

UNIVERSIDADE PAULISTA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO
DA CICLOFOSFAMIDA NO DESENVOLVIMENTO DO
MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia Ambiental e
Experimental da Universidade Paulista –
UNIP, para a obtenção do título de Mestre
em Patologia Ambiental e Experimental.

THIAGO ALBUQUERQUE VIRAÇÃO

SÃO PAULO

2018

UNIVERSIDADE PAULISTA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO
DA CICLOFOSFAMIDA NO DESENVOLVIMENTO DO
MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Prof.^a Dra. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado.

THIAGO ALBUQUERQUE VIRAÇÃO

SÃO PAULO
2018

Viração, Thiago Albuquerque.

Avaliação *in vivo* do efeito da ciclofosfamida no desenvolvimento do melanoma murinho / Thiago Albuquerque Viração. - 2018.

47 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Biologia da Diferenciação e Transformação Celular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Cristina Pérez Hurtado.

1. Câncer. 2. Melanoma. 3. Ciclofosfamida. I. Pérez Hurtado, Elizabeth Cristina (orientadora). II. Título.

THIAGO ALBUQUERQUE VIRAÇÃO

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO
DA CICLOFOSFAMIDA NO DESENVOLVIMENTO DO
MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____
Prof.^a Dra. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____
Prof.^a Dra. Maria Anete Lallo
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____
Prof.^a Dra. Silvia Regina Kleeb
Universidade Metodista de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por todas as conquistas e por me abençoar nesta fase que foi de muito trabalho e aprendizado.

Agradeço aos meus pais, Filisberto e Giseuda, por todo o apoio e incentivo nesta etapa.

À minha noiva e parceira Ana, pelo apoio e companhia. Obrigado pela compreensão e por todo o incentivo na realização dos meus sonhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, pela oportunidade da realização do curso de mestrado, assim como aos professores, por todo o conhecimento proporcionado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP) pela bolsa recebida.

À minha orientadora Profa. Dra. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado, por toda sua dedicação em suas orientações na elaboração deste trabalho, por todo o aprendizado a cada dia e pelo apoio e incentivo. Muito obrigado pela colaboração, paciência e dedicação.

À Profa. Dra. Maria Anete Lallo, pela colaboração no desenvolvimento e delineamento deste trabalho. Sem sua participação não seria possível.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Xavier e ao Prof. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha pela colaboração e ensinamentos, fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Fabiana Toshie de Camargo Konno e à Dra. Anuska Marcelino Alvares Saraiva pela colaboração.

Aos funcionários do laboratório Suzana Maria Bezerra, Cleide Marques da Silva Santana, pelo auxílio recebido ao longo da pós-graduação.

Sou grato também pelas amizades que a pós-graduação me proporcionou, Débora de Oliveira Mares Silvestro, José Renildo de Carvalho, Jefferson de Souza, Juan Justino de Araújo Neves. Obrigado pela companhia, apoio e ajuda a cada dia.

RESUMO

A ciclofosfamida (CPA) é um quimioterápico antineoplásico que possui efeitos secundários em componentes do sistema imunológico. Devido sua ação imunomoduladora, capaz de influenciar respostas imunidade humoral e imunidade mediada por células, este fármaco é também prescrito para tratamento de doenças autoimunes. Sua utilização por longos períodos de tempo no tratamento destas doenças já foi correlacionado com o aumento de risco para desenvolvimento de câncer de pele não melanoma, porém este aumento ainda não foi associado ao melanoma. A capacidade de modular a resposta imunológica pode também favorecer ou inibir o desenvolvimento de tumores. No melanoma, estudos demonstraram que a CPA pode favorecer uma resposta antitumoral, no entanto, não há relatos sobre a influência deste fármaco no desenvolvimento da doença quando utilizada anterior ao seu desenvolvimento. Considerando os efeitos controversos da CPA no desenvolvimento de tumores, o intuito deste trabalho foi avaliar os efeitos do pré-tratamento com CPA sob o crescimento e progressão do melanoma murino, abordando tanto os mecanismos celulares, como moleculares. Para isto, camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com CPA e, posteriormente, inoculados com células B16F10 na região subcutânea do dorso. Resultados obtidos no presente estudo e apresentados em formato de artigo que será submetido à revista *Journal of Immunology Research*, sugerem que tratamento com CPA reduz população de neutrófilos e macrófagos no microambiente tumoral, o que pode ser um dos mecanismos pelos quais o tratamento com CPA reduz MMP-9 e consequentemente reduz o crescimento e progressão do melanoma, melhorando a sobrevida destes animais.

Palavras-chave: CPA, doenças autoimunes, câncer de pele, melanoma, metástases, MMP-9, IL-10, T CD4⁺

ABSTRACT

Cyclophosphamide (CPA) is an antineoplastic chemotherapeutic that has an effect on the immune system. Due to its immunomodulatory action, capable of influencing humoral immunity responses and cell mediated immunity, this drug is also prescribed for the treatment of autoimmune diseases. Its use for long periods of time in the treatment of these diseases has already been correlated with the increased chances for development of non-melanoma skin cancer, however this increase was not associated with melanoma. The ability to modulate the immune response may also favor or inhibit the development of tumors. In melanoma, studies have shown that CPA may favor an antitumor response, however, there are no reports on the influence of this drug on the development of the disease when used prior to its development. Considering the controversial effects of CPA on tumor development, the aim of this study was to evaluate the effects of pre-treatment with CPA under the growth and progression of murine melanoma, addressing both cellular and molecular mechanisms. For this, C57BL/6 mice were pre-treated with the drug and subsequently inoculated with B16F10 cells in the subcutaneous region of the dorsum. Results obtained in the present study and presented in an article format that will be submitted to the Journal of Immunology Research, suggest that CPA treatment reduces the neutrophil and macrophage population in the tumor microenvironment which may be one of the mechanisms by which CPA treatment reduces MMP-9 and consequently reduces the growth and progression of melanoma, improving the survival of these animals.

Keywords: CPA, autoimmune diseases, skin cancer, melanoma, metastases, MMP-9, IL-10, T CD4⁺

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	9
REFERÊNCIAS.....	11
2. ARTIGO	15
2.1. Introdução	16
2.2. Materiais e Métodos	17
2.2.1. Animais.....	17
2.2.2. Tratamento com CPA	17
2.2.3. Cultura de células B16F10.....	18
2.2.4. Desafio tumoral.....	18
2.2.5. Ensaio de sobrevida.	18
2.2.6. Volume tumoral.	18
2.2.7. Análises histopatológicas.	19
2.2.8. Análises de populações celulares por Citometria de Fluxo.....	19
2.2.9. Produção de lisado tumoral.....	20
2.2.10. Análises de citocinas por citometria de fluxo	20
2.2.11. Dosagem de proteínas.	20
2.2.12. Zimografia.....	21
2.2.13. Análise Estatística.....	22
2.3. Resultados	23
2.3.1. O tratamento com CPA melhora sobrevida de animais desafiados com células B16F10 e diminui crescimento tumoral.....	23
2.3.2. Redução da invasividade em tecidos adjacentes ao tumor é observada em animais tratados com CPA	25
2.3.3. Maior evidência de degeneração vacuolar de hepatócitos e redução de celularidade no baço em animais tratados com CPA.	27
2.3.4. Redução de infiltrado leucocitário no tumor acompanhado de diminuição na população total de linfócitos no baço, peritônio e sangue é observada em animais tratados com CPA	28
2.3.5. Animais tratados com CPA apresentam maior percentual de linfócitos T CD4 ⁺ no timo, linfonodo, peritônio e sangue.....	30
2.3.6. O tratamento com CPA aumenta níveis de IL-10 no microambiente tumoral.	32
2.3.7. CPA induz redução das populações de neutrófilos e macrófagos no microambiente tumoral..	33
2.3.8. Tratamento com CPA reduz significativamente os níveis séricos de MMP-9 em animais com melanoma	35

2.4. Discussão.....	37
2.5 Conclusões.....	41
2.6 Material Suplementar	42
2.7 Referências	43
ANEXO A – Certificado de aprovação CEUA	47

1. INTRODUÇÃO

Segundo classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), câncer, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias crônicas e diabetes fazem parte das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs), que são as principais causas de mortes no mundo, responsáveis por 41 milhões de óbitos a cada ano (1). Dentro deste grupo, o câncer é a segunda maior causa de morte, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. Segundo dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*) são esperados mais de 18 milhões de novos casos de câncer em 2018, com mais de 9 milhões de mortes causadas pela doença (2).

O câncer é definido genericamente como um conjunto de doenças cujas características principais são alterações no DNA que causam perda do controle da proliferação celular, formando os tumores. Este crescimento desordenado de células pode por sua vez, invadir e colonizar tecidos adjacentes ou distantes do local de origem formando tumores secundários ou metástases, que estão associados ao prognóstico ruim da doença (3, 4). Entre os tipos de neoplasias, o câncer de pele é o mais frequente na população mundial e seu desenvolvimento é devido principalmente a exposições excessivas e desprotegidas ao sol (6, 5). Os cânceres de pele são classificados em dois tipos principais: o câncer de pele não melanoma e o melanoma. O melanoma se origina nos melanócitos, células produtoras de melanina, responsável pela pigmentação e proteção da pele contra danos causados pela radiação ultravioleta (7). O melanoma é o mais agressivo entre os cânceres de pele devido sua maior capacidade de formar metástases e ser resistente à maioria das terapias (8).

Metástase é um processo complexo, no qual células tumorais podem invadir e colonizar tecidos adjacentes ou distantes do tumor primário, através da degradação da matriz extracelular e deslocamento de células tumorais através da circulação sanguínea e linfática (3). Muitas destas alterações ocorrem por interações das células tumorais com os componentes celulares ou moleculares do local onde o tumor se desenvolve, conhecido como microambiente tumoral (9).

O microambiente tumoral é composto, além das células tumorais, por fibroblastos, células endoteliais e do sistema imunológico (9-11). Dentre as células do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral estão macrófagos,

neutrófilos, linfócitos T e B, células *natural killer* (NK) e células NKT (12). Além dos componentes celulares, fatores solúveis como citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e metaloproteases de matriz (MMPs) também medeiam comunicação e movimentação celular que influenciam consequentemente no comportamento destas células tumorais (9, 13, 14, 15). Alguns destes componentes podem ser funcionalmente plásticos, podendo tanto favorecer como inibir o crescimento e progressão do tumor na dependência de sinais do ambiente onde se encontram inseridos (16, 17).

Neste contexto, estudos mostraram que o tratamento com ciclofosfamida pode tornar um ambiente favorável ao desenvolvimento de metástases (18). A ciclofosfamida (CPA) é um alquilante antineoplásico, sintetizada a partir da mostarda nitrogenada e inicialmente produzida para ter seletividade em células neoplásicas, entretanto, possui efeitos imunomoduladores secundários que podem favorecer ou inibir a progressão de tumores (19).

Estudos *in vitro* e em modelos animais mostraram que o tratamento com CPA pode aumentar as chances de desenvolver metástases (20 - 23). De acordo com Wu e colaboradores (2009), dentre os mecanismos que podem contribuir para este efeito são a imunomodulação e aumento da vascularização do tumor (18). Em contraste, outros autores demonstraram que a CPA pode favorecer respostas antitumorais por reduzir o número de células T reguladoras (Treg) e aumentar respostas de células T antígeno-específicas (24 - 26).

Devido a sua propriedade imunossupressora e imunomoduladora, capaz de alterar respostas da imunidade humoral e imunidade mediada por células, a CPA é também prescrita para tratamento de doenças autoimunes, tais como manifestações graves de lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica e vasculites autoimunes (19, 27, 28). As doses de CPA prescritas para tratamento de doenças autoimunes normalmente são inferiores às utilizadas na terapia antineoplásica. Entretanto, frequentemente estas doses são utilizadas de forma continua, por longos períodos de tempo, o que leva na maioria dos casos aos efeitos colaterais que incluem toxicidade hepática e renal e aumento no risco de desenvolver alguns tipos de câncer (19, 29). Este maior risco de desenvolvimento de neoplasias associa-se com a diminuição de respostas efetoras do sistema imunológico, que podem facilitar a sobrevivência e proliferação das células neoplásicas (30).

O uso prolongado de CPA no tratamento de doenças autoimunes já foi correlacionado com aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento de câncer de pele do tipo não melanoma (31). Entretanto, este risco aumentado ainda não foi relatado para o melanoma. Alguns trabalhos mostraram que a CPA pode contribuir na terapia contra o melanoma como complemento da terapia gênica e imunoterapia (32, 33, 34). No entanto, não há trabalhos que avaliam se uso prolongado do CPA em outros tratamentos possa aumentar as chances de desenvolver o melanoma.

Em conjunto, as informações apresentadas acima mostram que a ciclofosfamida é um importante medicamento utilizado no tratamento do câncer e doenças autoimunes. No câncer, suas propriedades imunomoduladoras e imunossupressoras podem promover alterações no microambiente tumoral que afetam de forma favorável ou não as respostas do organismo contra o tumor. Por sua vez, nas doenças autoimunes, a CPA pode favorecer o desenvolvimento de câncer, entre os quais o câncer de pele não melanoma. Considerando os efeitos dicotômicos da CPA no desenvolvimento de neoplasias pela sua ação no sistema imunológico e no microambiente tumoral, o intuito do presente estudo foi avaliar, em modelo murino, se o uso prolongado de CPA predispõe o desenvolvimento do melanoma e determinar quais são os possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesta ação.

Os resultados obtidos no presente estudo, apresentados em formato de artigo serão submetidos à revista ***Journal of Immunology Research***.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases. Geneva, 2013.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin.; 2018;68(6):394–424.
3. Nguyen DX, Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis. Nat Rev Genet. 2007;8(5):341–52.
4. Spano D, Zollo M. Tumor microenvironment: A main actor in the metastasis process. Clin Exp Metastasis. 2012;29(4):381–95.

5. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. 2018 Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>. Acesso em 23 de agosto de 2018.
6. Apalla Z, Lallas A, Sotiriou E, Lazaridou E, Ioannides D. Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatol Pract Concept.*; 2017;7(2):1–
7. Ingraffea A. Melanoma. *Facial Plast Surg Clin North Am.*; 2013;21(1):33–42.
8. Shannan B, Perego M, Somasundaram R, Herlyn M. Heterogeneity in Melanoma. *Cancer Treat Res.*; 2016;167:1–15.
9. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.*; 2013;19(11):1423–37.
10. Brandner JM, Haass NK. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology.*; 2013;45(5):443–52.
11. Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol.*; 2006;1:119–50.
12. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*; 2013;14(10):1014–22.
13. Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immunol.*; 2012;167(2):195–205.
14. Moro N, Mauch C, Zigrino P. Metalloproteinases in melanoma. *Eur J Cell Biol.*; 2014;93(1–2):23–9.
15. Araújo RVDS, Silva FO, Melo-Júnior MR, Porto ALF. Metalloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. *Rev Ciências Médicas e Biológicas* [Internet]. 2011;10:82–8. Disponível em: <http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/5470>.
16. DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann N Y Acad Sci.*; 2010;1183:38–57.
17. Sionov RV, Fridlender ZG, Granot Z. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.*; 2015;8(3):125–58.
18. Wu YJ, Muldoon LL, Dickey DT, Lewin SJ, Varallyay CG, Neuwelt EA. Cyclophosphamide enhances human tumor growth in nude rat xenografted tumor models. *Neoplasia.*; 2009;11(2):187–95.

19. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol.*; 2009;6(11):638–47.
20. Yamauchi K, Yang M, Hayashi K, Jiang P, Yamamoto N, Tsuchiya H, et al. Induction of cancer metastasis by cyclophosphamide pretreatment of host mice: an opposite effect of chemotherapy. *Cancer Res.*; 2008;68(2):516–20.
21. Hung C-M, Hsu Y-C, Chen T-Y, Chang C-C, Lee M-J. Cyclophosphamide promotes breast cancer cell migration through CXCR4 and matrix metalloproteinases. *Cell Biol Int.*; 2017;41(3):345–52.
22. Man S, Zhang Y, Gao W, Yan L, Ma C. Cyclophosphamide promotes pulmonary metastasis on mouse lung adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis.*; 2008;25(8):855–64.
23. Park SI, Liao J, Berry JE, Li X, Koh AJ, Michalski ME, et al. Cyclophosphamide creates a receptive microenvironment for prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res.*; 2012;72(10):2522–32.
24. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.*; 2007;56(5):641–8.
25. Ouyang Z, Wu H, Li L, Luo Y, Li X, Huang G. Regulatory T cells in the immunotherapy of melanoma. *Tumour Biol.*; 2016;37(1):77–85.
26. Sistigu A, Viaud S, Chaput N, Bracci L, Proietti E, Zitvogel L. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin Immunopathol.*; 2011;33(4):369–83.
27. Kim J, Chan JJ. Cyclophosphamide in dermatology. *Australas J Dermatol.*; 2017;58(1):5–17.
28. Shin J-S, Chung S-H, Lee W-S, Lee J-Y, Kim J-L, Lee K-T. Immunostimulatory effects of cordycepin-enriched WIB-801CE from *Cordyceps militaris* in splenocytes and cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Phytother Res.*; 2018;32(1):132–9.
29. Monach PA, Arnold LM, Merkel PA. Incidence and prevention of bladder toxicity from cyclophosphamide in the treatment of rheumatic diseases: a data-driven review. *Arthritis Rheum.*; 2010;62(1):9–21.
30. Machado RIL, Braz AS, Freire EAM. Incidência de neoplasias nas doenças reumatológicas autoimunes mais prevalentes: uma revisão sistemática. *Rev. Bras. Reumato*; 2014; 54(2), 131-139.
31. Van Daalen EE, Rizzo R, Krombachler A, Wolterbeek R, Bruijn JA, Jayne DR, et al. Effect of rituximab on malignancy risk in patients with ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.*; 2017;76(6):1064–9.

32. Klein O, Davis ID, McArthur GA, Chen L, Haydon A, Parente P, et al. Low-dose cyclophosphamide enhances antigen-specific CD4(+) T cell responses to NY-ESO-1/ISCOMATRIX vaccine in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol Immunother.*; 2015;64(4):507–18.
33. Irenaeus S, Schiza A, Mangsbo SM, Wenthe J, Eriksson E, Krause J, et al. Local irradiation does not enhance the effect of immunostimulatory AdCD40L gene therapy combined with low dose cyclophosphamide in melanoma patients. *Oncotarget.* 2017;8(45):78573–87.
34. Mikhaylova IN, Shubina IZ, Chkadua GZ, Petenko NN, Morozova LF, Burova OS, et al. Immunological monitoring for prediction of clinical response to antitumor vaccine therapy. *Oncotarget.*; 2018;9(36):24381–90.

2. ARTIGO**Journal of Immunology Research****Diminuição de neutrófilos e macrófagos no microambiente tumoral por tratamento com ciclofosfamida reduz crescimento e invasividade de células de melanoma murino**

Thiago Albuquerque Viração¹, José Guilherme Xavier¹, Anuska Marcelino Alvares Saraiva², Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha¹, José Renildo de Carvalho¹, Débora de Oliveira Mares Silvestro¹, Fabiana Toshie de Camargo Konno¹, Giovani Bravin Peres¹, Maria Anete Lallo¹, Elizabeth Cristina Pérez Hurtado¹

¹Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista – UNIP, São Paulo, SP, Brasil.

²Instituto de ciências da atividade física e esporte, Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, SP, Brasil.

Resumo

A ciclofosfamida (CPA) é um quimioterápico antineoplásico também utilizado em tratamento de doenças autoimunes. Embora estudos clínicos tenham mostrado que seu uso prolongado pode favorecer o desenvolvimento de câncer de pele, ainda não existem estudos referenciando o melanoma. Assim, o intuito do presente trabalho foi avaliar o desenvolvimento e progressão de células de melanoma em animais tratados com CPA para contribuir na compreensão dos mecanismos de ação do CPA sobre componentes celulares e moleculares presentes no microambiente tumoral de tumores altamente agressivos como o melanoma. Para isto, camundongos C57BL/6 foram tratados com CPA quatorze dias antes da inoculação de células B16F10 na região subcutânea do dorso. Análises de sobrevida e crescimento tumoral foram realizadas por acompanhamento dos animais em dias alternados até aproximadamente 40 após da inoculação das células tumorais. Já estudos histopatológicos, avaliação de populações celulares presentes em órgãos

linfoides, sangue e microambiente tumoral e, produção de citocinas e metaloproteases de matriz foram realizadas em animais eutanasiados 14 dias após da inoculação das células de melanoma. Dados obtidos nestas análises mostraram que animais tratados com CPA apresentam melhora na sobrevida e menor crescimento tumoral, com diminuição da população de neutrófilos e macrófagos no microambiente tumoral, aumento de IL-10 e menor produção de MMP-9 no soro. Em conjunto, resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a diminuição de neutrófilos e macrófagos no microambiente tumoral pode ser um dos mecanismos pelos quais o tratamento com CPA reduz MMP-9 e consequentemente o crescimento e progressão do melanoma evidenciando melhora na sobrevida destes animais. Estes achados inéditos fornecem novas informações sobre o efeito da ciclofosfamida sobre componentes celulares e moleculares que podem ser potencias alvos para o tratamento de tumores agressivos como o melanoma.

Palavras-chave: Autoimunidade, imunossupressão, câncer de pele, metástases, leucócitos, MMP-9, IL-10, TCD4⁺

2.1. Introdução

O melanoma é uma neoplasia maligna que se origina nos melanócitos, células produtoras da melanina, responsáveis pela pigmentação e proteção da pele contra danos causados pela radiação ultravioleta (1). Entre todos os tipos de cânceres de pele é considerando o mais agressivo devido a sua maior capacidade de formar metástases e ser resistente a maioria das terapias (2).

Estudos demonstraram que a ciclofosfamida (CPA), fármaco alquilante antineoplásico com propriedades imunomoduladoras, pode favorecer uma resposta antitumoral contra o melanoma, por reduzir a atividade inibitória de células T reguladoras (T reg) e restaurar respostas de células T efetoras (3-6). Entretanto, apesar de ser sintetizada inicialmente para tratamento de câncer, autores relataram efeitos opostos da CPA no desenvolvimento de tumores e formação de metástases em estudos *in vitro* e em modelos animais (7-10). Em indivíduos que utilizam de forma constante a CPA para tratamento de doenças autoimunes, como vasculites associadas a anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (*antineutrophil cytoplasmic*

antibody associated vasculitis – ANCA VAA), foi evidenciado um aumento nos riscos para desenvolver câncer de pele do tipo não melanoma (11, 12). Entretanto, até o momento não existem estudos que avaliam a ocorrência do melanoma em pacientes que utilizam CPA por longos períodos de tempo.

Uma vez que a CPA possui propriedades imunossupressoras e imunomoduladoras, estudos dos efeitos do uso prolongado deste fármaco sobre o desenvolvimento de tumores altamente agressivos como o melanoma fornecerá dados inéditos para a descoberta de novos alvos terapêuticos. Assim, o intuito do presente trabalho foi investigar os possíveis mecanismos de ação da CPA no desenvolvimento do melanoma em modelo murino, abordando componentes celulares e moleculares presentes no microambiente tumoral, órgãos linfoides e sangue.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 *specific pathogen-free* (SPF), adultos com 8 semanas de idade, pesando entre 17 e 23 gramas, provenientes do Laboratório de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa da Universidade Paulista. Os animais foram mantidos em microisoladores, com temperatura 20 ± 1 °C e ciclo de luz controlada (ciclo de 12 horas claro/escuro), com água autoclavada e ração esterilizada por ionização, *ad libitum*. Para a eutanásia, os animais foram submetidos ao aprofundamento anestésico pela injeção por via intraperitoneal (i.p.) de solução contendo quetamina (50 mg/mL), xilazina (20 mg/mL) e fentanil (0,05 mg/mL). Todos os procedimentos utilizados na manipulação e manutenção dos camundongos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista, sob o número de protocolo 042/17.

2.2.2. Tratamento com CPA

Concentrações de CPA de 50 ou 100 mg/Kg com a fórmula Genuxal 200 mg (Baxter, Halle, Germany), diluídas em solução salina injetável estéril foram utilizadas no presente estudo. O fármaco foi ministrado uma vez por semana por via i.p., para os respectivos grupos (50 e 100), com início quatorze dias antes da inoculação das

células B16F10 e mantido até o fim do período experimental. Para os grupos controles foram realizadas, simultaneamente, injeções uma vez por semana de solução salina injetável estéril via i.p. Todas as injeções foram realizadas após assepsia com álcool 70% da região peritoneal selecionada para a injeção.

2.2.3. Cultura de células B16F10

Células da linhagem B16F10 foram mantidas em meio RPMI (Sigma, St. Louis, MO, USA) acrescido com 10% de soro bovino fetal e 1% de ciprofloxacina (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Ao atingir a confluência de aproximadamente 80% as células foram descoladas por breve exposição ao PBS-EDTA (2 mM de EDTA diluído em tampão fosfato salino - PBS) para repique.

2.2.4. Desafio tumoral.

Os animais foram injetados de forma subcutânea (s.c.) no flanco esquerdo com 1,5 X 10⁵ células de melanoma B16F10, ressuspensas em 100 µl de solução salina injetável estéril, após prévia assepsia com álcool no local de injeção.

2.2.5. Ensaio de sobrevida.

Após desafio tumoral, os animais foram observados diariamente para detecção de óbitos ou sinais que indicassem dificuldade de locomoção ou presença de ulcerações sob o tumor. Animais apresentando algum dos sinais anteriormente descritos foram imediatamente eutanasiados por aprofundamento anestésico.

2.2.6. Volume tumoral.

O crescimento da massa tumoral foi aferido em dias alternados com paquímetro digital Digimess® 100.174BL (Digimess, São Paulo, Brasil). Medidas de comprimento e largura foram realizadas a partir do surgimento do nódulo tumoral, até o dia da eutanásia. Para o cálculo do volume tumoral foi utilizada a equação: $V(mm^3)=d^2*(D/2)$. Onde d representa o menor valor e D o maior valor, obtidos pelas medidas de comprimento e largura realizadas em dias alternados (13).

2.2.7. Análises histopatológicas.

Linfonodo inguinal ipsilateral, baço, timo, pulmões, rins, fígado, esterno, encéfalo e massa tumoral foram colhidos para análises histopatológicas e corados por HE (hematoxilina e eosina). Para coloração HE, o material colhido foi fixado em formol 10% e, posteriormente, os tecidos foram submetidos às etapas de: desidratação, diafanização e inclusão da parafina para então serem obtidos os cortes por microtromia (4 μ m). Os cortes foram desparafinados, reidratados e corados com hematoxilina e eosina. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico convencional (NIKON ECLIPSE E200, Japão).

2.2.8. Análises de populações celulares por Citometria de Fluxo

Após 14 dias, animais tratados com CPA ou salina, inoculados ou não com células B16F10 foram eutanasiados para análise fenotípica por citometria de fluxo dos componentes leucocitários presentes no sangue total, peritônio, baço, linfonodo inguinal ipsilateral, timo e tumor. Amostras contendo hemácias foram tratadas com tampão hemolítico (4,15g de NH₄Cl, 0,5g de NaHCO₃, 0,02g de EDTA em 500 mL de H₂O deionizada) por 2 minutos no gelo. Após lavagem 1x com PBS, 1x10⁶ células de cada amostra foram incubadas por 20 minutos no gelo com anti-CD16/CD32 diluído em PBS acrescido com 1% de BSA (*Bovine sérum albumin*, Sigma St. Louis, MO, USA) para bloqueio de sítios inespecíficos (bloqueio de receptores Fc). Na sequência, as células foram lavadas e incubadas por 30 minutos a 4°C com diferentes combinações de anticorpos para identificação de populações de linfócitos T CD4 (CD4 PerCP ou CD4 APC), macrófagos/monócitos (F4/80 APC) e neutrófilos (GR1 FITC). Os anticorpos utilizados foram da BD Biosciences (San Diego, CA, USA), diluídos 1:100 com PBS acrescido com 1% BSA. Após marcação, as células foram lavadas e em seguida ressuspensas em 200 μ L de PBS para aquisição em aparelho BD ACCURI™ C6 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Para determinar a viabilidade celular em cada amostra, o kit PE *Annexin V Apoptosis Detection* foi utilizado conforme indicações do fabricante BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Para isto, após marcações descritas acima, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 1X *Annexin V Binding Buffer* e em seguida adicionado 1 μ L de anexina e 1 μ L de 7-AAD. Após incubação por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro, foram adicionados 100 μ L de 1X *Annexin V Binding Buffer* para aquisição em aparelho BD ACCURI™ C6, conforme *template* já estabelecido pelo fabricante.

Figuras representativas da análise da viabilidade encontram-se descritas na Figura S1 do material suplementar.

2.2.9. Produção de lisado tumoral.

A massa tumoral foi removida cirurgicamente e o tecido foi dissociado utilizando o equipamento TissueRuptor II (Qiagen, Hilden, Germany). Em seguida as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e conservado em freezer -80°C até o momento da sua utilização para quantificação de citocinas e metaloproteases.

2.2.10. Análises de citocinas por citometria de fluxo

Para avaliar produção de citocinas relacionadas aos padrões Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-17, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) em amostras de soro obtidas por separação do sangue total colhido por punção cardíaca e, dos lisados do tumor, foi utilizada a técnica CBA com o kit BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Para isto, 50 μ L de cada amostra (incluindo curva padrão) foram incubados com 50 μ L de uma mistura de *beads* de captura e anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo *phycoerythrin* (PE). As amostras foram incubadas por 2 horas, na temperatura ambiente e no escuro. Após lavagem, a aquisição dos dados foi realizada por citometria de fluxo utilizando BD ACCURI™ C6. Total de 2100 eventos foi adquirido, correspondendo a 300 *beads* por cada analito investigado. A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* de análises para CBA FCAP Array *software* versão 3.0 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) e as concentrações de cada amostra foram calculadas com base na curva padrão realizada conforme indicações do fabricante do kit. Amostras com concentrações abaixo do limite de detecção determinado pelo kit para cada citocina foram consideradas com o valor 0 pg/mL.

2.2.11. Dosagem de proteínas.

Para realização da zimografia, a quantificação das proteínas presentes no soro e no lisado tumoral foi realizada pelo método do ácido bicinconílico utilizando o kit BCA1-1KT (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA). Conforme instruções do fabricante, curva padrão foi realizada por diluição seriada de albumina bovina (INLAB, São Paulo, SP, Brasil) em concentrações que variaram de 0,78 a

12,5 mg/mL. A placa contendo a curva e as amostras de estudo em duplicata foi incubada com os reagentes específicos do Kit por 30 minutos a 37°C. Logo após o período de incubação, a densidade óptica (D.O.) foi avaliada em leitor de microplacas Thermoplate TP Reader NM (Thermoplate, São Paulo, SP, Brasil), no comprimento de onda de 550 nm. Os dados da D.O. gerados permitiram a construção da curva padrão, cálculo da equação da reta e posterior quantificação de proteínas nas amostras.

2.2.12. Zimografia.

Para avaliar a produção MMP-2 e MMP-9 em amostras de soro e lisado tumoral foi utilizada a técnica de zimografia, através de eletroforese em gel de poliacrilamida com substrato enzimático. Para isto, foi preparado gel de corrida, contendo 4 mL de gelatina tipo A (Sigma, St. Louis, MO, USA), 3,3 mL de solução com 30% acrilamida e 0,8% bisacrilamida (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil) diluídos em água ultrapura, 2,5 mL de Tris-HCl (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil) 1M com pH 8,8, 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS-Page, Sigma, St. Louis, MO, USA) a 1%, 100 µL de persulfato de amônio (PSA, Sigma, St. Louis, MO, USA) a 10% e 4 µL de TEMED (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts USA). Após polimerização do gel de corrida, foi preparado o gel de empilhamento contendo 2,1 mL de água destilada, 500 µL de Acrilamida/Bis (30:0,8), 380 µL de Tris-HCl 1 M com pH 6,8, 30 µL de SDS 0,5%, 30 µL de PSA a 10% e 3 µL de TEMED. Após polimerização os géis foram colocados na cuba de eletroforese vertical Mini VE (Amersham/ General Electric Company, Boston, Massachusetts, USA) e completados com tampão de corrida 10x, preparado com 30,2g de Tris base 250 mM, 144g de Glicina 1,92 M, 10g de SDS a 1% e 1L de água destilada, solução com pH 8,3. Para preparação da amostra, dez microlitros da amostra foi diluída em água até atingir a concentração proteica final de 30 µg e em seguida foi adicionado, na proporção de 1:1, em tampão de amostra preparado com 2 mL de glicerol, 0,4 g de SDS a 4%, 0,05 g de azul de bromofenol (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 10 mL de Tris HCl 0,125 M pH 6,8. Cada amostra preparada conforme descrito acima foi adicionada aos respectivos poços do gel para corrida em recipiente com gelo a 110V e 50 mA por três horas.

Após a eletroforese, o gel foi lavado com Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 2,5% por 30 minutos em temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente, foi incubado com aproximadamente 300 mL de tampão de ativação enzimática,

preparado com 6,057 g de Tris 50 mM, 1,11 g de CaCl₂ (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil), 0,65 g de NaN₃ 10 mM (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil), 2 mL de Brij-35* (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 0,2%, em 1 L de água destilada, em pH 7,6, por 20 horas a 37°C sob constante agitação. Após este período o gel foi corado com azul de Coomassie 0,5% (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 30 minutos. Em seguida foi descorado após lavagens com solução descorante composto por 50% álcool metílico, 10% ácido acético e 40% água destilada, e incubado por 24 horas em recipiente contendo água destilada para hidratar e melhorar o contraste. Os géis foram fotografados em fotodocumentador GE ImageQuant LAS4000 (General Electric Company, Boston, Massachusetts, USA) e o cálculo da intensidade dos pixels das bandas foi realizado por software ImageJ (Bethesda, USA), de acordo com metodologia de Hu e Beeton (14).

2.2.13. Análise Estatística.

Primeiramente, os dados foram submetidos ao teste *Shapiro-Wilk* (SW) para avaliar a normalidade. Quando a normalidade foi respeitada (SW>0,05), os dados foram classificados como paramétricos e comparações entre dois grupos foi realizado por teste *t student* para amostras independentes e comparações entre três grupos foram realizadas por ANOVA de uma ou duas vias. Quando não houve normalidade dos dados, o conjunto de dados foi classificado como não paramétrico e analisados por teste U de Mann Whitney, alternativa não paramétrica para teste *t student*. *Outliers* foram avaliados por análises de gráficos *box-plots* e removidos quando necessário. Para análise de sobrevida entre os grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Log-rank. Diferenças com valor de *p* < 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas. As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas pelos softwares IBM SPSS statistics versão 21 (Armonk, NY, Estados Unidos) e GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Prism for Windows, GraphPad software, San Diego, California USA).

2.3. Resultados

2.3.1. O tratamento com CPA melhora sobrevida de animais desafiados com células B16F10 e diminui crescimento tumoral.

Considerando que o melanoma apresenta um desenvolvimento progressivo e que animais desafiados com células B16F10 apresentam curta sobrevida, foi avaliado se o tratamento prévio de CPA influencia na sobrevida de animais com melanoma. Levando em consideração dados literatura (13), duas concentrações distintas de CPA foram utilizadas, 50 e 100 mg/Kg. Análises da distribuição de sobrevivência não mostraram diferenças entre os grupos tratados com CPA em relação ao grupo salina ($p>0,11$). Entretanto, ressalta-se que no dia 38 todos os animais do grupo salina haviam entrado em óbito, enquanto animais tratados com CPA permaneceram vivos até o dia 48, onde dois animais tratados com 50 mg/Kg e um animal tratado com 100 mg/Kg de CPA foram eutanasiados. Contudo, apesar de não ter diferenças estatísticas entre os grupos, estes dados sugerem melhora na sobrevida em animais tratados com CPA (Figura 1(b)). Em paralelo, o peso dos animais foi acompanhado desde o inicio até o final do ensaio. Conforme mostrado na Figura 1(c), os tratamentos com CPA não evidenciaram alterações no peso dos animais.

Uma vez que tumores grandes podem estar associados à diminuição na sobrevivência de animais com tumores sólidos, o crescimento do tumor foi também avaliado ao longo do ensaio de sobrevida. Análises mostraram diferenças no crescimento tumoral entre todos os grupos ($p<0,001$), segundo teste ANOVA de modelos mistos para medidas repetidas. O tumor apresentou crescimento progressivo ao longo do tempo, com maiores volumes atingidos pelos animais que receberam apenas salina e menores volumes nos animais tratados com CPA 100 mg/Kg ao longo da observação, por mais de 30 dias (Figura 1(d)). Estes dados corroboram com o menor peso dos tumores encontrados em animais tratados com 100 mg/Kg de CPA e eutanasiados 14 dias após eutanásia quando comparados com os animais do grupo controle salina ($p<0,01$), conforme indicado na Figura 1(e).

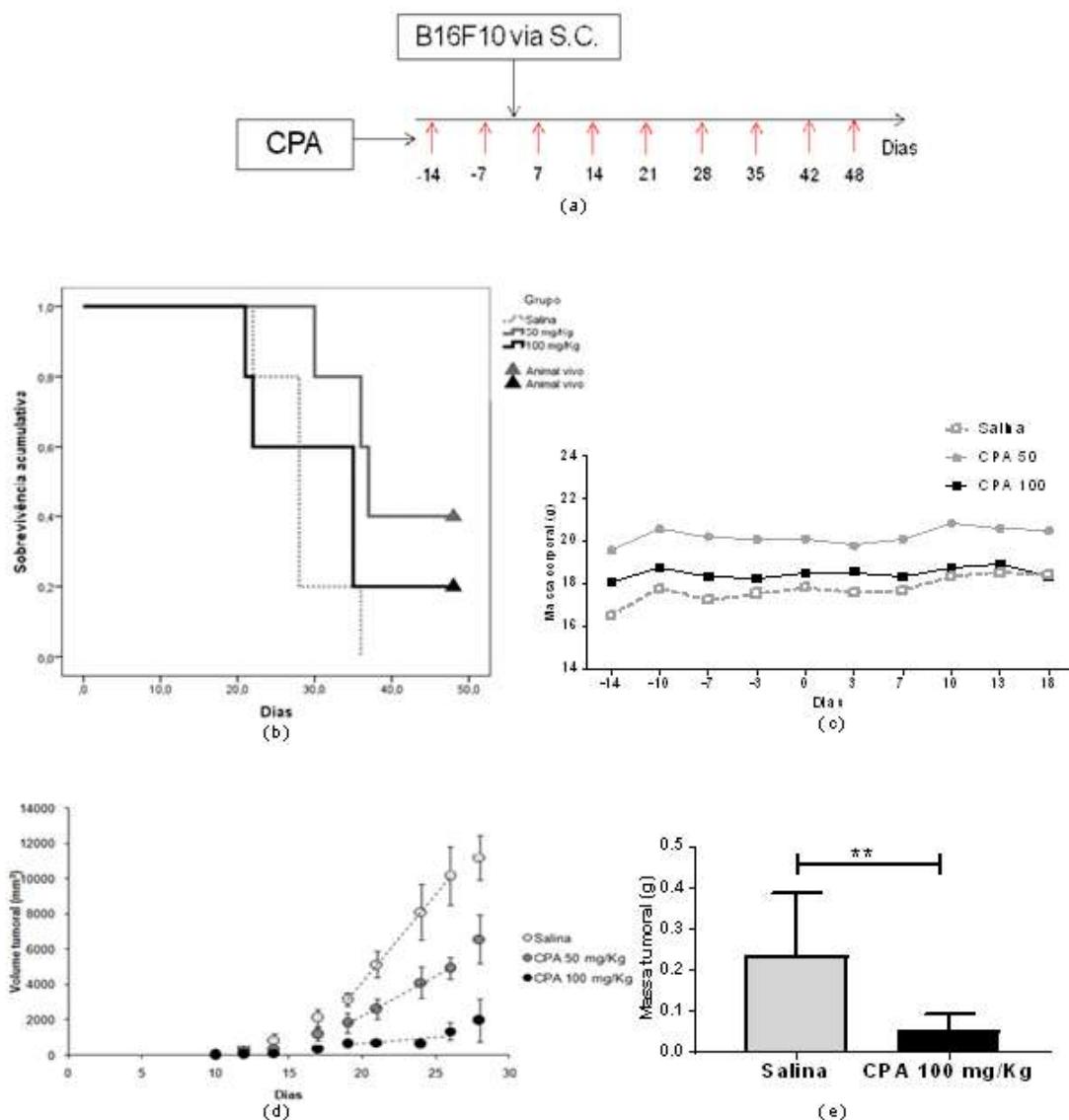


Figura 1: Tratamento com CPA melhora na sobrevida de animais inoculados com células de B16F10 e reduz crescimento tumoral. (a) Representação esquemática do protocolo de tratamento com CPA. Setas representam injeções intraperitoneais de CPA nas concentrações de 50 ou 100 mg/Kg ou solução salina. (b) Animais foram observados diariamente e o dia de seu óbito foi registrado para análise da distribuição de sobrevida, teste de Log-Rank (c) Linhas representam média da massa corporal dos animais, em gramas, aferidas em dias alternados, teste *t* para amostras independentes. (d) Média de volumes tumorais dos animais tratados com 50 ou 100 mg/Kg de CPA ou salina, aferido em dias alternados até 28 dias após da inoculação de células B16F10, ANOVA de modelos mistos para medidas repetidas com pós-teste de Tukey, pontos representam média \pm erro padrão. (e) Colunas representam a média da massa tumoral após 14 dias de injeção subcutânea de células de B16F10, Teste *t* para amostras independentes, dados representam média \pm desvio padrão, ** $p < 0,01$. $\alpha = 0,05$.

2.3.2. Redução da invasividade em tecidos adjacentes ao tumor é observada em animais tratados com CPA

Para avaliar o padrão histológico dos tumores em cada um dos grupos, foram realizadas análises de micrografias das massas tumorais de animais tratados com CPA ou salina. Animais do grupo CPA apresentaram extensa área necrótica e infiltrado leucocitário (Figura 2(a)), com infiltrado polimorfonuclear em periferia tumoral (Figura 2(b)) e elevado número de células tumorais constituindo tapetes, com importante anaplasia representada pelo aumento de relação núcleo/citoplasma, anisocariose e macronucléolos (Figura 2(c)). As massas tumorais do grupo tratado com salina apresentaram elevada densidade celular, com infiltração de células tumorais na musculatura, na região perineural e no tecido adiposo (Figuras 2 (d), (e) e (f), respectivamente), o que não foi observado em animais do grupo CPA. Análises microscópicas não evidenciaram presença de células tumorais em baço, linfonodo inguinal ipsilateral, timo, pulmões, fígado, medula óssea (esterno) ou rins, em animais tratados com CPA ou salina, conforme o esperado do modelo experimental utilizado, no qual não são evidenciadas metástases espontâneas.

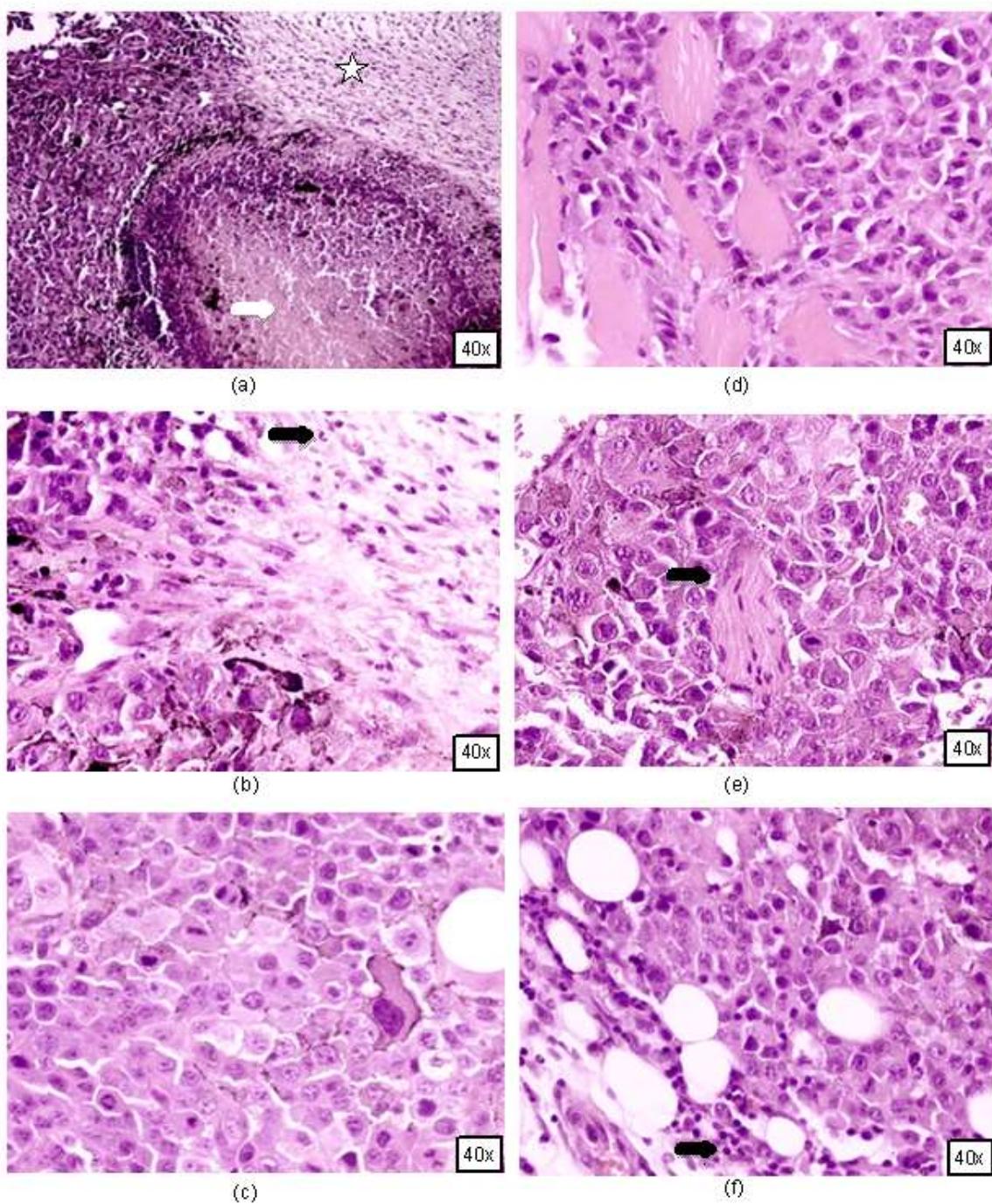


Figura 2: Fotomicrografias de cortes histológicos de massa tumoral de melanoma de animais tratados com CPA ou solução salina. Animais tratados com CPA ou solução salina foram eutanasiados 14 dias após injeção de células de B16F10 para análise da histopatológica. Animais tratados com CPA apresentaram: (a) extensa área necrótica (seta) e infiltrado leucocitário (estrela), 10x. (b) infiltrado polimorfonuclear em periferia tumoral (seta) e (c) elevada densidade de células neoplásicas, constituindo tapetes, com importante anaplasia representada pelo aumento de relação núcleo/citoplasma, anisocariose e macronucléolos, 40x. Animais tratados com solução salina apresentaram: (d) Elevada densidade celular com infiltração de musculatura, (e) na região perineural (seta) e (f) no tecido adiposo, com infiltrado polimorfonuclear periférico (seta), 40x. Hematoxilina-eosina, imagens captadas no microscópio óptico convencional (NIKON ECLIPSE E200, Japão).

2.3.3. Maior evidência de degeneração vacuolar de hepatócitos e redução de celularidade no baço em animais tratados com CPA.

Considerando que a hepatotoxicidade é um dos efeitos colaterais do tratamento com CPA, foi avaliada a arquitetura tecidual hepática dos animais. Análise apresentada na Figura 3(a) evidencia maior degeneração vacuolar de hepatócitos nos animais tratados com CPA. Além disso, análise microscópica do baço sugere depleção linfoide no grupo CPA, caracterizados pela redução da basofilia, conforme observada na Figura 3(c). As Figuras 3(b) e (d) representam, respectivamente, micrografias de fígado e baço de animais tratados com solução salina que não evidenciam alterações representativas.

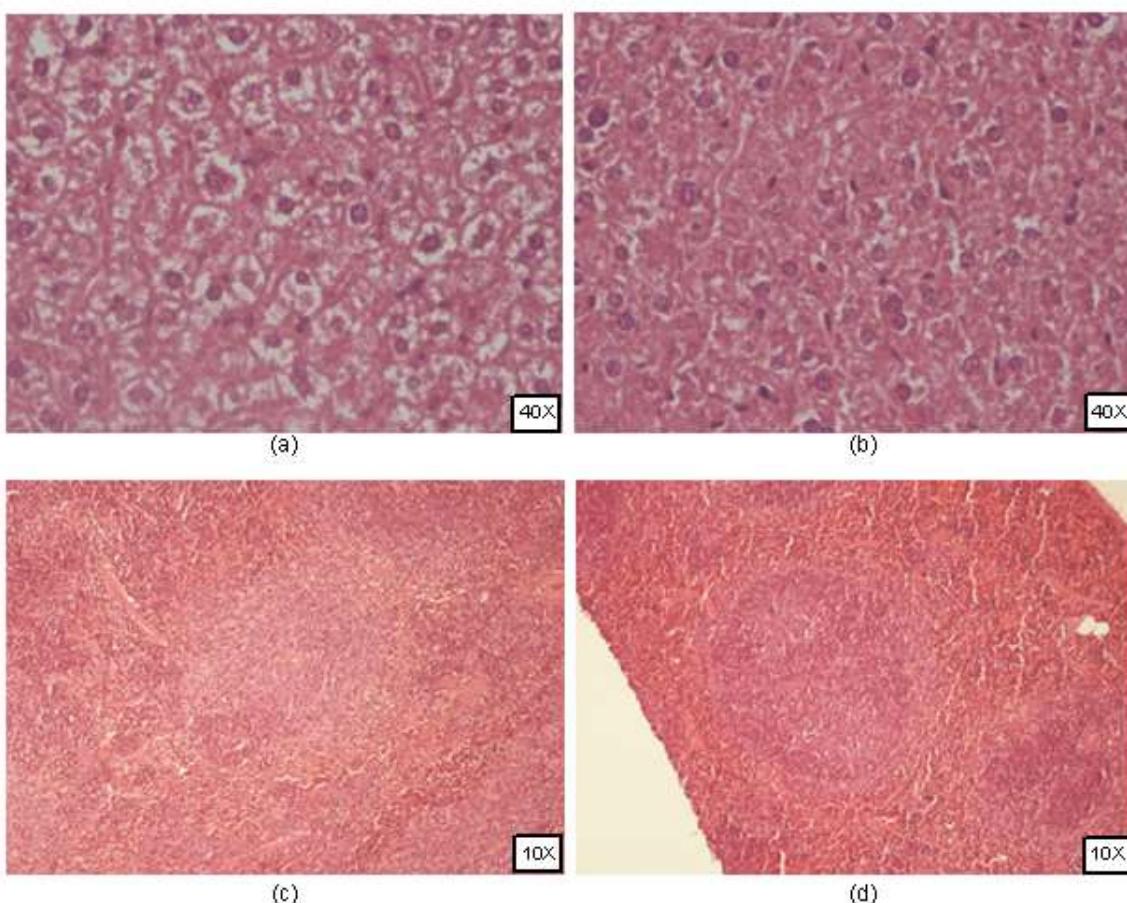


Figura 3: Análises da arquitetura tecidual induzida pelo tratamento com CPA. Fotomicrografias de fígado e baço de animais tratados com CPA ou solução salina e eutanasiados 14 dias após injeção de células B16F10. Animais pré-tratados com CPA apresentaram maior degeneração vacuolar de hepatócitos (a) comparando com animais tratados com solução salina (b), 40X. Cortes histológicos do baço evidenciaram redução de basofilia em animais do grupo CPA (c), comparando-os aos animais do grupo salina (d), 10X. Hematoxilina-eosina, imagens captadas no microscópio óptico convencional (NIKON ECLIPSE E200, Japão).

2.3.4. Redução de infiltrado leucocitário no tumor acompanhado de diminuição na população total de linfócitos no baço, peritônio e sangue é observada em animais tratados com CPA

Uma vez que a CPA influencia populações de células imunes, foi avaliado o percentual da população total de linfócitos. Análises mostram diminuição no percentual da população total de linfócitos no baço ($p<0,001$), peritônio ($p<0,01$) e sangue ($p<0,01$) no grupo tratado com CPA, quando comparado com o grupo salina, conforme apresentado nas Figuras 4(c), (h) e (j), respectivamente. O tumor do grupo tratado com CPA apresentou diminuição percentual da população total de leucócitos ($p<0,01$), conforme ilustrado na Figura 4(i). Em timo e linfonodo as populações foram equivalentes ($p>0,05$), Figuras 4(b) e (f), respectivamente.

Para avaliar se esta diminuição observada foi influenciada pelo tumor, foi avaliado a influencia da CPA em animais controles, sem tumor, apenas tratados com CPA ou solução salina. Neste grupo, foi observada redução no percentual da população total de linfócitos apenas no sangue ($p<0,001$), Figura 4(j), não mostrando diferenças no baço ($p>0,59$), linfonodo ($p>0,61$) e peritônio ($p>0,11$), Figuras 4(c), (f) e (h), respectivamente.

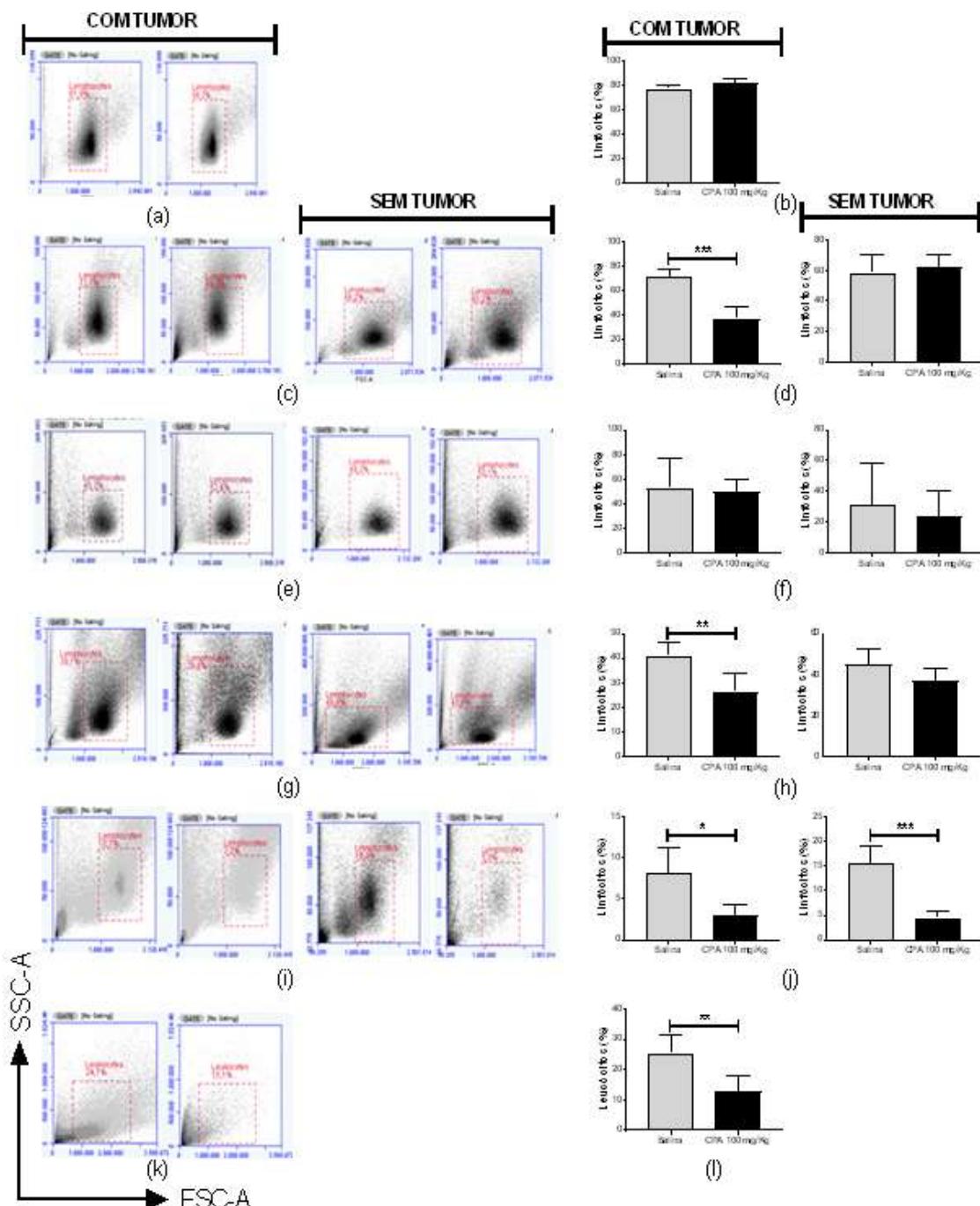


Figura 4: Análise percentual da população total de linfócitos em animais tratados com CPA ou solução salina, inoculados ou não com células B16F10. Animais do grupo com tumor foram pré-tratados com CPA por duas semanas antes da inoculação de células B16F10. Catorze dias após desafio tumoral os animais foram eutanasiados. Animais sem tumor foram tratados semanalmente com CPA ou solução salina e eutanasiados após 28 dias. Órgãos e tecidos foram colhidos para análise da população total de linfócitos por citometria de fluxo. Resultados representativos do percentual da população total de linfócitos em (a) timo, (c) baço, (e) linfonodo, (g) peritônio, (i) sangue e (k) tumor. Colunas representam média percentual e desvio padrão da população total de linfócitos, em (b) timo, (d) baço, (f) linfonodo, (h) peritônio, (j) sangue e (l) tumor. Teste *t* para amostras independentes, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $\alpha = 0,05$.

2.3.5. Animais tratados com CPA apresentam maior percentual de linfócitos T CD4⁺ no timo, linfonodo, peritônio e sangue.

Considerando que o tratamento com CPA pode potencializar respostas de linfócitos T antígeno específico [6], foram realizadas análises de populações de células T CD4⁺. Resultados mostram que animais tratados com CPA e desafiados com células B16F10 apresentaram maior percentual de células CD4⁺ no timo ($p<0,05$), linfonodo ($p<0,0001$), peritônio ($p<0,05$) e sangue ($p<0,0001$), conforme apresentado nas Figuras 5(b), (f), (h) e 5(j), respectivamente. Por sua vez, não houve diferenças no baço ($p>0,67$) e tumor ($p>0,08$), conforme ilustrado nas Figuras 5(d) e (l), respectivamente.

Em paralelo, análises de populações celulares realizadas em animais tratados ou não com CPA, sem inoculação de células B16F10, mostram também maior percentual de linfócitos T CD4⁺ no baço ($p<0,003$), peritônio ($p<0,008$) e sangue ($p<0,05$) de animais tratados com CPA (Figuras 5(d), (h) e (j), respectivamente). Já no linfonodo, o percentual de linfócitos T CD4⁺ foi equivalente entre os grupos ($p>0,05$), Figura 5(f).

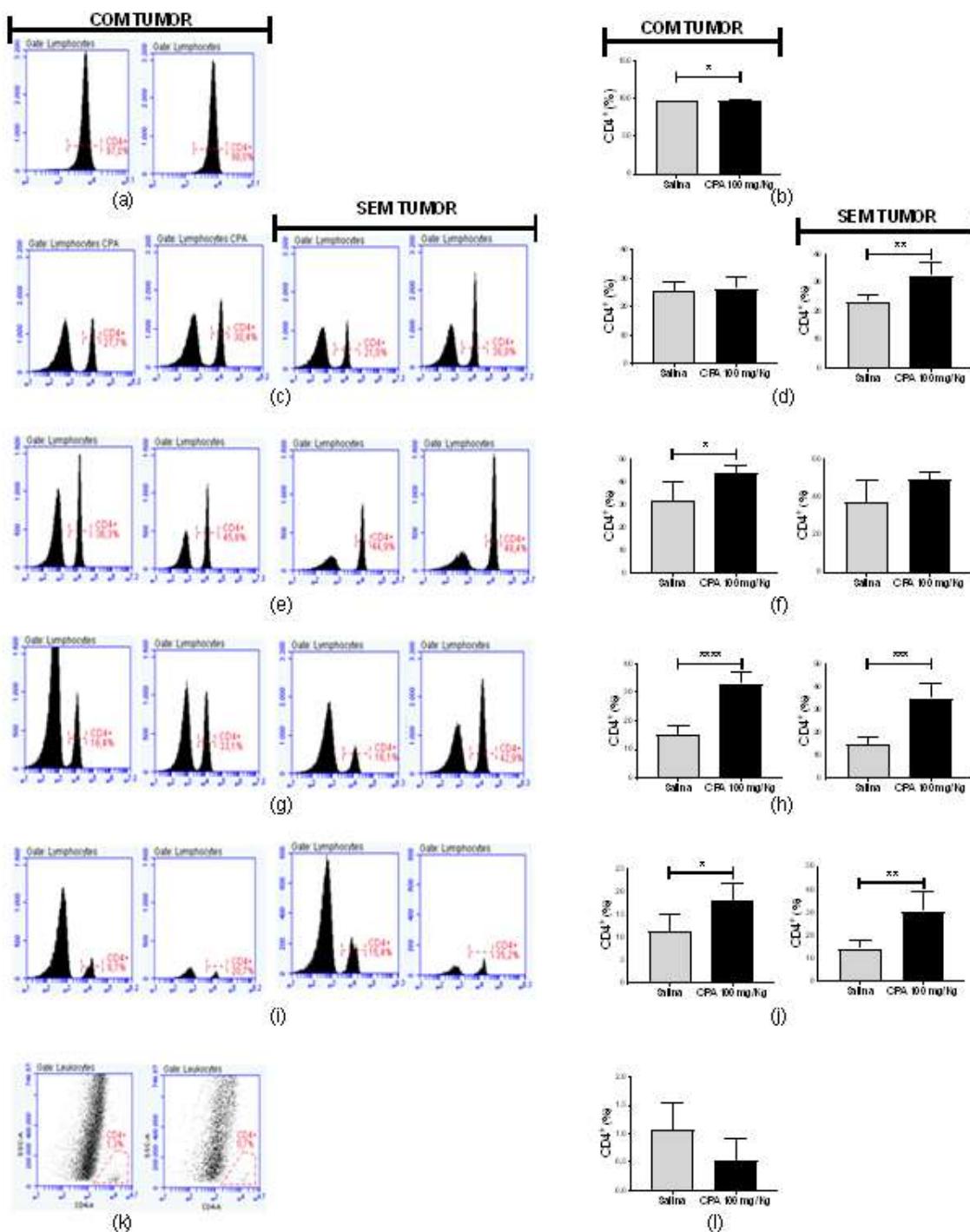


Figura 5: Análise percentual do percentual de linfócitos TCD4⁺ em animais tratados com CPA ou solução salina, inoculados ou não com células B16F10. Animais do grupo com tumor foram pré-tratados com CPA por duas semanas antes da inoculação de células B16F10. Catorze dias após desafio tumoral os animais foram eutanasiados. Animais sem tumor foram tratados semanalmente com CPA ou solução salina e eutanasiados após 28 dias. Órgãos e tecidos foram colhidos para análise do percentual de células CD4⁺ por citometria de fluxo. Resultados representativos do percentual da de linfócitos T CD4⁺ em (a) timo, (c) baço, (e) linfonodo, (g) peritônio, (i) sangue e (k) tumor. Colunas representam média percentual e desvio padrão da população total de linfócitos, em (b) timo, (d) baço, (f) linfonodo, (h) peritônio, (j) sangue e (l) tumor. Teste *t* para amostras independentes, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $\alpha = 0,05$.

2.3.6. *O tratamento com CPA aumenta níveis de IL-10 no microambiente tumoral.*

Uma vez que a CPA pode influenciar na produção de citocinas, [15] os perfis de citocinas dos padrões Th1, Th2 e Th17 no soro e no microambiente tumoral foram determinadas (Figura 6(a) e (b), respectivamente). Análises das citocinas séricas não revelaram diferenças significativas entre os grupos, na produção de IL-2 ($p>0,5$), IL-4 ($p>0,4$), IL-6 ($p>0,8$), IL-10 ($p>0,2$), IL-17 ($p>0,8$), TNF- α ($p>0,5$) e INF- γ ($p>0,4$).

Análises das mesmas citocinas presentes no microambiente tumoral não revelaram diferenças entre os grupos nos níveis de IL-2 ($p>0,09$), IL-4 ($p>0,30$), IL-6 ($p>0,31$), IL-17 ($p>0,10$), TNF- α ($p>0,31$) e INF- γ ($p>0,33$). Entretanto, apesar de não ter diferença estatística entre os grupos na produção de IL-2 e IL-17, é importante ressaltar que houve tendência de aumento destas citocinas no microambiente tumoral de animais tratados com CPA quando comparados com o grupo salina. Em contraste, a IL-10 apresentou aumento no grupo tratado, enquanto no grupo salina (controle) sua produção não foi detectada.

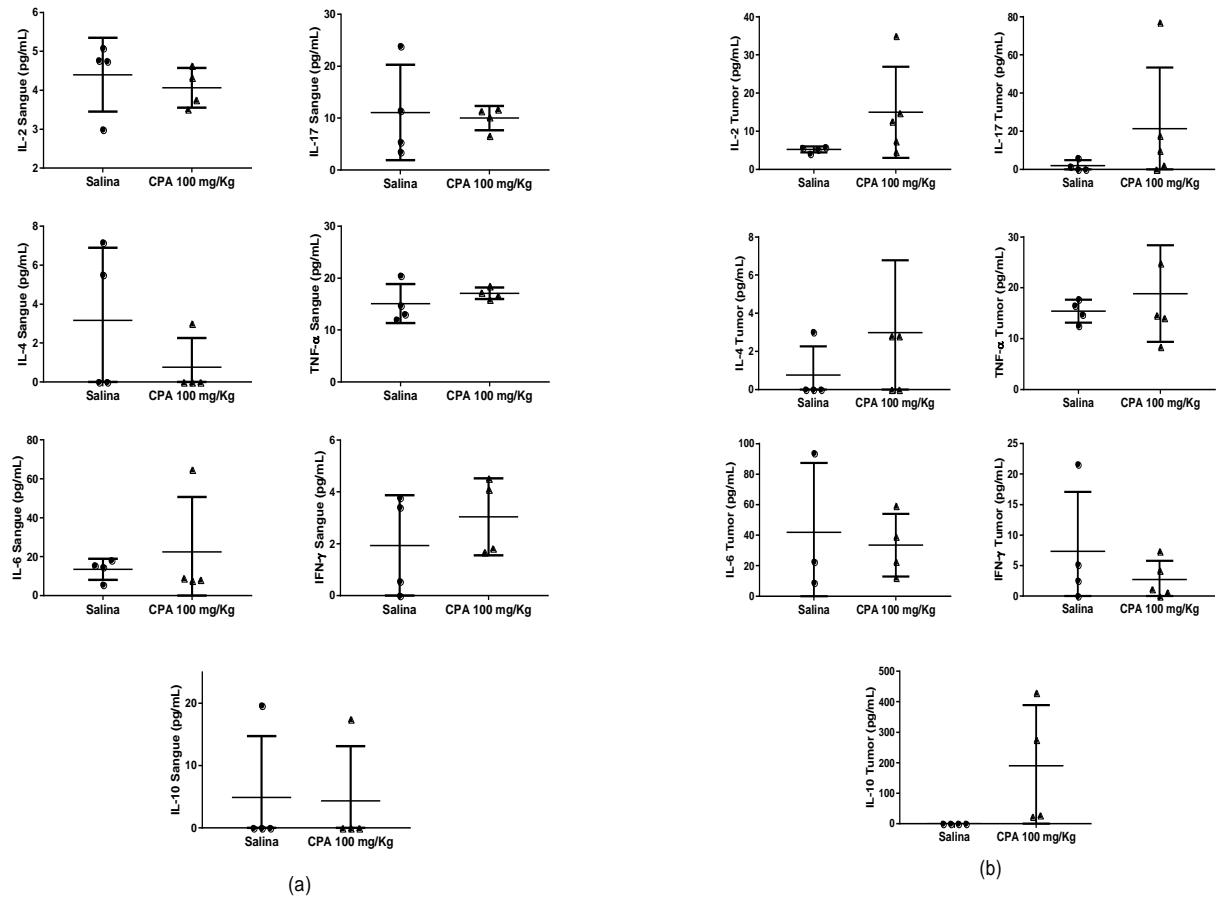


Figura 6: Citocinas presentes no soro e tumor de animais pré-tratados com CPA ou solução salina e inoculados com células B16F10. Animais do grupo com tumor foram tratados com CPA por duas semanas antes da inoculação de células B16F10. Catorze dias após desafio tumoral os animais foram eutanasiados para colheita de sangue total por punção cardíaca e remoção cirúrgica do tumor para dosagem de citocinas referentes aos padrões Th1/Th2/Th17 no soro (a) e microambiente tumoral (b). Colunas representam médias e desvio padrão dos níveis das citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e INF- γ . Interleucina (IL), picograma (pg). Teste t para amostras independentes ou teste U de Mann-Whitney, $\alpha=0,05$. Colunas representam médias + desvio padrão.

2.3.7. CPA induz redução das populações de neutrófilos e macrófagos no microambiente tumoral.

Uma vez que houve uma maior produção de IL-10 e IL-17 no tumor de animais tratados com CPA, foi avaliado se houve diferença no percentual nas populações granulocíticas (monócitos/macrófagos e neutrófilos) no sangue total e no microambiente tumoral. No sangue, não foram observadas diferenças tanto no percentual ($p>0,12$ e $p>0,34$) como no número absoluto de monócitos e neutrófilos ($p>0,22$ e $p>0,34$, respectivamente), conforme indicado na Figura 7(b).

No tumor, devido à baixa quantidade de células encontradas nos animais tratados com CPA, não foi possível avaliar diferenças percentuais entre os grupos. Entretanto, o número total de macrófagos ($p>0,03$) e neutrófilos ($p>0,043$) foi estaticamente menor em animais tratados com CPA (Figura 7(d)).

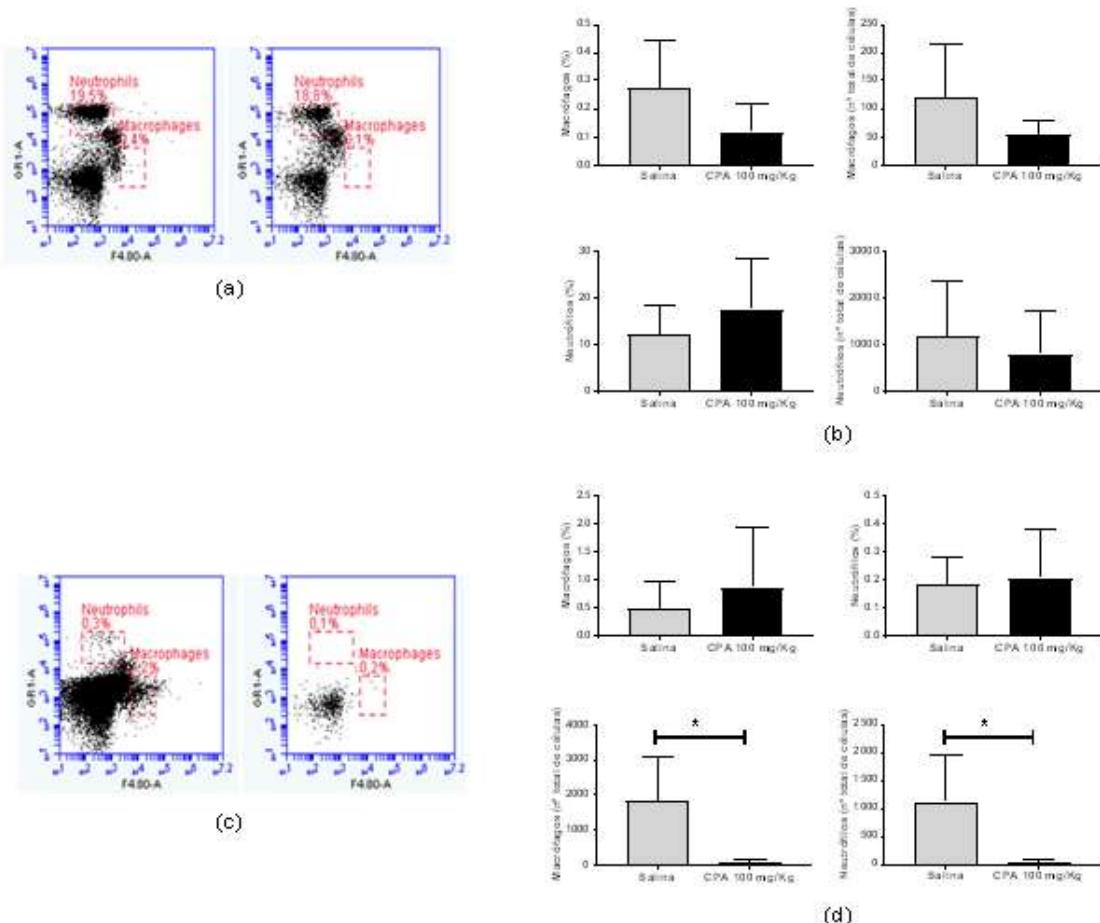


Figura 7: Análise percentual do percentual de neutrófilos e macrófagos em animais tratados com CPA ou solução salina, inoculados com células B16F10. Animais foram tratados com CPA por duas semanas antes da inoculação de células B16F10. Catorze dias após desafio tumoral os animais foram eutanasiados e após eutanásia o tumor foi removido cirurgicamente para análise por citometria de fluxo. Resultados representativos do percentual de neutrófilos e macrófagos em (a) sangue, (c) tumor. Colunas representam média percentual e desvio padrão da população de neutrófilos e macrófagos, em (b) sangue e (d) tumor. Teste *t* para amostras independentes, * $p < 0,05$, $\alpha = 0,05$.

2.3.8. Tratamento com CPA reduz significativamente os níveis séricos de MMP-9 em animais com melanoma

As MMPs são proteínas envolvidas em remodelação tecidual, que no câncer, podem favorecer desenvolvimento de metástases e invasão pela degradação de matriz extracelular. Por esta razão foi avaliado presença de MMP-2 e MMP-9 no soro e microambiente tumoral pela técnica de zimografia. Conforme mostrado na Figura 8(a), foi evidenciada diminuição da intensidade das bandas referentes à pró-MMP-9 no soro de animais tratados com CPA quando comparados aos animais do grupo salina ($p<0,03$). Em contraste, no microambiente tumoral (Figura 8(b)) não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos em relação aos níveis de ambas as metaloproteases (MMP-9 e MMP-2). Entretanto, é possível observar que os níveis de pró-MMP-9 tendem ser menores em animais tratados com CPA, quando comparados ao grupo salina.

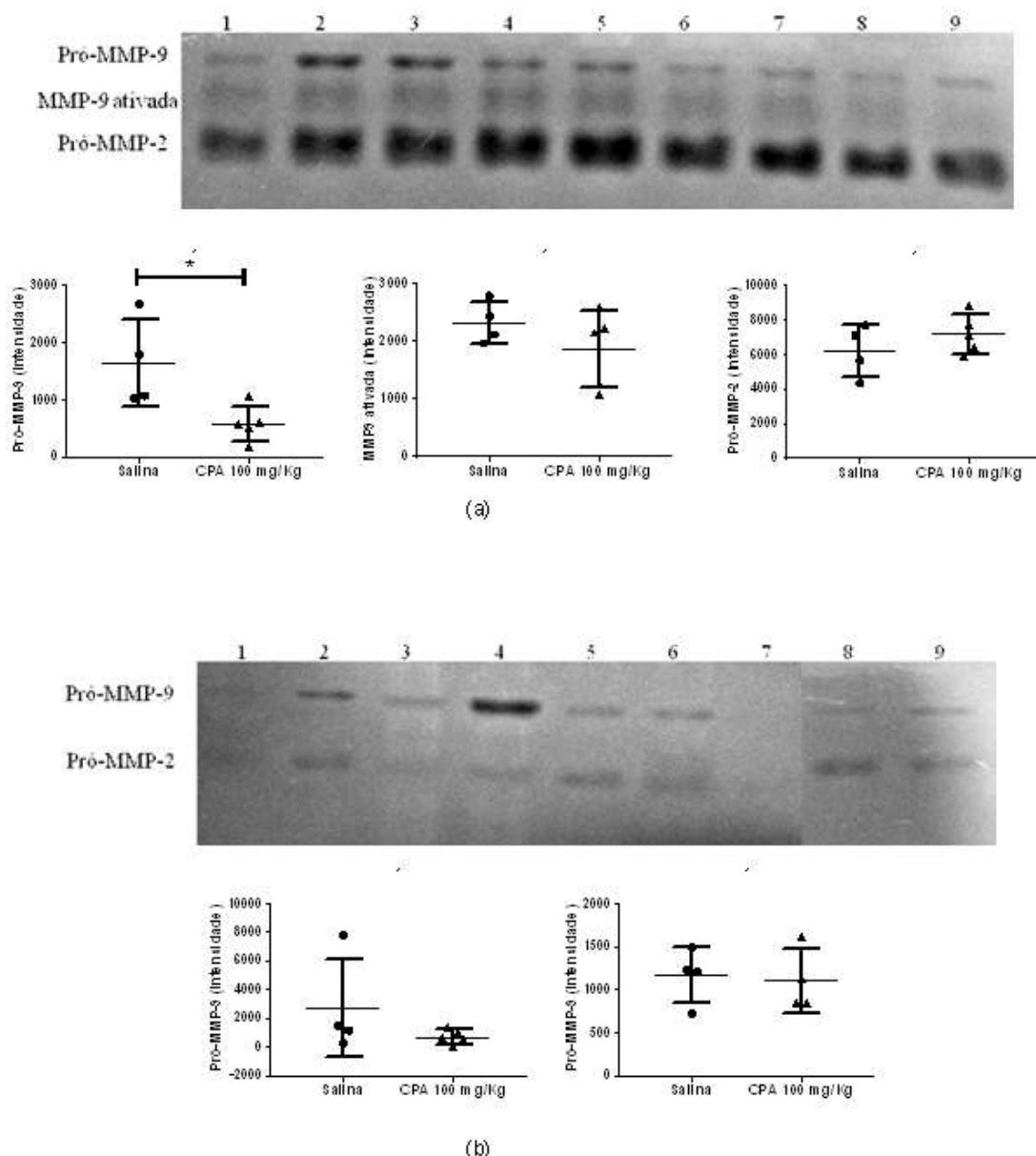


Figura 9: Detecção de MMP-2 e MMP-9 no soro e lisado tumoral em animais pré-tratados com CPA ou solução salina e inoculados com células B16F10. Animais foram eutanasiados 14 dias após inoculação de células B16F10. O sangue foi colhido por punção cardíaca e o tumor removido cirurgicamente para detecção de MMP-2 e MMP-9 por zimografia. (a) Gel de zimografia realizado com soro de animais tratados com solução salina (1-4) e CPA (5-9), representando MMP-9 (pró e ativada) e MMP-2 (pró) e análise da intensidade das bandas no gel de zimografia do soro. (b) Gel de zimografia realizado com lisado tumoral de animais tratados com solução salina (1-4) e CPA (5-9), representando pró-MMP-9 e pró-MMP-2 e Intensidade das bandas no gel de zimografia do lisado tumoral. Teste t para amostras independentes, $\alpha=0,05$, * $p < \alpha$. Imagens foram obtidas por fotodocumentador GE ImageQuant LAS4000. Intensidade de pixels das bandas foram analisadas por software ImageJ.

2.4. Discussão

O presente trabalho mostrou que animais tratados com CPA apresentaram menor crescimento do tumor e esta resposta está relacionada com a dose utilizada, uma vez que o menor volume tumoral foi observado no grupo tratado com a maior concentração (100 mg/Kg). Animais do grupo controle apresentaram tendência de morte prematura, uma vez que todos os animais morreram antes de dez dias do fim do experimento, onde ainda três animais do grupo tratado permaneciam vivos. Estes animais que ainda sobreviveram (e em geral os animais dos grupos tratados) apresentaram maior dinamismo e mobilidade, padrão oposto ao apresentado pelos animais do grupo salina (dados não apresentados). Previamente, Kim e colaboradores (2013) desafiaram camundongos C57BL/6 com células B16F10 por via s.c. e, após uma semana, administraram 100 mg/Kg de CPA observando retardo no crescimento tumoral com aumento da sobrevida dos animais (13). Os dados aqui apresentados estão de acordo com a literatura ao mostrar que CPA diminui a velocidade do crescimento do melanoma em modelo murino. Além disso, esta resposta não é diferente quando o tratamento é realizado antes ou após desafio tumoral.

Apesar de ser um quimioterápico antineoplásico, estudos em modelos de xenoenxerto de fibrossarcoma e carcinoma de pulmão relataram que tratamento com CPA pode induzir ocorrência de metástases (16, 17, 18). Entretanto não há relatos na literatura que a CPA possa favorecer metástases em modelo de melanoma. O modelo de metástase pulmonar através da injeção intravenosa de células tumorais é o modelo mais empregado para avaliar a ocorrência de metástases no pulmão (19). Estudo utilizando este modelo verificou que tratamento com CPA uma semana após desafio tumoral diminuiu a ocorrência de nódulos tumorais no pulmão (13).

Em nosso estudo não foi possível avaliar a influência de CPA em metástases de melanoma, devido as limitações do modelo empregado, no qual não são observadas metástases espontâneas. Apesar de não ser observado células tumorais nas análises histológicas de outros tecidos distantes do tumor primário, é interessante notar que tumores de animais do grupo sem tratamento (salina)

apresentaram invasão perineural, muscular, e no tecido adiposo, características que não foram observadas no grupo de animais tratados com CPA.

As características acima descritas acima, associadas ao menor crescimento do tumor nos animais do grupo tratado com CPA sugerem que o tratamento com CPA interfere tanto com o crescimento como progressão do melanoma. Assim, estes dados em consonância com relatos da literatura fornecem indícios de que, no modelo de melanoma murino, a CPA aumenta a sobrevida de animais com melanoma, provavelmente por diminuir a capacidade invasiva e metastática do tumor.

Análises histológicas do fígado evidenciaram maior degeneração vacuolar no grupo de animais tratados com CPA. A degeneração vacuolar é uma lesão celular reversível, observada por acúmulos de substâncias em grandes vacúolos no citoplasma de células, que pode evoluir para morte celular (20). Estudos clínicos relataram hepatotoxicidade da CPA, mesmo em baixas doses (21, 22). Este aumento na degeneração vacuolar induzido pela CPA não foi demonstrada até o momento em modelos animais. Embora inespecífica, esta lesão esteve presente de forma acentuada em animais do grupo tratado com CPA, o que pode estar associada ao efeito hepatotóxico do fármaco.

O principal mecanismo da inativação da CPA no organismo é através da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) presente em diversas células (15). Linfócitos expressam baixos níveis de ALDH e por isso são suscetíveis à CPA levando à depleção de células B e T (23). Após depleção linfocitária há uma fase de recuperação pela proliferação extensiva de linfócitos, e esta proliferação pode influenciar na ativação de células T específicas contra o tumor (24, 25). A CPA administrada em altas doses geralmente possui ação imunossupressora e pode diminuir a população de linfócitos CD19⁺ de forma mais expressiva, entretanto em doses menores têm sido associadas com aumento das respostas imunológicas (26).

O aumento no percentual de linfócitos T CD4⁺ observado no presente trabalho pode estar relacionado com a fase de recuperação e proliferação após administração de CPA. Células T CD4⁺ podem se diferenciar em Th1, Th2 e Th17, classificadas de acordo com suas funções, expressão de fatores de transcrição e perfil de citocinas produzidas (27, 28). A resposta Th1 tem sido descrita como pró-inflamatória e antitumoral, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias favorecendo ativação de respostas celulares orquestradas por células T CD8⁺, NK,

NKT e ativação dos macrófagos para via clássica (Macrófagos M1) (29). A resposta Th2 está relacionada à produção de citocinas antiinflamatórias que regulam negativamente respostas Th1 e promovem ativação alternativa de macrófagos (macrófagos M2) que está associada à progressão do tumor (29). Já as células Th17 possuem respostas controversas em relação aos tumores, podendo favorecer sua progressão pela da indução de angiogênese e induzir perfil regulador do sistema imunológico ou ainda favorecer respostas antitumorais pelo recrutamento de fagócitos ou células citotóxicas que desempenham respostas efetoras que inibem a progressão do tumor (30, 31).

Nas análises do perfil de citocinas no sangue não foi possível identificar diferenças nos perfis Th1/Th2/Th17. Entretanto, na análise do perfil de citocinas no microambiente tumoral, apesar de não ser observada diferença estatística nota-se aumento de IL-17 em animais tratados com CPA. A IL-17 é considerada a principal citocina produzida por células Th17, e estudos indicam que IL-17 pode contribuir para uma resposta antitumoral (32). Segundo relatos da literatura, CPA pode induzir diferenciação de células CD4⁺ em células Th17, e a presença destas células específicas contribuem na resposta contra o melanoma murino (31, 34).

Assim, uma das hipóteses levantadas no presente trabalho é que a CPA pode ter influenciado na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em células Th17, sendo direcionada ao tumor após reconhecimento antigênico. No tumor, pode ter contribuído para uma resposta antitumoral de forma direta, ou pela produção de IL-17, contribuindo assim para o menor crescimento tumoral observado nos animais do grupo CPA.

Outro achado interessante observado foi a presença da citocina IL-10 no microambiente tumoral apenas de animais do grupo CPA. A IL-10 é uma citocina antiinflamatória pleiotrópica, produzida por vários tipos de células, como queratinócitos, células tumorais e muitas células do sistema imunológico (35, 36). Por sua atividade reguladora, é uma citocina que pode favorecer o crescimento do tumor através da regulação negativa da resposta imune antitumoral (37). Entretanto, foi demonstrado que IL-10 pode exercer atividade antitumoral, através de suas propriedades antiangiogênicas e antimetastáticas, pela regulação negativa do fator de crescimento endotelial (VEGF) e metaloprotease MMP-9 (38).

Além disso, o microambiente tumoral de animais tratados com CPA apresentou baixa quantidade de macrófagos e neutrófilos. No microambiente

tumoral, os macrófagos associados aos tumores (TAMs) frequentemente são polarizados para um perfil regulador (M2), e assim, sua presença em tumores está associada à progressão do tumor e ao prognóstico ruim (39). De forma semelhante, aos TAMs, os neutrófilos associados ao tumor (TANs) podem possuir fenótipo “N1”, com resposta antitumoral, e fenótipo “N2” com resposta pró-tumoral (40). Entretanto, a maioria dos estudos têm evidenciado que a presença de TAN no tumor favorece sua progressão, promovendo a angiogênese tumoral e produção de MMP-9 (41, 42, 43). A CPA pode ter influenciado na diminuição destas células no tumor, o que contribuiu para um menor crescimento e menor invasão.

Sabe-se que inicialmente o crescimento do melanoma ocorre de forma horizontal ao longo da epiderme e, em seguida, ocorre a fase do crescimento vertical, onde o tumor invade níveis mais profundos da derme. Este comportamento é influenciado pela dinâmica do microambiente tumoral (44). As MMPs, principalmente as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) colaboram nesta comunicação através da degradação da matriz extracelular, contribuindo com o processo de invasão e metástase (45). No presente estudo foi mostrado que houve diminuição de MMP-9 no soro de animais tratados com CPA. Já no microambiente tumoral não houve diferença estatística, embora seja possível observar tendência de diminuição de pró-MMP-9 em animais do grupo CPA.

Em conjunto, os dados aqui apresentados mostram que animais do grupo CPA apresentam menor crescimento tumoral e os tumores destes animais apresentaram menor invasão de tecidos adjacentes. Este efeito pode estar relacionado com a redução de neutrófilos e macrófagos no microambiente tumoral, pela ação da CPA. Considerando que a IL-10 pode regular negativamente a síntese de MMP-9, e que a expressão de MMP-9 foi menor em animais com CPA, os dados aqui apresentados fornecem indícios de que a diminuição de MMP-9 pode estar associada ao aumento de IL-10 no microambiente tumoral. Esta IL-10 pode regular a produção de MMP-9 seja por diminuir sua síntese em células fontes da proteína (fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, células tumorais) ou por regular a presença de estas células no microambiente tumoral (neutrófilos, macrófagos). Assim, Uma vez que MMP-9 está relacionado à invasão e metástases, a diminuição na expressão desta proteína no soro e o aumento de IL10 e diminuição de macrófagos e neutrófilos no microambiente tumoral podem ser os mecanismos responsáveis por menor crescimento e progressão do melanoma observado nos animais do grupo

com CPA. Estes dados são de extrema relevância já que fornecem dados inéditos dos possíveis mecanismos de ação da CPA, abrindo novas abordagens terapêuticas para prevenção e tratamento de tumores altamente agressivos como o melanoma.

2.5 Conclusões

Tratamento com CPA inibiu o crescimento do tumor e diminui invasão de tecidos adjacentes. Esta condição estava vinculada à diminuição de neutrófilos e macrófagos, assim como aumento das citocinas IL-10 e IL-17 no microambiente tumoral, e diminuição de MMP-9 no soro, os quais possivelmente são os fatores responsáveis por estes achados. Além disso, houve aumento da população de linfócitos T CD4⁺ no sangue, órgãos linfoideos e peritônio, que também pode ter contribuído neste efeito.

Declaração de Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

2.6 Material Suplementar

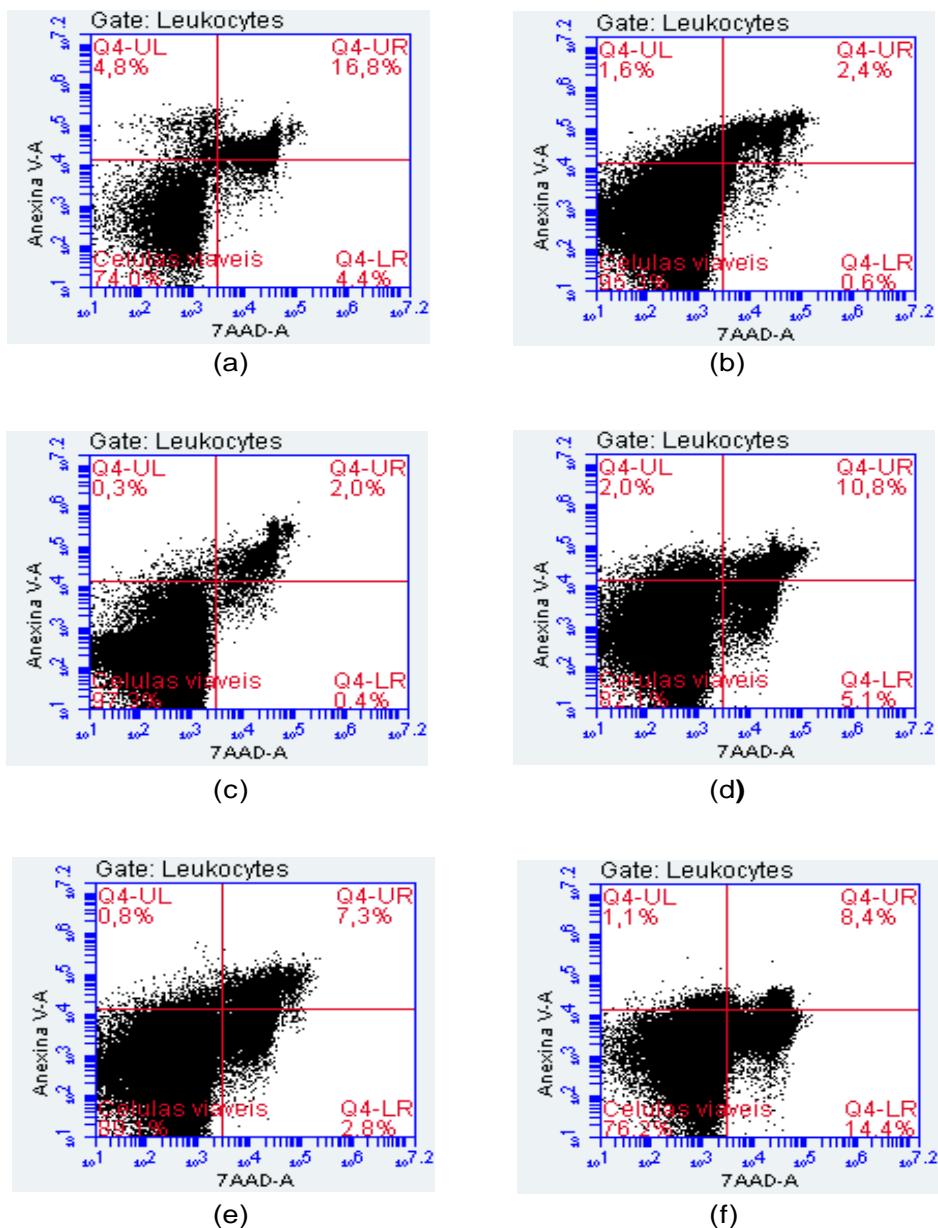


Figura S1: Marcação de viabilidade por 7-AAD e anexina. Animais do grupo com tumor foram pré-tratados com CPA por duas semanas antes da inoculação de células B16F10. Catorze dias após desafio tumoral os animais foram eutanasiados. Órgãos e tecidos foram colhidos para análise da viabilidade por 7AAD e anexina. Resultados representativos de células viáveis em (a) sangue (b) tumor, (c) peritônio, (d) linfonodo, (e) baço, (f) timo.

2.7 Referências

1. Ingraffea A. Melanoma. *Facial Plast Surg Clin North Am.*; 2013;21(1):33–42.
2. Shannan B, Perego M, Somasundaram R, Herlyn M. Heterogeneity in Melanoma. *Cancer Treat Res.*; 2016;167:1–15.
3. Klein O, Davis ID, McArthur GA, Chen L, Haydon A, Parente P, et al. Low-dose cyclophosphamide enhances antigen-specific CD4(+) T cell responses to NY-ESO-1/ISCOMATRIX vaccine in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol Immunother.*; 2015;64(4):507–18.
4. Irenaeus S, Schiza A, Mangsbo SM, Wenthe J, Eriksson E, Krause J, et al. Local irradiation does not enhance the effect of immunostimulatory AdCD40L gene therapy combined with low dose cyclophosphamide in melanoma patients. *Oncotarget.* 2017;8(45):78573–87.
5. Mikhaylova IN, Shubina IZ, Chkadua GZ, Petenko NN, Morozova LF, Burova OS, et al. Immunological monitoring for prediction of clinical response to antitumor vaccine therapy. *Oncotarget.*; 2018;9(36):24381–90.
6. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.*; 2007;56(5):641–8.
7. Yamauchi K, Yang M, Hayashi K, Jiang P, Yamamoto N, Tsuchiya H, et al. Induction of cancer metastasis by cyclophosphamide pretreatment of host mice: an opposite effect of chemotherapy. *Cancer Res. United States*; 2008;68(2):516–20.
8. Hung C-M, Hsu Y-C, Chen T-Y, Chang C-C, Lee M-J. Cyclophosphamide promotes breast cancer cell migration through CXCR4 and matrix metalloproteinases. *Cell Biol Int. England*; 2017;41(3):345–52.
9. Man S, Zhang Y, Gao W, Yan L, Ma C. Cyclophosphamide promotes pulmonary metastasis on mouse lung adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis.*; 2008;25(8):855–64.
10. Park SI, Liao J, Berry JE, Li X, Koh AJ, Michalski ME, et al. Cyclophosphamide creates a receptive microenvironment for prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res. United States*; 2012;72(10):2522–32.
11. Van Daalen EE, Rizzo R, Kronbichler A, Wolterbeek R, Bruijn JA, Jayne DR, et al. Effect of rituximab on malignancy risk in patients with ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.*; 2017;76(6):1064–9.
12. Heijl C, Harper L, Flossmann O, Stucker I, Scott DGI, Watts RA, et al. Incidence of malignancy in patients treated for antineutrophil cytoplasm antibody-associated

- vasculitis: follow-up data from European Vasculitis Study Group clinical trials. *Ann Rheum Dis.*; 2011;70(8):1415–21.
13. Kim D-J, Kim E-J, Lee T-Y, Won J-N, Sung M-H, Poo H. Combination of poly-gamma-glutamate and cyclophosphamide enhanced antitumor efficacy against tumor growth and metastasis in a murine melanoma model. *J Microbiol Biotechnol.*; 2013; 23(9):1339–46.
 14. Hu X, Beeton C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. *J Vis Exp.*; 2010(45).
 15. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol.*; 2009;6(11):638–47.
 16. Yamauchi K, Yang M, Hayashi K, Jiang P, Yamamoto N, Tsuchiya H, et al. Induction of cancer metastasis by cyclophosphamide pretreatment of host mice: an opposite effect of chemotherapy. *Cancer Res.*; 2008;68(2):516–20.
 17. Park SI, Liao J, Berry JE, Li X, Koh AJ, Michalski ME, et al. Cyclophosphamide creates a receptive microenvironment for prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res.*; 2012;72(10):2522–32.
 18. Man S, Zhang Y, Gao W, Yan L, Ma C. Cyclophosphamide promotes pulmonary metastasis on mouse lung adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis.*; 2008;25(8):855–64.
 19. Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol.* United States; 2001;Chapter 20:Unit 20.1.
 20. Universidade Estadual de Londrina. Degenerações [Internet]. Disponível em: <http://www.uel.br/cca/dmvp/pages/arquivos/DEGENERA%C3%87%C3%83O.pdf>
 21. de Jonge ME, Huitema ADR, Beijnen JH, Rodenhuis S. High exposures to bioactivated cyclophosphamide are related to the occurrence of veno-occlusive disease of the liver following high-dose chemotherapy. *Br J Cancer.*; 2006;94(9):1226–30.
 22. Subramaniam SR, Cader RA, Mohd R, Yen KW, Ghafor HA. Low-dose cyclophosphamide-induced acute hepatotoxicity. *Am J Case Rep.* 2013;14:345–9.
 23. Brodsky RA. High-dose cyclophosphamide for autoimmunity and alloimmunity. *Immunol Res.*; 2010;47(1–3):179–84.
 24. Hirschhorn-Cyberman D, Rizzuto GA, Merghoub T, Cohen AD, Avogadri F, Lesokhin AM, et al. OX40 engagement and chemotherapy combination provides potent antitumor immunity with concomitant regulatory T cell apoptosis. *J Exp Med.*; 2009;206(5):1103–16.
 25. Brode S, Cooke A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit Rev Immunol.*; 2008;28(2):109–26.

26. Brode S, Raine T, Zaccone P, Cooke A. Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.*; 2006;177(10):6603–12.
27. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytom Part A.* 2014;85(1):36–42.
28. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol.*; 2010;28:445–89.
29. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.*; 2013;19(11):1423–37.
- 30 1. Guery L, Hugues S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *Biomed Res Int.*; 2015;2015:314620.
- 31 1. Asadzadeh Z, Mohammadi H, Safarzadeh E, Hemmatzadeh M, Mahdian-shakib A, Jadidi-Niaragh F, et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cell Immunol Elsevier*; 2017;322:15–25.
32. 1. Viaud S, Flament C, Zoubir M, Pautier P, LeCesne A, Ribrag V, et al. Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res.* 2011;71(3):661–5.
33. 1. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood.*; 2009;114(2):357–9.
34. Viaud S, Flament C, Zoubir M, Pautier P, LeCesne A, Ribrag V, et al. Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res.* 2011;71(3):661–5.
34. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood.* 2008;112(2):362–73.
35. Zhao H, Yang J, Yu Z, Shen H, Huang X, Zhang M. Synthetic analysis of associations between IL-10 polymorphisms and skin cancer risk. 2018;9(6):6728–36.
36. Sheikhpour E, Noorbakhsh P, Foroughi E, Farahnak S, Nasiri R, Neamatzadeh H. A Survey on the Role of Interleukin-10 in Breast Cancer: A Narrative. *Reports Biochem Mol Biol.* 2018;7(1):30–7.
37. Wiguna AP, Walden P. Role of IL-10 and TGF- β in melanoma. *Exp Dermatol.* 2015;24(3):209–14.
38. Vinod C, Jyothy A, Vijay kumar M, Raghu Raman R, Nallari P, Venkateshwari A. A Common SNP of IL-10 (-1082A/G) is Associated With Increased Risk of Premenopausal Breast Cancer in South Indian Women. *Iran J Cancer Prev.* 2015;8(4).

39. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res.*; 2016;39(11):1588–96.
40. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell.* 2009;16(3):183–94.
41. Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(51):20262–7
42. Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med.*; 2010;16(2):219–23.
43. Mishalian I, Bayuh R, Eruslanov E, Michaeli J, Levy L, Zolotarov L, et al. Neutrophils recruit regulatory T-cells into tumors via secretion of CCL17 - A new mechanism of impaired antitumor immunity. *Int J Cancer.* 2014;135(5):1178–86.
44. Moro N, Mauch C, Zigrino P. Metalloproteinases in melanoma. *Eur J Cell Biol* Elsevier; 2014;93(1–2):23–9.
45. Ribeiro RIMA, Borges Júnior PC, Cardoso SV, Candelori I, Espíndola FS, Cassali GD et al. Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2008 ; 44(2): 115-121.

ANEXO A – Certificado de aprovação CEUA



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO IN VIVO DO EFEITO DA CICLOFOSFAMIDA NO MODELO DE MELANOMA MURINO", registrada com o nº 042/17, sob-responsabilidade de "ELIZABETH CRISTINA PÉREZ HURTADO e THIAGO ALBUQUERQUE VIRAÇÃO" que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais (CEUA) da UNIP, em reunião de 21/06/2017.

Finalidade	Ensino ()	Pesquisa Científica (x)
Vigência de autorização		01/08/2017 31/12/2018
Espécie / linhagem/ raça		CAMUNDONGO ISOGENICO
Nº de animais		67
Peso / idade		25G/8SEM
Sexo		Femea
Origem	LABORATÓRIO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (SPF) DO CENTRO DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE PAULISTA	

Juliana Guizi

Secretaria da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Universidade Paulista – UNIP

Campus: INDIANÓPOLIS
 Rua: Doutor Bacelar, 1212 – Vila Clementino – São Paulo – SP – CEP: 04026-000
 Fone: (11) 5586-4091 – Fax: (11) 5586-4073
 E-mail: ceua@unip.br – <http://www.unip.br>