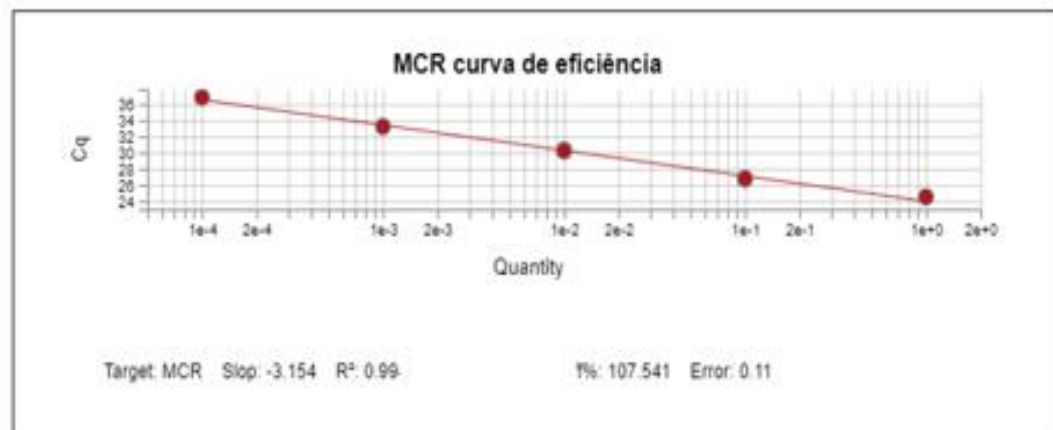
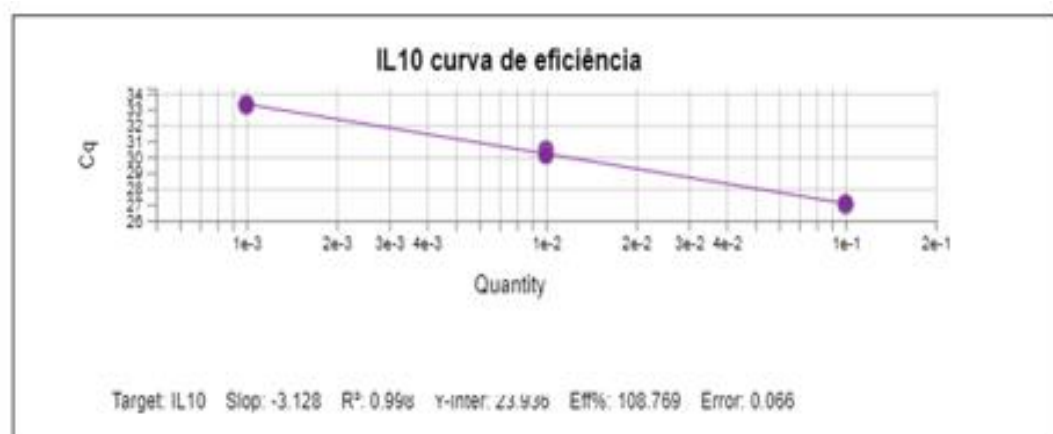
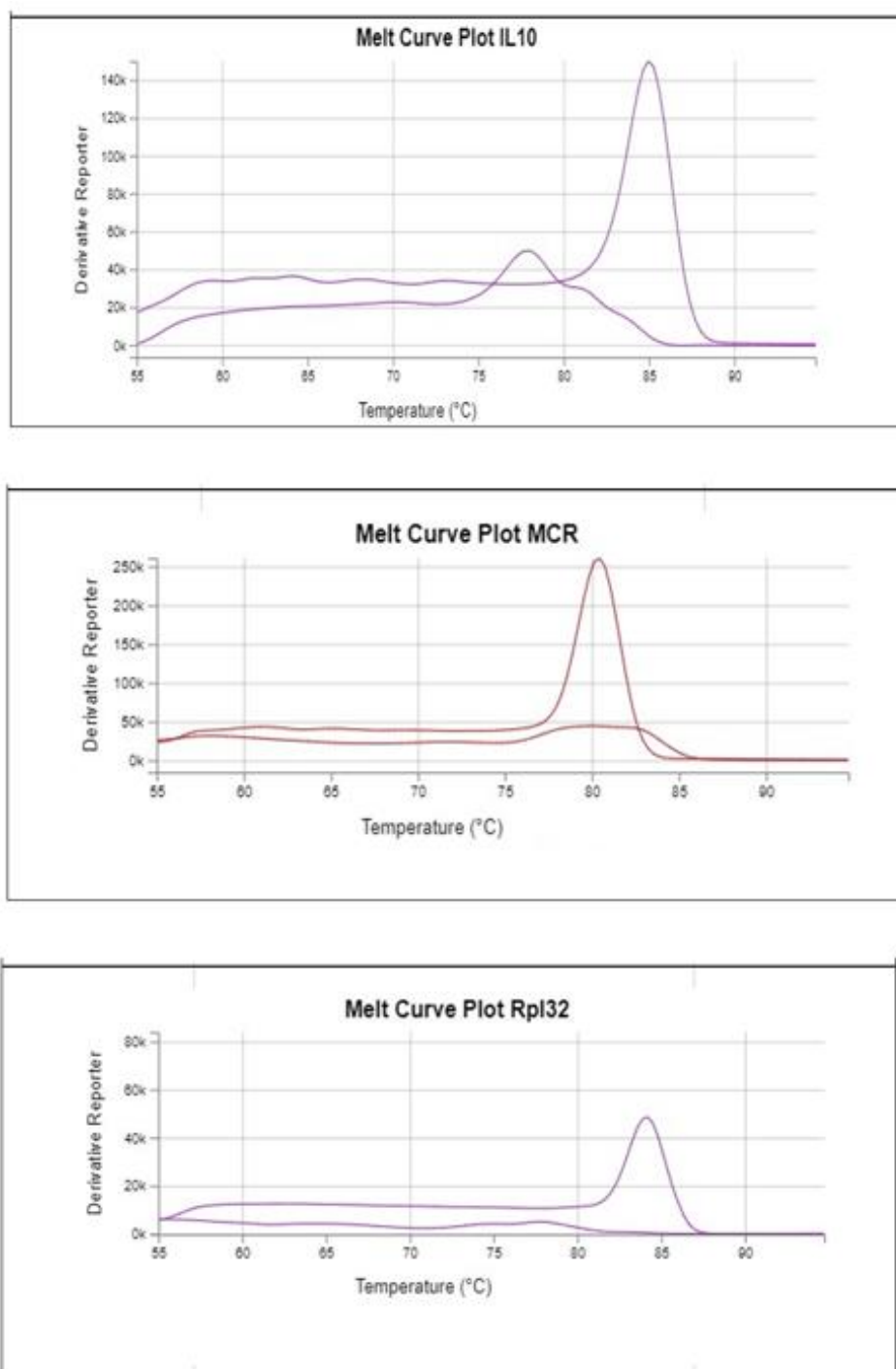
Gráfico 7 - Curva de Eficiência de genes *IL-10*, *MCR* e *Rpl32*

Gráfico 8. Curva de dissociação dos genes *IL-10*, *MCR* e *Rpl32*.



5.5.1 Receptor de Manose tipo C (Mcr)

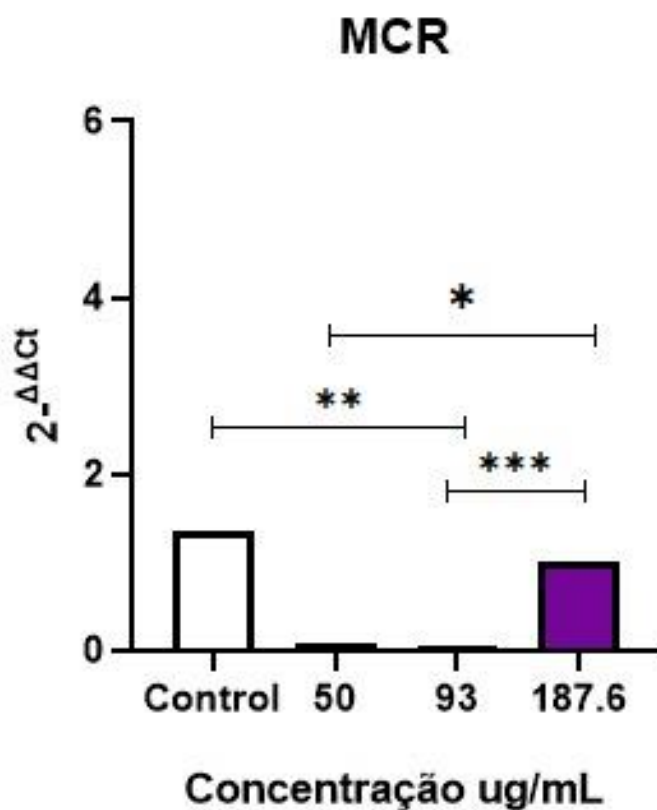
Para avaliar o efeito do tratamento lipossomal sobre a expressão do gene *MCR*, foram calculados os valores de ΔC_t , $\Delta\Delta C_t$ e $\log_2 FC$ em relação a média do grupo controle ($\Delta C_t = 11,9974$).

A análise de expressão do gene *MCR* evidenciou que o tratamento contendo PS/7-KC nas concentrações de 50 µg/mL e 93 µg/mL promoveram uma redução acentuada na expressão do gene quando comparados ao grupo controle. Os valores médios de $\log_2FC$ foram de -3,434 e -4,505, respectivamente, correspondendo a uma queda de expressão, essa queda indica uma supressão de M2, sugerindo um começo de desvio para a polarização M1. Por outro lado, a concentração 187,6 µg/mL não apresentou alteração significativa na expressão de *MCR* ($\log_2FC$ de -0,002), se assemelhando ao grupo controle ($\log_2FC$ de 0,088).

Pelo método de Kruskal-Wallis revelou diferença significativa entre os grupos ($p \approx 0,012$). A análise *post hoc* de Dunn com correção FDR indicou que os grupos tratados com 50 e 93 µg/mL diferiram significativamente do controle ($p \approx 0,015$ e $p \approx 0,005$, respectivamente) e do grupo 187,6 µg/mL ($p \approx 0,010$ e $p \approx 0,007$, respectivamente). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 50 e 93 µg/mL ($p \approx 0,74$), sugerindo que o efeito supressor sobre a expressão de *MCR* se estabiliza a partir da menor dose testada (Gráfico 9).

O gene *MCR*, também chamado de CD206, é um marcador clássico de macrófagos M2, caracterizado pelas funções imunossupressoras e remodelamento tecidual. No nosso estudo o PS/7-KC promoveu redução do gene *MCR* em concentrações menores de 50 e 93 µg/mL sugerindo uma reprogramação para fenótipo M1. Em observações com modelos de neuroinflamação por HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e SIV (Vírus da Imunodeficiência Símia) a regulação negativa de CD206 foi associada a uma maior ativação de macrófagos, aumento de migração celular e transição fenotípica de M2 para perfil mais inflamatório (Holder *et al.*, 2014). Apesar das diferenças entre os modelos experimentais, é reforçado a hipótese que a redução de *MCR* induzida pelo PS/7-KC representa um mecanismo chave para superar a imunossupressão. Assim como, esses achados estão alinhados com o estudo de Xie, *et.al.* 2025 que demonstrou que a supressão de CD206/MRC1 em condições inflamatórias, como sepse e infecção bacteriana, em que ocorre ativação de macrófagos M1 e redução da assinatura M2 (Xie *et al.*, 2025)

Gráfico 9. Expressão do gene *MCR* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) em macrófagos tratados com a formulação lipossomal de fosfatidilserina/7-cetocolesterol (PS/7-KC) em diferentes concentrações, em comparação ao grupo controle (PS-50 μ g/mL)

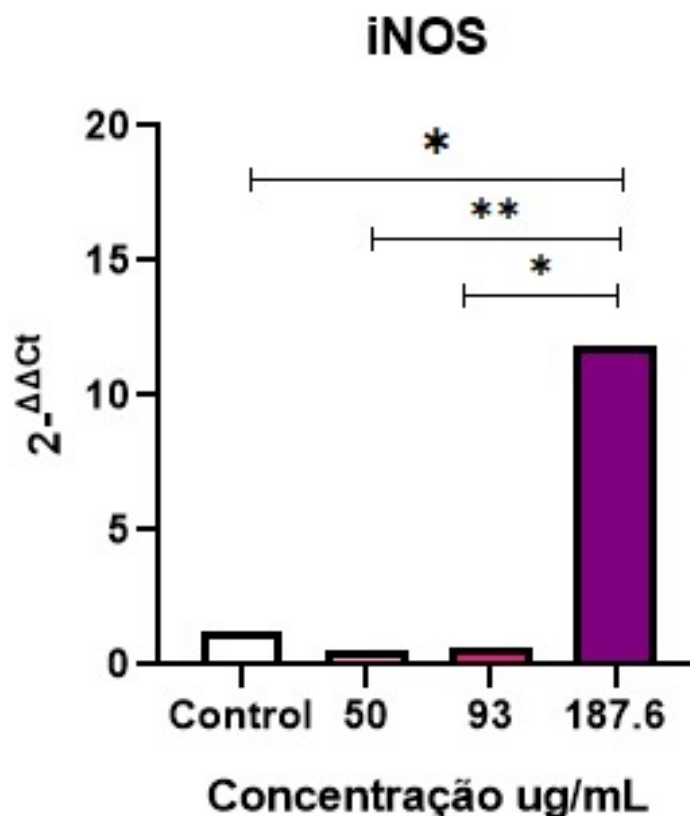


5.5.2 Óxido Nítrico Sintase Induzível (*iNOS*)

Para avaliar o efeito do tratamento lipossomal sobre a expressão do gene *iNOS*, foram calculados os valores de ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ e $\log_2 FC$ em relação ao grupo controle médio ($\Delta Ct = 12.9276$).

A expressão de *iNOS* na linhagem macrófágica tratados com PS/7-KC demonstrou alteração dependente da concentração do tratamento. A média do $\log_2 FC$ revelou que a concentração de 187,6 μ g/mL promoveu um aumento acentuado na expressão de *iNOS* ($\log_2 FC = 3,443$) enquanto as concentrações de 50 μ g/mL e 93 μ g/mL apresentaram redução leve a moderada da expressão gênica ($\log_2 FC = -0,926$ e $-0,573$, respectivamente). Os resultados demonstram que somente a formulação com maior concentração foi capaz de induzir a expressão de *iNOS* de forma significativa, por outro lado, as concentrações menores não demonstraram aumento na expressão do gene e sim uma redução (Gráfico 10).

Gráfico 10. Expressão relativa do gene *iNOS* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) em macrófagos tratados com a formulação lipossomal de fosfatidilserina/7-cetocolesterol (PS/7-KC) em diferentes concentrações, em comparação ao grupo controle (PS-50 μ g/mL).



A normalidade dos dados $\log_2FC$ utilizando Shapiro–Wilk revelou que os grupos controle ($p = 0,022$) e 187,6 μ g/mL ($p = 0,049$) não apresentaram uma distribuição normal, o que justifica a utilização do teste não paramétrico Kruskal–Wallis que indicou diferenças estatísticas entre os grupos ($H = 11,82$; $p = 0,0080$). A análise de *post-hoc* (teste de Dunn com correção FDR) confirmou que o grupo tratado com 187,6 μ g/mL diferiu estatisticamente dos grupos 50 μ g/mL ($p = 0,007$), 93 μ g/mL ($p = 0,014$) e controle ($p = 0,009$), entretanto não houve diferença entre os grupos controle, 50 μ g/mL e 93 μ g/mL.

O *iNOS* é um marcador para macrófagos inflamatórios, associado diretamente à produção de óxido nítrico (NO) e resposta pró-inflamatória. No estudo em questão, a formulação PS/7-KC induziu um aumento na expressão desse gene na concentração 187,6 μ g/mL ($\log_2FC$: +3,44; $p < 0,01$) indicando a reprogramação fenotípica para uma linhagem pró-inflamatória. De maneira semelhante, macrófagos reprogramados de perfil M2 para M1 tiveram

uma forte indução de *iNOS* e aumento de NO, mostrando uma reversão para um perfil ativo e antitumoral (Oyarce *et al.*, 2021).

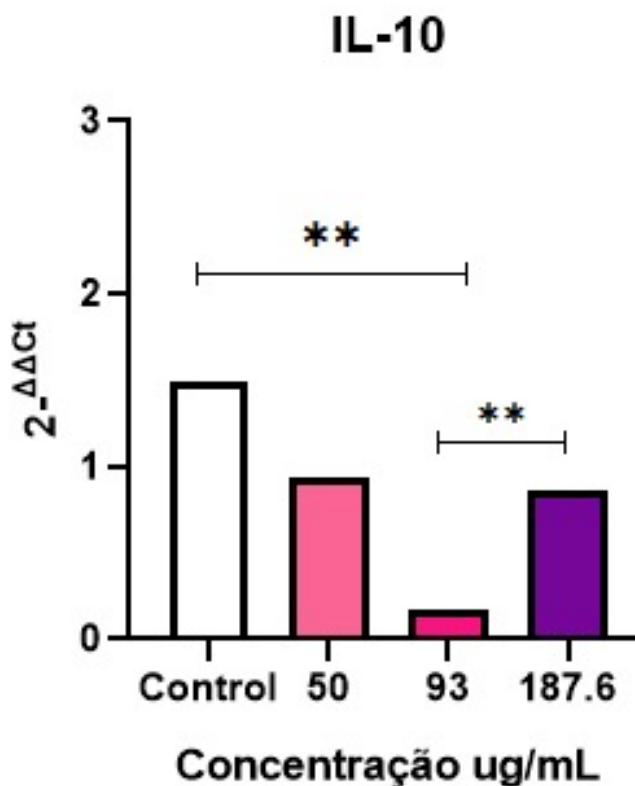
Esses achados alinham-se de mesma maneira com os resultados obtidos por nanogotas de perfluorohexano (PFH ND), os quais induziram aumento de *iNOS* em macrófagos M2, desencadeando a repolarização (Gao *et al.*, 2025). Em ambos os casos, tanto o PS/7-KC e PFH ND evidenciaram que diferentes nanoterapias podem convergir para reprogramação macrofágica via indução de *iNOS*, podendo abrir espaço para novas terapias combinadas para potencializar o efeito no TME.

5.5.3 Interleucina 10 (*IL-10*)

Para avaliar o efeito do tratamento lipossomal sobre a expressão do gene *IL-10*, foram calculados os valores de ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ e $\log_2 FC$ em relação ao grupo controle médio ($\Delta Ct = 16.5474$).

A *IL-10* é uma citocina voltada a manutenção do fenótipo M2, exercendo um efeito imunossupressor em células imunológicas como células T efectoras e NK. No presente trabalho a média de $\log_2 FC$ mostrou que a concentração de 93 $\mu g/mL$ promoveu uma redução acentuada na expressão de *IL-10* ($\log_2 FC -2,518$). A concentração 50 $\mu g/mL$ ($\log_2 FC -0.993$) resultou em uma redução moderada, mas sem significância estatística, enquanto o grupo tratado com 187,6 $\mu g/mL$ apresentou valores próximos ao controle ($\log_2 FC -0,260$), indicando ausência de efeito relevante nessa concentração (Gráfico 11).

Gráfico 11. Expressão relativa do gene *IL-10* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) em macrófagos tratados com a formulação lipossomal de fosfatidilserina/7-cetocolesterol (PS/7-KC) em diferentes concentrações, em comparação ao grupo controle (PS-50ug/mL).



O teste de Kruskal–Wallis revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($H = 9,72$; $p = 0,021$) o que foi confirmado pelo teste de teste de Dunn com correção por FDR que demonstrou que o grupo tratado com $93 \mu\text{g/mL}$ diferiu significativamente do controle ($p = 0,023$) e do grupo $187,6 \mu\text{g/mL}$ ($p = 0,038$), reforçando o efeito imunossupressor do tratamento intermediário sobre a expressão de *IL-10*.

Em modelos celulares JMJD6 foi observado que a redução da expressão de *IL-10* levou a diminuição de TAMs do tipo M2, tanto *in vitro* como *in vivo*, não havendo significância para ativação do fenótipo M1(Chen *et al.*, 2023b). No caso deste trabalho a formulação desenvolvida reproduziu esse efeito, com queda expressiva de *IL-10* sugerindo uma reprogramação para o fenótipo M1.

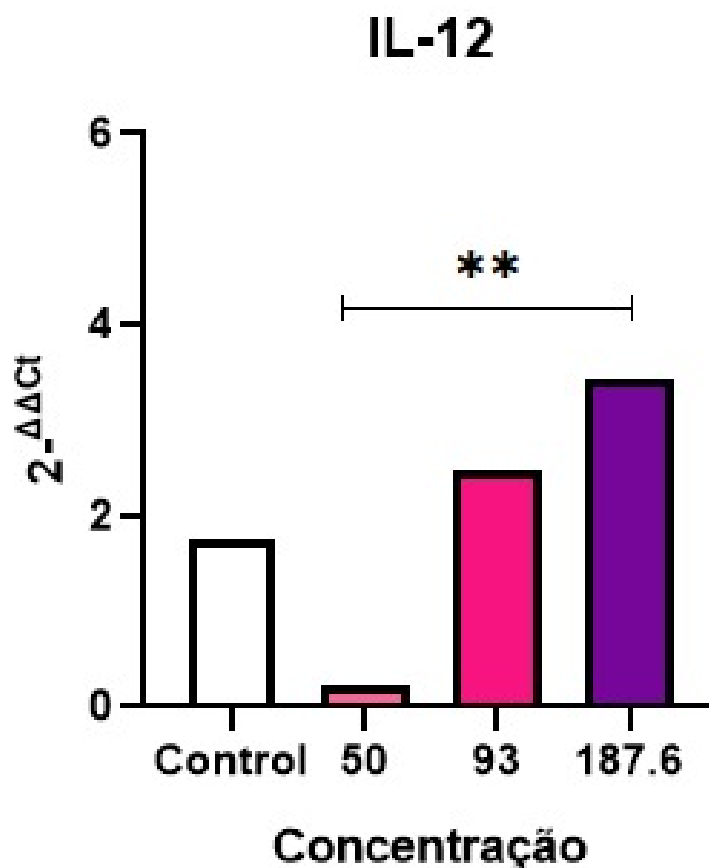
5.5.4 Interleucina 12 (*IL-12*)

Para avaliar o efeito do tratamento lipossomal sobre a expressão do gene *IL-12*, foram calculados os valores de ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ e $\log_2 FC$ em relação ao grupo controle médio ($\Delta Ct = 12.9600$),.

A análise dos dados revelou que o tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ resultou em uma redução acentuada da expressão de *IL-12* ($\log_2\text{FC}$ médio = $-2,19$), ao passo que os grupos tratados com 93 $\mu\text{g/mL}$ e 187,6 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram aumento da expressão gênica com $\log_2\text{FC}$ médio de 1,19 e 1,66, respectivamente.

O teste de normalidade indicou que os dados seguiram distribuição normal ($p > 0,05$), exceto o grupo controle ($p = 0,047$), o que justifica a aplicação de testes não paramétricos. Então, pela análise de Kruskal–Wallis foi evidenciada diferença significativa entre os grupos ($H \approx 11,48$; $p \approx 0,0094$), o que foi confirmado pelo teste de Dunn e correção por FDR que mostrou que os grupos tratados com 50 $\mu\text{g/mL}$ diferiram significativamente dos grupos 93 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,010$) e 187,6 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,005$), entretanto a comparação entre os demais grupos não apresentou diferenças estatisticamente significativas (Gráfico 12).

Gráfico 12. Expressão relativa do gene *IL-12* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) em macrófagos tratados com a formulação lipossomal de fosfatidilserina/7-cetocolesterol (PS/7-KC) em diferentes concentrações, em comparação ao grupo controle (PS-50 $\mu\text{g/mL}$).



Os resultados sugerem que concentrações elevadas de 7-KC são capazes de aumentar a expressão de *IL-12* em macrófagos J774, o que indica uma polarização M1 associada a ativação imunológica contra tumores. Por outro lado, concentrações mais baixas como 50 µg/mL promoveram uma inibição significativa da expressão, indicando que o efeito imunomodulador dos lipossomas é dose-dependente e potencialmente bifásico.

Esse dado amostral corrobora diretamente com dados na literatura, onde a *IL-12* age como um regulador na ativação de vias pró-inflamatórias com estímulo de *IFN-γ* por células T e NK via sinalização *STAT4*. Segundo Hu, 2024 indução da via *IL-12/STAT4* esta associada ao aumento de citocinas inflamatórias como a *TNF-α*, *IL-6*, *IL-23* favorecendo a imunidade antitumoral (Hu *et al.*, 2024). De maneira semelhante, o acréscimo da expressão gênica da *IL-12*, observado nas maiores concentrações de 7-KC representa um mecanismo para reprogramação macrofágica, atuando como antagonista de vias com efeitos imunossupressor como é o caso da *IL-10/STAT3*.

Análogo a este estudo, as observações de Fu, 2017, indicaram que a *IL-6*, através da ativação de *STAT3*, induz diferenciação para macrófagos M2 com aumento de *IL-10* e *TGF-β* e redução de *IL-12*, apresentando um quadro pró-tumoral (Fu *et al.*, 2017). O aumento de *IL-12* com concentrações elevadas do tratamento com 7-KC pode ser visualizado como um mecanismo de ruptura dessa via *IL-6/STAT3*, favorecendo uma resposta antitumoral.

5.6 ANÁLISE GLOBAL

A aplicação de testes multivariados (MANOVA) demonstrou que os perfis de expressão gênica se diferem de forma significativa entre os quatro grupos de tratamentos (Wilks' Λ = 0,0047; Pillai's Trace = 2,1575; $p < 0,0001$ em todos os testes). Essas considerações indicam que os efeitos do tratamento com 7-KC são multigênicos e dose-dependentes, promovendo alterações nos genes avaliados neste trabalho.

Os genes *MCR* e *iNOS* apresentam maiores valores de F nos testes univariados ($F = 40,15$ e $F = 27,05$, respectivamente) revelando que esses dois genes são os principais responsáveis pela diferença observada entre os tratamentos. Por outro lado, quando é avaliado a expressão de *IL-12*, aponta-se uma variação significativa ($F = 11,21$; $p < 0,001$), em contrapartida *IL-10* apresentou padrão discreto ($F = 4,46$; $p = 0,018$)

Os dados evidenciados exibem sobre os efeitos bifásicos lipossomais dependentes da concentração. Por exemplo, em concentrações reduzidas como 50 µg/mL, observa-se uma supressão da expressão gênica, especialmente em *MCR* e *IL-12*, o que indica uma resposta

reguladora e uma resposta inflamatória. Quando é avaliada concentrações intermediárias, como 93 µg/mL, é evidenciada a inibição de *IL-10* e *MCR* com promoção da indução moderada de *IL-12*, sugerindo uma transição fenotípica e funcional nesse perfil.

Todavia, em concentrações elevadas como 187 µg/mL houve a promoção do aumento de expressão de *iNOS* e *IL-12*, indicando uma polarização voltada ao perfil M1, ou seja, associado a um perfil pró-inflamatório, com uso potencial em estratégias de imunoterapia anti tumoral. Nesse grupo também é evidenciada a inércia do gene *MCR*, reforçando a hipótese de desrepressão do fenótipo M1.

Experimentos demonstram que o aumento da expressão de *iNOS/NOS2* e a redução de *MRC1/CD206* são indicativos da polarização macrofágica M1 (Xie *et al.*, 2025). Condizendo com os dados do presente estudo onde os tratamentos contendo 7-KC em concentrações elevadas promovem o aumento expressivo de *iNOS* e manutenção de *MCR*, por outro lado, concentrações inferiores indicaram a supressão de *MCR*. Em ambos os casos, o estímulo não levou a uma polarização clássica completa, mas sim a um perfil de modulação seletiva, no qual o aumento de *iNOS* ocorre de forma dissociada de alterações amplas em outros marcadores. Tal fenômeno reforça a hipótese de que a ativação direcionada de vias pró-inflamatórias, mesmo que parcial, pode ser suficiente para induzir respostas imunes antitumorais relevantes (Gao *et al.*, 2025).

Em modelos experimentais foi observado redução do crescimento tumoral relacionada a redução da proporção de TAMs com perfil M2 sem alteração na concentração macrofágica M1, sugerindo uma inibição seletiva durante a polarização (Chen *et al.*, 2023b). De maneira semelhante, o tratamento PS/7-KC resultou em queda de *MCR* em concentrações de 50 e 93 µg/mL, sem aumento exacerbado de marcadores M1, mas com redução concomitante da produção de *IL-10*, indicando um mecanismo de diminuição seletiva de M2, consequentemente reduzindo a imunossupressão.

Os TAMs com fenótipo M2 são a principal fonte de *IL-10* no TME, exercendo efeito imunossupressor com inibição de *IL-12* pelas células dendríticas, reduzindo a ativação de linfócitos TCD8⁺ o que acaba limitando a atividade contra o tumor, adicionalmente, a expressão de *IL-12* é correlacionada com a melhora na resposta contra as terapias antineoplásicas (Ruffell *et al.*, 2014). Desse modo, a queda de *IL-10* acompanhada com aumento de *IL-12* sugere que os PS/7-KC atua aliviando a imunossupressão mediada por TAMs propiciando um ambiente pró-inflamatório e potencializando a ativação de células citotóxicas.

A formulação lipossomas de PS/7-KC induziu a polarização macrofágica para fenótipo M1, explorando o fenótipo imunomodulador a partir de efeito exógeno. Estratégias mais complexas, como por exemplo, o uso de vesículas extracelulares (VEs) derivadas de M1 fundidas com lipossomas SR780Fe (REV@SR780Fe@Lip) formando nanovesículas híbridas REV@SR780Fe@LEV apresentou modulação macrofágica com maior estabilidade (Guo *et al.*, 2024). Essa abordagem pode aprimorar a formulação proposta nesse trabalho, devido a simplicidade e viabilidade de escalonamento.

Em macrófagos J774, o 7-KC estimula a ativação de NADPH oxidase, promovendo uma explosão oxidativa com consequente geração de espécies reativas de oxigênio. Esse estresse oxidativo desencadeia a via apoptótica por meio da regulação positiva de p21 e ativação da caspase-3, resultando em morte celular programada (Biasi *et al.*, 2004). Já em células humanas U937, o 7-KC também está associado a disfunções mitocondriais, como perda do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), formação de vacúolos autofágicos, aumento de ânion superóxido e intensa peroxidação lipídica (Monier *et al.*, 2003). Além disso, atua como ativador do inflamassoma NLRP3, promovendo secreção exacerbada de *IL-1 β* e *IL-18* em diferentes modelos celulares (Yuan *et al.*, 2019).

Esses mecanismos indicam que a formulação contendo PS/7-KC pode agir em âmbito de modulação inflamatória como também imunológica, com isso abre-se espaço para aprimoramento, como por exemplo, a utilização de inibidores de YY1 ou *IL-6* poderia potencializar ainda mais o bloqueio da via *IL-6/STAT3* e favorecer a polarização M1 (Chen *et al.*, 2023). Outro ponto favorável é devido a flexibilidade da plataforma lipossomal, que permite ajustes diretos na composição como também o adjunto de acoplamento de tecnologias para a formação de lipossomas inteligentes, considerando mecanismos de fotossensibilização, magnetismo, ultrassom e eletromagnetismo (Wang *et al.*, 2023).

6 CONCLUSÃO

A metodologia empregada possibilitou a obtenção de vesículas lipídicas nanoestruturadas, fisicoquimicamente estáveis e adequadas para aplicações biológicas, com potencial para uso em imunoterapia antitumoral.

A formulação apresentou baixa citotoxicidade em concentrações baixas e intermediárias, indicando perfil adequado para ensaios *in vitro*. A análise de expressão gênica evidenciou um efeito dependente da concentração, com modulação do fenótipo macrófágico: concentrações reduzidas promoveram efeito regulador, enquanto concentrações intermediárias e elevadas induziram polarização parcial a predominante para o fenótipo M1.

Em suma, a formulação lipossomal apresentada é uma plataforma promissora para estratégias de imunoterapia antitumoral, direcionada à capacidade seletiva de polarização macrófágica aliada a simplicidade de manipulação e potencial para aprimoramento. Espera-se que este estudo inicial contribua para os avanços nanotecnologia imunoterapêutica aplicada ao câncer. Estudos futuros, especialmente em modelos *in vivo*, bem como a conjugação da formulação de PS/7-KC com sistemas de liberação controlada, poderão ampliar ainda mais seu potencial terapêutico e sua relevância clínica.

REFERÊNCIAS

ADES, Felipe; TRYFONIDIS, Konstantinos; ZARDAVAS, Dimitrios. The past and future of breast cancer treatment—from the papyrus to individualised treatment approaches. **ecancermedicalsecience**, v. 11, p. 746, 8 jun. 2017.

ANAND, Namrata; PEH, Keng Hee; KOLESAR, Jill M. Macrophage Repolarization as a Therapeutic Strategy for Osteosarcoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2858, jan. 2023.

ANDERSEN, Jens P. *et al.* P4-ATPases as Phospholipid Flippases—Structure, Function, and Enigmas. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 8 jul. 2016.

ANDERSON, Amelia *et al.* 7-Ketocholesterol in disease and aging. **Redox Biology**, v. 29, p. 101380, 1 jan. 2020.

ARSOV, Zoran; QUARONI, Luca. Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 150, n. 1, p. 35–48, 1 nov. 2007.

ASFIA, Shima; SEEMANN, Ralf; FLEURY, Jean-Baptiste. Phospholipids diffusion on the surface of model lipid droplets. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1865, n. 1, p. 184074, 1 jan. 2023.

AYEE, Manuela A. A.; LEVITAN, Irena. Lipoprotein-Induced Increases in Cholesterol and 7-Ketocholesterol Result in Opposite Molecular-Scale Biophysical Effects on Membrane Structure. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, p. 715932, 16 jul. 2021.

BAER, John M. *et al.* **Pancreas resident macrophage-induced fibrosis has divergent roles in pancreas inflammatory injury and PDAC.** *bioRxiv*, , 10 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.09.479745v1>>. Acesso em: 23 jun. 2025

BARONE, Antonella *et al.* Thermoresponsive M1 macrophage-derived hybrid nanovesicles for improved in vivo tumor targeting. **Drug delivery and translational research**, v. 13, n. 12, p. 3154–3168, dez. 2023.

BASAK, Udit *et al.* Tumor-associated macrophages: an effective player of the tumor microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 16 nov. 2023.

BEJARANO, Leire; JORDÃO, Marta J. C.; JOYCE, Johanna A. Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. **Cancer Discovery**, v. 11, n. 4, p. 933–959, 1 abr. 2021.

BENTO, Carolina Adriane *et al.* P2X7 receptor in macrophage polarization and its implications in neuroblastoma tumor behavior. **Purinergic Signalling**, v. 21, n. 1, p. 51–68, fev. 2025.

BHARGAVA, Purna *et al.* Selective Removal of 7-KC by a Novel Atherosclerosis Therapeutic Candidate Reverts Foam Cells to a Macrophage-like Phenotype. **bioRxiv**, p. 2023.10.23.563623, 25 out. 2023.

BIASI, Fiorella *et al.* Oxysterol mixtures prevent proapoptotic effects of 7- ketocholesterol in macrophages: implications for proatherogenic gene modulation. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 6, p. 693–695, 2004.

BIRKENFELD, Kyra R. *et al.* Cholesterol Conformational Structures in Phospholipid Membranes. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 128, n. 38, p. 8002–8008, 26 set. 2024.

BOADA-ROMERO, Emilio *et al.* The clearance of dead cells by efferocytosis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 398–414, jul. 2020.

BOUHLEL, M. Amine *et al.* PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 2, p. 137–143, 8 ago. 2007.

BOUTILIER, Ava J.; ELSAWA, Sherine F. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6995, 29 jun. 2021.

BOZZUTO, Giuseppina; MOLINARI, Agnese. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 975–999, 2 fev. 2015.

BRIUGLIA, Maria-Lucia *et al.* Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 5, n. 3, p. 231–242, 1 jun. 2015.

BROWN, Andrew J.; COATES, Hudson W.; SHARPE, Laura J. Chapter 10 - Cholesterol synthesis. *In*: RIDGWAY, Neale D.; MCLEOD, Roger S. (Orgs.). **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Seventh Edition)**. [S.l.]: Elsevier, 2021. p. 317–355.

CALLE, Priscila *et al.* CPT1a gene expression reverses the inflammatory and anti-phagocytic effect of 7-ketocholesterol in RAW264.7 macrophages. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, n. 1, p. 215, 10 dez. 2019.

CASSETTA, Luca; POLLARD, Jeffrey W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 12, p. 887–904, dez. 2018b.

CHEN, Min-Min *et al.* Polarization of Tissue-Resident TFH-Like Cells in Human Hepatoma Bridges Innate Monocyte Inflammation and M2b Macrophage Polarization. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 10, p. 1182–1195, 2 out. 2016.

CHEN, Saisai *et al.* YY1 complex in M2 macrophage promotes prostate cancer progression by upregulating IL-6. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 11, n. 4, abr. 2023a.

CHEN, Shanze *et al.* Macrophages in immunoregulation and therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 207, 22 maio 2023c.

CHEN, Siyuan *et al.* JMJD6 in tumor-associated macrophage regulates macrophage polarization and cancer progression via STAT3/IL-10 axis. **Oncogene**, v. 42, n. 37, p. 2737–2750, 2023b.

CHEN, Steven T. *et al.* A shift in lung macrophage composition is associated with COVID-19 severity and recovery. **Science Translational Medicine**, v. 14, n. 662, p. eabn5168, 14 set. 2022.

CHOI, Chloe; FINLAY, David K. Diverse Immunoregulatory Roles of Oxysterols—The Oxidized Cholesterol Metabolites. **Metabolites**, v. 10, n. 10, p. 384, out. 2020.

CHRISTOFIDES, Anthos *et al.* The complex role of tumor-infiltrating macrophages. **Nature Immunology**, v. 23, n. 8, p. 1148–1156, ago. 2022.

CHUN, Ji-Yeon *et al.* Formation and stability of multiple-layered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 249–257, 1 jan. 2013.

CHUNG, Jeeyun *et al.* PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER–plasma membrane contacts. **Science**, v. 349, n. 6246, p. 428–432, 24 jul. 2015.

COHEN, Merav *et al.* Lung Single-Cell Signaling Interaction Map Reveals Basophil Role in Macrophage Imprinting. **Cell**, v. 175, n. 4, p. 1031–1044.e18, 1 nov. 2018.

ČOPIČ, Alenka; DIEUDONNÉ, Thibaud; LENOIR, Guillaume. Phosphatidylserine transport in cell life and death. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 83, p. 102192, 1 ago. 2023.

CUI, Ang *et al.* Dictionary of immune responses to cytokines at single-cell resolution. **Nature**, v. 625, n. 7994, p. 377–384, jan. 2024.

D'AMICO, Alexandra M.; VASQUEZ, Karen M. The Multifaceted Roles of DNA Repair and Replication Proteins in Aging and Obesity. **DNA repair**, v. 99, p. 103049, mar. 2021.

DAGHER, Rania *et al.* IL-33-ST2 axis regulates myeloid cell differentiation and activation enabling effective club cell regeneration. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 4786, 22 set. 2020.

DENARDO, David G.; RUFFELL, Brian. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 6, p. 369–382, jun. 2019.

DENG, Chuanling *et al.* Cholesterol Oxidation Products: Potential Adverse Effect and Prevention of Their Production in Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 48, p. 18645–18659, 6 dez. 2023.

DIXON, Karen O. *et al.* TIM-3 restrains anti-tumour immunity by regulating inflammasome activation. **Nature**, v. 595, n. 7865, p. 101–106, jul. 2021.

DOOLE, Fathima T. *et al.* Cholesterol Stiffening of Lipid Membranes. **The Journal of Membrane Biology**, v. 255, n. 4, p. 385–405, 1 out. 2022.

DOU, Tianyi *et al.* Solid-to-Liposome Conformational Transition of Phosphatidylcholine and Phosphatidylserine Probed by Atomic Force Microscopy, Infrared Spectroscopy, and Density Functional Theory Calculations. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 38, p. 13243–13249, 27 set. 2022.

DOUGAN, Michael; DRANOFF, Glenn; DOUGAN, Stephanie K. Cancer Immunotherapy: Beyond Checkpoint Blockade. **Annual review of cancer biology**, v. 3, p. 55–75, mar. 2019.

ENGELN, Suzanne E. *et al.* Therapeutic strategies targeting inflammation and immunity in atherosclerosis: how to proceed? **Nature Reviews Cardiology**, v. 19, n. 8, p. 522–542, ago. 2022.

ESPARZA-BAQUER, Aitor *et al.* TREM-2 defends the liver against hepatocellular carcinoma through multifactorial protective mechanisms. **Gut**, v. 70, n. 7, p. 1345–1361, jul. 2021.

FENG, Mingye *et al.* Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 10, p. 568–586, out. 2019.

FU, Xiao-Long *et al.* Interleukin 6 induces M2 macrophage differentiation by STAT3 activation that correlates with gastric cancer progression. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 66, n. 12, p. 1597–1608, 1 dez. 2017.

GAO, Ruoqi *et al.* Perfluorohexane Emulsions Induce Macrophage-Stimulating Effects through iNOS Expression. **ACS Applied Bio Materials**, v. 8, n. 5, p. 4046–4054, 19 maio 2025.

GHEBREMEDHIN, Anghesom *et al.* Tumor-Associated Macrophages as Major Immunosuppressive Cells in the Tumor Microenvironment. **Cancers**, v. 16, n. 19, p. 3410, jan. 2024.

GHZAIEL, Imen *et al.* 7-Ketocholesterol: Effects on viral infections and hypothetical contribution in COVID-19. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 212, p. 105939, 1 set. 2021.

GHZAIEL, Imen *et al.* Sources of 7-ketocholesterol, metabolism and inactivation strategies: food and biomedical applications. 1 jul. 2022.

GORDON, Siamon. Phagocytosis: The Legacy of Metchnikoff. **Cell**, v. 166, n. 5, p. 1065–1068, 25 ago. 2016.

GORDON, Sydney R. *et al.* PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. **Nature**, v. 545, n. 7655, p. 495–499, maio 2017.

GRIFFITHS, William J. *et al.* The Cerebrospinal Fluid Profile of Cholesterol Metabolites in Parkinson's Disease and Their Association With Disease State and Clinical Features. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 13, 30 ago. 2021.

GUAN, Fan *et al.* Tissue macrophages: origin, heterogeneity, biological functions, diseases and therapeutic targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 10, n. 1, p. 93, 7 mar. 2025.

GUILLEMOT-LEGRIS, Owein; MUCCIOLI, Giulio G. The oxysterome and its receptors as pharmacological targets in inflammatory diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 21, p. 4917–4940, 2022.

GUO, Yawen *et al.* Acidity-activatable dynamic hybrid nanoplateforms derived from extracellular vesicles of M1 macrophages enhance cancer immunotherapy through synergistic triple immunotherapy. **Journal of nanobiotechnology**, v. 22, n. 1, p. 430, 20 jul. 2024.

HAN, Shulan *et al.* d-lactate modulates M2 tumor-associated macrophages and remodels immunosuppressive tumor microenvironment for hepatocellular carcinoma. **Science Advances**, v. 9, n. 29, p. eadg2697, 19 jul. 2023.

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

HAREL-ADAR, Tamar *et al.* Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 5, p. 1827, 18 jan. 2011.

HIRAYAMA, Daisuke; IIDA, Tomoya; NAKASE, Hiroshi. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 92, 29 dez. 2017.

HOLDER, Gerard E. *et al.* Expression of the Mannose Receptor CD206 in HIV and SIV Encephalitis: A Phenotypic Switch of Brain Perivascular Macrophages with Virus Infection. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 9, n. 5, p. 716–726, 1 dez. 2014.

HU, Yuzhu *et al.* Tumor-Microenvironment-Activatable Nanoparticle Mediating Immunogene Therapy and M2 Macrophage-Targeted Inhibitor for Synergistic Cancer Immunotherapy. **ACS nano**, v. 18, n. 4, p. 3295–3312, 30 jan. 2024.

HUANG, Binlu; SONG, Bao-liang; XU, Chenqi. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 2, p. 132–141, fev. 2020.

Ji, Yu *et al.* The epigenetic hallmarks of immune cells in cancer. **Molecular Cancer**, v. 24, n. 1, p. 66, 5 mar. 2025.

JIN, Xiaohan *et al.* Lactate-mediated metabolic reprogramming of tumor-associated macrophages: implications for tumor progression and therapeutic potential. **Frontiers in Immunology**, v. 16, p. 1573039, 13 maio 2025.

JOVANOVIĆ, Aleksandra A. *et al.* Comparative Effects of Cholesterol and β -Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 120, n. 9, p. 1800039, 2018.

KANG, Sujin *et al.* Semaphorin 6D reverse signaling controls macrophage lipid metabolism and anti-inflammatory polarization. **Nature Immunology**, v. 19, n. 6, p. 561–570, jun. 2018.

KASHYAP, Dharambir; GARG, Vivek Kumar; GOEL, Neelam. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 125, p. 73–120, 2021.

KATZENELNBOGEN, Yonatan *et al.* Coupled scRNA-Seq and Intracellular Protein Activity Reveal an Immunosuppressive Role of TREM2 in Cancer. **Cell**, v. 182, n. 4, p. 872- 885.e19, 20 ago. 2020.

KAY, Jason G.; FAIRN, Gregory D. Distribution, dynamics and functional roles of phosphatidylserine within the cell. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 126, 15 out. 2019.

KERNEUR, Clément; CANO, Carla E.; OLIVE, Daniel. Major pathways involved in macrophage polarization in cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 17 out. 2022.

KHAN, Safir Ullah *et al.* Reprogramming tumor-associated macrophages as a unique approach to target tumor immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 17 abr. 2023.

KOBIERSKI, Jan *et al.* Predicting the packing parameter for lipids in monolayers with the use of molecular dynamics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 211, p. 112298, 1 mar. 2022.

LEADER, Andrew M. *et al.* Single-cell analysis of human non-small cell lung cancer lesions refines tumor classification and patient stratification. **Cancer Cell**, v. 39, n. 12, p. 1594-1609.e12, 13 dez. 2021.

LEE, Dennis S. W.; ROJAS, Olga L.; GOMMERMAN, Jennifer L. B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 179–199, mar. 2021.

LEMKE, Greg. How macrophages deal with death. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 9, p. 539–549, set. 2019.

LI, Chunxiao *et al.* Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 9, n. 1, p. e001341, 26 jan. 2021.

LI, Danyang; WU, Minghua. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 291, 4 ago. 2021.

LI, Mengyuan *et al.* Metabolism, metabolites, and macrophages in cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 16, n. 1, p. 80, 25 jul. 2023.

LIN, Danni; SHEN, Yinan; LIANG, Tingbo. Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 156, 11 abr. 2023.

LIN, Heng *et al.* Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 2, p. 805–815, 28 fev. 2018.

LIU, Baoying *et al.* CD14⁺⁺CD16⁺ Monocytes Are Enriched by Glucocorticoid Treatment and Are Functionally Attenuated in Driving Effector T Cell Responses. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 194, n. 11, p. 5150–5160, 1 jun. 2015.

LIU, Der-Zen *et al.* Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 172, n. 1, p. 57–67, 25 out. 2000.

LIU, Yan *et al.* Dietary cholesterol oxidation products: Perspectives linking food processing and storage with health implications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 21, n. 1, p. 738–779, 2022.

LOSSI, Laura. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. **The Biochemical Journal**, v. 479, n. 3, p. 357–384, 11 fev. 2022.

LUO, Jie; WANG, Jin-Kai; SONG, Bao-Liang. Lowering low-density lipoprotein cholesterol: from mechanisms to therapies. **Life Metabolism**, v. 1, n. 1, p. 25–38, 20 maio 2022.

LUO, Jie; YANG, Hongyuan; SONG, Bao-Liang. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 225–245, abr. 2020.

LUO, Xukai *et al.* Blocking CD47-SIRP α Signal Axis as Promising Immunotherapy in Ovarian Cancer. **Cancer Control**, v. 30, p. 10732748231159706, 1 jan. 2023.

LUQUAIN-COSTAZ, Celine; DELTON, Isabelle. Oxysterols in Vascular Cells and Role in Atherosclerosis. *In: [S.l.: S.n.].* v. 1440 p. 213–229.

MA, Hong Mei; WU, Zhou; NAKANISHI, Hiroshi. Phosphatidylserine-containing liposomes suppress inflammatory bone loss by ameliorating the cytokine imbalance provoked by infiltrated macrophages. **Laboratory Investigation**, v. 91, n. 6, p. 921–931, 1 jun. 2011.

MA, Ruo-Yu *et al.* Monocyte-derived macrophages promote breast cancer bone metastasis outgrowth. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 11, p. e20191820, 2 nov. 2020.

MA, Xiaohua *et al.* Phosphatidylserine, inflammation, and central nervous system diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, 3 ago. 2022a.

MA, Xiaohua *et al.* Phosphatidylserine, inflammation, and central nervous system diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, p. 975176, 3 ago. 2022b.

MANTOVANI, Alberto *et al.* Tumor-associated myeloid cells: diversity and therapeutic targeting. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 18, n. 3, p. 566–578, mar. 2021.

MARTEMUCCI, Giovanni *et al.* Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. **Oxygen**, v. 2, n. 2, p. 48–78, jun. 2022.

MARTÍ I LÍNDEZ, Adrià-Arnau; REITH, Walter. Arginine-dependent immune responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 13, p. 5303–5324, 1 jul. 2021.

MARUOKA, Masahiro *et al.* Caspase cleavage releases a nuclear protein fragment that stimulates phospholipid scrambling at the plasma membrane. **Molecular Cell**, v. 81, n. 7, p. 1397–1410.e9, 1 abr. 2021.

MAZEIN, Alexander *et al.* A comprehensive machine-readable view of the mammalian cholesterol biosynthesis pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 1, p. 56–66, 1 jul. 2013.

MEHROTRA, Parul; RAVICHANDRAN, Kodi S. Drugging the efferocytosis process: concepts and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 8, p. 601–620, ago. 2022.

MELNIC MELNIC, Daniela. Microambiente en mieloma múltiple. Papel de las células madre mesenquimales en la progresión del tumor. 25 maio 2023.

MOHD YASIN, Zahidah Nasuha *et al.* Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. **Differentiation**, v. 128, p. 67–82, 1 nov. 2022.

MONIER, Serge *et al.* Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 3, p. 814–824, 11 abr. 2003.

MORIOKA, Sho; MAUERÖDER, Christian; RAVICHANDRAN, Kodi S. Living on the edge: Efferocytosis at the interface of homeostasis and pathology. **Immunity**, v. 50, n. 5, p. 1149, 21 maio 2019.

MOSER VON FILSECK, Joachim *et al.* Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. **Science**, v. 349, n. 6246, p. 432–436, 24 jul. 2015.

MÜNCH, Judith *et al.* Enzymatic Hydroxylations of sp³-Carbons. **ACS Catalysis**, v. 11, n. 15, p. 9168–9203, 6 ago. 2021.

MURRAY, Peter J. Macrophage Polarization. **Annual Review of Physiology**, v. 79, n. Volume 79, 2017, p. 541–566, 10 fev. 2017.

NICOLSON, Garth L. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Membrane Structure and Function: Relevance in the Cell's Physiology, Pathology and Therapy. v. 1838, n. 6, p. 1451–1466, 1 jun. 2014.

NSAIRAT, Hamdi *et al.* Liposome bilayer stability: emphasis on cholesterol and its alternatives. **Journal of Liposome Research**, v. 34, n. 1, p. 178–202, 2 jan. 2024.

NWOSU, Natasha. Cancer: A Disease of Modern Times? **Cureus**, v. 16, n. 11, p. e74666, 2024.

OBEID, Elias *et al.* The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 1, p. 5–12, jul. 2013.

OCHANDO, Jordi *et al.* Trained immunity — basic concepts and contributions to immunopathology. **Nature Reviews Nephrology**, v. 19, n. 1, p. 23–37, jan. 2023.

OKAYAMA, Ayumi *et al.* Comparison of structural effects of cholesterol, lanosterol, and oxysterol on phospholipid (POPC) bilayers. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 259, p. 105376, 1 mar. 2024.

ORECCHIONI, Marco *et al.* Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 24 maio 2019.

OYARCE, Cesar *et al.* Re-polarization of immunosuppressive macrophages to tumor-cytotoxic macrophages by repurposed metabolic drugs. **Oncoimmunology**, v. 10, n. 1, p. 1898753, 2021.

ÖZTÜRK, Kıvılcım; KAPLAN, Meryem; ÇALIŞ, Sema. Effects of nanoparticle size, shape, and zeta potential on drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 666, p. 124799, 5 dez. 2024.

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

PARK, Matthew D. *et al.* Macrophages in health and disease. **Cell**, v. 185, n. 23, p. 4259–4279, 10 nov. 2022.

PEREIRA, Camila A. *et al.* Mitochondrial DNA Promotes NLRP3 Inflammasome Activation and Contributes to Endothelial Dysfunction and Inflammation in Type 1 Diabetes. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1557, 2019.

RAMOS, G. C. *et al.* Apoptotic mimicry: phosphatidylserine liposomes reduce inflammation through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in vivo. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 6, p. 844, 29 maio 2007.

RAVI, Sangeetha *et al.* An insight on 7- ketocholesterol mediated inflammation in atherosclerosis and potential therapeutics. **Steroids**, v. 172, p. 108854, 1 ago. 2021.

REZA MOZAFARI, M. *et al.* Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, v. 18, n. 4, p. 309–327, 1 jan. 2008.

ROBERTS, Allison W. *et al.* Tissue-Resident Macrophages Are Locally Programmed for Silent Clearance of Apoptotic Cells. **Immunity**, v. 47, n. 5, p. 913- 927.e6, 21 nov. 2017.

ROBINSON, Amy *et al.* Monocyte Regulation in Homeostasis and Malignancy. **Trends in Immunology**, v. 42, n. 2, p. 104–119, 1 fev. 2021.

RÓSZER, Tamás. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 816460, 2015.

RUFFELL, Brian *et al.* Macrophage IL-10 Blocks CD8⁺ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. **Cancer Cell**, v. 26, n. 5, p. 623–637, 10 nov. 2014.

SAKAI, Tatsuo; MORIMOTO, Yuh. The History of Infectious Diseases and Medicine. **Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1147, 4 out. 2022.

SALMANINEJAD, Arash *et al.* Tumor-associated macrophages: role in cancer development and therapeutic implications. **Cellular Oncology**, v. 42, n. 5, p. 591–608, 1 out. 2019.

SATOSHI, Watanabe *et al.* Resetting proteostasis with ISRIB promotes epithelial differentiation to attenuate pulmonary fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 20, maio 2021.

SEGAWA, Katsumori; NAGATA, Shigekazu. An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 11, p. 639–650, 1 nov. 2015.

SEGAWA, Katsumori; NAGATA, Shigekazu. An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 11, p. 639–650, 1 nov. 2015.

SHAO, Lan *et al.* SENP1-mediated NEMO deSUMOylation in adipocytes limits inflammatory responses and type-1 diabetes progression. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 8917, 24 nov. 2015.

SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425–6440, set. 2018.

SHARMA, Bhupender; KANWAR, Shamsheer S. Phosphatidylserine: A cancer cell targeting biomarker. **Seminars in Cancer Biology**, v. 52, n. Pt 1, p. 17–25, out. 2018.

SHLOMOVITZ, Inbar; SPEIR, Mary; GERLIC, Motti. Flipping the dogma – phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 139, 29 out. 2019.

STRAUB, Monique S. *et al.* Cryo-EM structures of the caspase-activated protein XKR9 involved in apoptotic lipid scrambling. **eLife**, v. 10, p. e69800, 2021.

STRIZOVA, Zuzana *et al.* M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? **Clinical Science**, v. 137, n. 15, p. 1067–1093, 2 ago. 2023.

SUZUKI, Jun *et al.* Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. **Nature**, v. 468, n. 7325, p. 834–838, dez. 2010.

SUZUKI, Jun *et al.* Xk-Related Protein 8 and CED-8 Promote Phosphatidylserine Exposure in Apoptotic Cells. **Science**, v. 341, n. 6144, p. 403–406, 26 jul. 2013.

TANI, Mariko *et al.* 7-Ketocholesterol enhances leukocyte adhesion to endothelial cells via p38MAPK pathway. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200499, 31 jul. 2018.

TESTA, Gabriella *et al.* Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases. **Biochimie**, “Current trends in oxysterols and related sterols”. v. 153, p. 220–231, 1 out. 2018.

UCHIKAWA, Tomoki *et al.* Dietary 7-ketocholesterol exacerbates myocardial ischemia–reperfusion injury in mice through monocyte/macrophage-mediated inflammation. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 14902, 1 set. 2022.

UDERHARDT, Stefan *et al.* Resident Macrophages Cloak Tissue Microlesions to Prevent Neutrophil-Driven Inflammatory Damage. **Cell**, v. 177, n. 3, p. 541–555.e17, 18 abr. 2019.

VEGLIA, Filippo; SANSEVIERO, Emilio; GABRILOVICH, Dmitry I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 21, n. 8, p. 485–498, ago. 2021.

VERGADI, Eleni *et al.* Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 3, p. 1006–1014, 1 fev. 2017.

VITALE, Ilio *et al.* Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. **Cell Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 36–50, 2 jul. 2019.

VLERKEN-YSLA, Lilian van *et al.* Functional states of myeloid cells in cancer. **Cancer Cell**, v. 41, n. 3, p. 490–504, 13 mar. 2023.

WANG, Fan *et al.* Silencing BMAL1 promotes M1/M2 polarization through the LDHA/lactate axis to promote GBM sensitivity to bevacizumab. **International Immunopharmacology**, v. 134, p. 112187, 15 jun. 2024.

WANG, Ji *et al.* Enhancement of Anti-Inflammatory Activity of Curcumin Using Phosphatidylserine-Containing Nanoparticles in Cultured Macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 969, jun. 2016.

WANG, Ming-Yan *et al.* MHC class II of different non-professional antigen-presenting cells mediate multiple effects of crosstalk with CD4⁺T cells in lung diseases. **Frontiers in Medicine**, v. 12, 17 jan. 2025.

WANG, Shile *et al.* Liposomes for Tumor Targeted Therapy: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2643, 31 jan. 2023.

WANG, Yabin *et al.* Optical/MRI dual-modality imaging of M1 macrophage polarization in atherosclerotic plaque with MARCO-targeted upconversion luminescence probe. **Biomaterials**, v. 219, p. 119378, 1 out. 2019.

WU, Jun. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 8, p. 771, 6 ago. 2021.

XIAO, Dandan; CHANG, Wenguang. Phosphatidylserine in Diabetes Research. **Molecular Pharmaceutics**, v. 20, n. 1, p. 82–89, 2 jan. 2023.

XIE, Fei *et al.* Macrophage TRIM21 knockout inhibits septic acute lung injury by downregulating autophagy regulator protein ubiquitination. **Autophagy**, v. 0, n. 0, p. 1–20, 24 jun. 2025.

XU, Maosen *et al.* Targeting the tumor stroma for cancer therapy. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, p. 208, 2 nov. 2022.

YAN, Lingfeng *et al.* Macrophage plasticity: signaling pathways, tissue repair, and regeneration. **MedComm**, v. 5, n. 8, p. e658, 2024.

YUAN, Xinxu *et al.* Reversal of Endothelial Exosomes-induced Smooth Muscle Phenotype Transition by 7- ketocholesterol Stimulation: Role of NLRP3 Inflammasome Activation. **The FASEB Journal**, v. 33, n. S1, p. 527.21-527.21, 2019.

YUNNA, Chen *et al.* Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, p. 173090, 15 jun. 2020.

ZHANG, Li *et al.* Interaction of DPPC liposomes with cholesterol and food protein during in vitro digestion using Dynamic Light Scattering and FTIR spectroscopy analysis. **Food Chemistry**, v. 375, p. 131893, 1 maio 2022.

ZHANG, Yang *et al.* TMEM16F phospholipid scramblase mediates trophoblast fusion and placental development. **Science Advances**, v. 6, n. 19, p. eaba0310, 6 maio 2020.

ZHENG, Chunxiong *et al.* Anti-phagocytosis-blocking repolarization-resistant membrane-fusogenic liposome (ARMFUL) for adoptive cell immunotherapy. **Science advances**, v. 9, n. 32, p. eadh2413, 9 ago. 2023.