

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

**CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA
IMUNE APÓS DESAFIO COM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO 4T1**

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

EDILAINE SUDRE MARCELINO DO NASCIMENTO

**SÃO PAULO
2014**

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

**CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA
IMUNE APÓS DESAFIO COM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO 4T1**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Cristina
Pérez Hurtado.

EDILAINE SUDRE MARCELINO DO NASCIMENTO

**SÃO PAULO
2014**

do Nascimento, Edilaine Sudre Marcelino. .

Cinética de migração de células do sistema imune após desafio com células de adenocarcinoma mamário 4T1 / Edilaine Sudre Marcelino do Nascimento. - 2014.

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

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2014.

Área de concentração: Biologia da Diferenciação e Transformação Celular; Modulação por Fatores Endógenos e Exógenos.

Orientadora: Prof. Dra. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado.

1. Adenocarcinoma mamário 4T1. 2. Microambiente tumoral. 3. Linfócitos B-1. I. Hurtado, Elizabeth Cristina Pérez (orientadora). II. Título.

EDILAINE SUDRE MARCELINO DO NASCIMENTO

**CINÉTICA DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA
IMUNE APÓS DESAFIO COM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO 4T1**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado 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. Dr. Bruno Camolese
Universidade de São Paulo

_____/_____
Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin
Universidade Paulista

_____/_____
Profa. Dra. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado (Orientadora)
Universidade Paulista

A minha mãe Maria Salete, meus filhos Erick e Bruno, meu esposo
Benefrancis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade, a minha mãe Maria Salete Sudré ao meu saudoso pai Waldemar Marcelino Neto (em memória), pela minha educação e caráter, aos meus filhos Bruno Sudré e Erick Sudré e o meu esposo Benefrancis do Nascimento, pela força e compreensão.

Agradeço também ao meu tio Gilmar, as minhas irmãs Edmeia Sudré e Elenice Sudré pelo apoio e incentivo.

A minha orientadora Dra. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado, pela paciência, oportunidade e apoio na elaboração do meu trabalho.

A Dra. Fabiana Toshie pela ajuda no desenvolvimento do meu trabalho, e toda a equipe do laboratório de biologia molecular da Universidade Paulista –UNIP.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, assim como a Capes por me fornecer a bolsa de mestrado para realizar o meu sonho de ser mestre.

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer".

Albert Einstein

RESUMO

Diversos autores têm demonstrado que interações entre o tumor e as células não tumorais presentes no local onde ele desenvolve, podem promover tanto a eliminação como sua progressão. Embora diversos trabalhos tenham mostrado presença de macrófagos, linfócitos T e B no microambiente tumoral, até o momento, pouco é conhecido em relação à cinética de migração destas células ao local onde o tumor se desenvolve. Assim, o intuito do presente trabalho foi verificar o recrutamento destas células ao local onde o tumor se desenvolve no modelo de adenocarcinoma mamário. Para isto, camundongos fêmeos da linhagem BALB/c foram injetados ou não subcutaneamente, com PBS ou com células de adenocarcinoma mamário 4T1. Após 2, 7, 14 e 30 dias da injeção, os animais foram eutanaseados e células do lavado peritoneal, baço, linfonodo e local de injeção foram coletadas e submetidas a análises por citometria de fluxo para expressão de CD45, CD19, CD23, CD11b, CD4. Resultados obtidos no presente trabalho mostram, como esperado, presença de células do sistema imune nos primeiros dias após implantação do tumor. Interessantemente, dados inéditos evidenciam aumento da população de linfócitos B-1 no sítio do tumor e diminuição dos mesmos na cavidade peritoneal após 2 dias de inoculação do tumor. Em conjunto, os dados aqui apresentados sugerem pela primeira vez, que os linfócitos B-1 podem ter um papel de destaque no desenvolvimento do câncer de mama seja impedindo ou favorecendo a progressão e metastatização deste tipo de tumor.

Palavras-chave: Adenocarcinoma mamário 4T1. Microambiente tumoral. Linfócitos B-1.

ABSTRACT

Several authors have shown that interactions between tumor and non-tumor cells in the place where it develops, can promote both the elimination as its progression. Although several studies have shown the presence of macrophages, T and B lymphocytes in the tumor microenvironment, to date, little is known in relation to migration kinetics of these cells to the site of the tumor develops. Thus, the aim of this work was to determine the recruitment these cells to the tumor microenvironment in breast adenocarcinoma model. For this, BALB/c female mice were subcutaneously injected or not with PBS or with 4T1 mammary adenocarcinoma cells. After 2, 7, 14 and 30 of injection, the animals were euthanized and cells from peritoneal cavities, spleen, spleen, lymph node and injection site were collected and subjected to analysis by flow cytometry for expression of CD45, CD19, CD23, CD11b, CD4. As expected, results showed the presence of immune cells in the first days after tumor implantation. In addition, we demonstrated increase of B-1 lymphocytes in the tumor site and decrease of these cells in the peritoneal cavities after 2 days of tumor inoculation. Taken together, our findings suggest that B-1 lymphocytes are present in the tumor microenvironment of breast adenocarcinoma model. These observations may contribute to the discovery of new targets for prevention or treatment of tumors with high malignant potential.

Key-words: 4T1 breast cancer. Tumor microenvironment. B-1 lymphocytes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1.1. Animais.....	11
2.1.2. Cultura de células 4T1de adenocarcinomama mamário 4T1.....	11
2.1.3. Desafio tumoral.....	11
2.1.4. Citometria de fluxo.....	12
2.1.5. Histologia.....	13
2.1.6. Análises estatísticas.....	14
3. REFERÊNCIAS.....	15
4. ARTIGO.....	17
Aumento de macrófagos no microambiente do tumor de mama pode estar associado a diminuição de linfócitos B-1 no peritônio.....	17
Resumo.....	17
Introdução.....	18
Materiais e métodos.....	20
Animais.....	20
Cultura de Células de células de adenocarcinoma mamário 4T1.....	20
Desafio tumoral.....	20
Citometria de fluxo.....	21
Histologia.....	21
Análises estatísticas.....	21
Resultados.....	22
Discussão.....	30
Conclusões.....	32
Referências.....	33
ANEXOS.....	36

1. INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda doença que mais causa óbitos no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (INCA, 2014). Muitos fatores estão envolvidos na patogênese, incluindo os fatores biológicos e ambientais, bem como estilo de vida, tabagismo, hereditariedade e hábitos alimentares (PORTER, 2009). Entre os tipos de tumores mais comuns entre a população, o câncer de mama é considerado o mais prevalente entre as mulheres, sendo o responsável pelos 15% de todas as mortes relacionadas ao câncer nesta população (SIEGEL, 2014). A incidência alta de morte no câncer de mama é explicada principalmente pelo diagnóstico tardio da doença, quando a presença de metástases é evidente.

A formação de metástases é um processo complexo no qual as células tumorais adquirem a capacidade de invadir e colonizar sítios distantes do tumor primário. Diversos estudos têm mostrado que a aquisição do fenótipo maligno ou metastático está diretamente relacionada à influência que exerce o microambiente onde as células tumorais se desenvolvem (SPANO, 2012).

O microambiente tumoral é constituído por diversos tipos de células, como fibroblastos, células mesenquimais, bem como células do sistema imune, capazes de produzir quimiocinas, citocinas entre outras moléculas que podem promover alterações fenotípicas nas células tumorais (Revisado por Chew, 2012). Muitas das células não malignas presentes no microambiente tumoral, derivadas da medula óssea, especialmente da linhagem mieloide, são recrutadas pelas células tumorais para favorecer sua viabilidade, crescimento, invasão e disseminação (JOYCE; POLLARD, 2009; ROGERS; HOLEN, 2011; QUAIL; JOYCE, 2013).

As células do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral, tais como as células T, células *natural killer* (NK) e macrófagos associados ao tumor (TAMs), são descritas na literatura como as responsáveis por orquestrar as respostas antitumorais (PAGES, 2010). O número de linfócitos infiltrantes pode servir como um marcador de prognóstico valioso para imunoterapia em muitos tipos de câncer, incluindo câncer de mama, melanoma, câncer de pulmão e câncer de ovário (RODY, 2009). Em contraste, a presença de grande quantidade de macrófagos no microambiente do tumor pode estar associada a um mau prognóstico (CAMPBELL, 2011).

Os TAMs, ou macrófagos associados ao tumor, representam a maior população de leucócitos no microambiente do tumor e são alvos atrativos para a imunoterapia (CAMPBELL, 2011). Eles foram classificados em dois subtipos diferentes, os macrófagos de perfil M1 e M2 (HEUSINKVELD, 2011). Macrófagos do perfil M1 são aqueles induzidos pelo aumento da produção de IFN- γ (via clássica), observado nas respostas de linfócitos T do perfil Th1 (LAOUI, 2011). Algumas das características notáveis dos macrófagos M1 incluem a baixa expressão de citocinas relacionadas com o perfil Th2, tais como a interleucina-4 (IL-4) e a interleucina-10 (IL-10), e a alta expressão de citocinas relacionadas com o perfil Th1, tais como a interleucina-12 (IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Já os macrófagos M2 são células induzidas por citocinas típicas do tipo Th2 (via alternativa), tais como IL-4, IL-10 e IL-13. Os M2 estão envolvidos na formação da angiogênese tumoral (MANTOVANI, 2007), têm capacidade de degradar a matriz extracelular (MEC), favorecendo a progressão tumoral e as metástases (BIOTA, 2012). Uma vez que a presença de macrófagos M-2 é um fator importante para progressão e metastatização dos tumores, estudos recentes com linfócitos B-1 demonstraram o envolvimento destas células na polarização dos macrófagos do perfil M-1 para o perfil M-2 (De Lorenzo et al., 2007; (POLARD, 2009). Entretanto, até o momento não existem estudos *in vivo* mostrando a presença das células B-1 no microambiente tumoral no modelo de adenocarcinoma mamário.

Os linfócitos B-1, um subtipo de linfócito B, encontrados principalmente nas cavidades pleural e peritoneal, já foram descritos por favorecer *in vitro* o crescimento e a metastatização de células de melanoma murino (STAQUICINI et al., 2008; PEREZ et al., 2008). Entretanto, pouco se sabe sobre sua participação no desenvolvimento de outros tumores.

Assim, considerando que o câncer de mama é uma das neoplasias mais agressivas com altas taxas de mortalidade, o intuito deste trabalho foi avaliar a presença de macrófagos, linfócitos T CD4, linfócitos B convencionais e células B-1 no peritônio, baço, linfonodo e no tumor em modelo de adenocarcinoma mamário.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c adultos, pesando entre 25 e 30 gramas, fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram mantidos livres de germes, em microisoladores com água e ração autoclavadas, com temperatura (20 ± 1 °C) e ciclo de luz controlada (ciclo de 12 horas). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Paulista (Protocolo n. 171/13 CEP/ICS/UNIP e certificado em anexo).

Para este estudo, os animais foram divididos em três grupos, cada um com cinco animais, avaliados após 2, 7, 14 e 30 dias do desafio:

- Controle: Animais sem injeção;
- PBS: Animais injetados com 50 µl de PBS 1X;
- Experimental: Animais injetados com células de adenocarcinoma mamário 4T1 ressuspendidas em PBS 1X.

2.1.2 Cultura de células de adenocarcinoma mamário 4T1

As células de adenocarcinoma mamário 4T1 foram cultivadas em meio RPMI (Sigma, St. Louis, MO), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de ciprofloxacina (ambos da Cultilab, Campinas, SP, Brasil), mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. O descolamento das células para posteriores ensaios foi realizado por breve exposição à tripsina (Cultilab).

2.1.3 Desafio tumoral

Os animais correspondentes ao grupo experimental foram injetados subcutaneamente na mama esquerda com 2×10^4 células de adenocarcinoma mamário 4T1, ressuspendidas em 50 µl de PBS 1X.

2.1.4 Citometria de fluxo

Células do baço, linfonodo e do local de injeção das células tumorais (obtidas por maceração do tecido) e lavado peritoneal foram coletadas nos animais dos grupos controle, PBS e experimental após 2, 7, 14 e 30 dias do desafio. Para cada amostra a ser analisada, foram utilizadas de 0,5 a 1×10^6 células. As células coletadas foram lavadas com PBS 1X e incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 por 20 min, para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas por 1 h a 4 °C com o anticorpo de escolha (CD4, CD11B, CD19, CD23 e CD45, todos da BD Biosciences, Mountain View, CA) já conjugado com o fluorocromo desejado, diluído em PBS/BSA 1%. Após incubação com anticorpo, as células marcadas foram lavadas e ressuspensas em 200 µL de PBS 1X para leitura em aparelho de FACS Canto II (BD). Os dados foram analisados usando os *softwares* de análises GraphPad Prism e FlowJo. Para a realização das análises, foram utilizadas as estratégias de *gate* descritas na Figura 1. No baço, linfonodo e peritônio o *gate* denominado linfócitos foi utilizado para caracterizar principalmente as populações linfocitárias. O *gate* denominado fagócitos foi empregado para as análises de células fagocíticas e o *gate* denominado granulócitos, para análises de células granulocíticas. Já no tumor, foi utilizado apenas um *gate* denominado leucócitos, avaliando-se apenas as células CD45⁺. Esta pré-seleção foi realizada para excluir a possibilidade de falsos positivos, uma vez que a população de células tumorais é em número muito maior que a da população leucocitária.

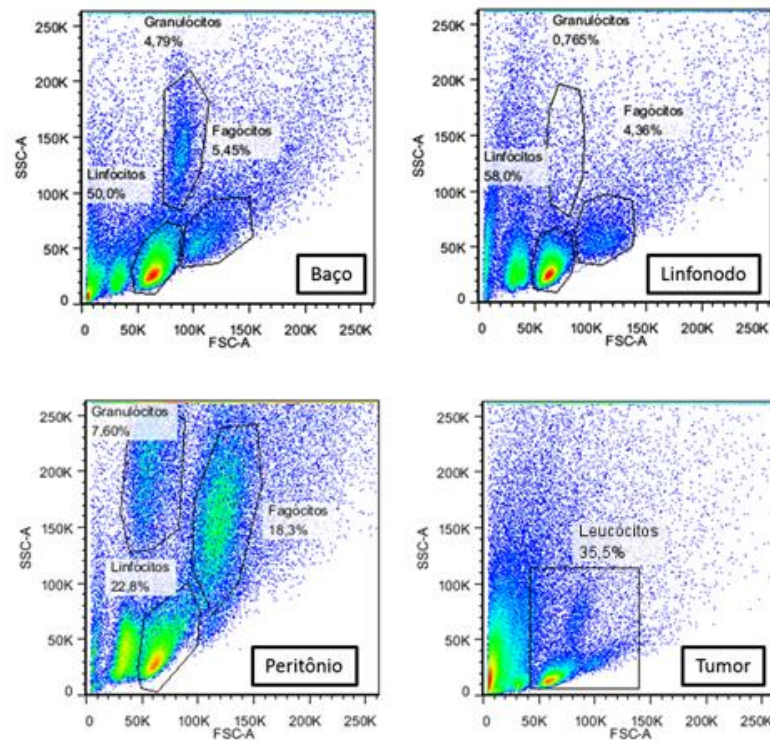


Figura 1: Estratégias de *gates*. Imagem das estratégias de *gates* utilizadas nas análises das populações celulares no baço, linfonodo, peritônio e tumor de camundongos BALB/c após 2, 7, 14 e 30 dias das injeções.

As populações celulares do *gate* granulócitos foram analisadas, entretanto, não foi encontrada significância entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados 2, 7, 14 e 30 dias após os desafios (figura não mostrada).

2.1.5 Histologia

Para avaliar o tipo e a quantidade de infiltrado após 2, 7, 14 e 30 dias do desafio, fragmentos do baço e do tumor (grupo experimental), ou da região correspondente ao local de injeção (grupos controle e PBS) foram coletados e avaliados pela coloração HE (hematoxilina e eosina). Para a obtenção do fragmento do baço, as pontas do órgão foram retiradas, em seguida o órgão foi dividido ao médio, resultando dois fragmentos: um para análises por citometria de fluxo e outro para análises histopatológicas. Já o fragmento analisado do tumor correspondia à metade do material retirado.

O material obtido para as análises histopatológicas foi submetido aos seguintes processos (TIMM, 2005):

- Fixação do material: O material coletado foi fixado em formol 10%. Esta técnica permite aumentar a vida útil do material a ser analisado preservando a sua arquitetura tecidual.
- Inclusão: Este procedimento consiste na impregnação do tecido com uma substância firme que permita posteriormente seccioná-lo em camadas delgadas (cortes). Nesse caso, foi utilizada a parafina, por ter fácil manuseio e excelentes resultados. As etapas da inclusão compreendem a **desidratação**, quando é feita a retirada da água dos tecidos e sua substituição por álcool, já que a parafina não é miscível em água. Em seguida, foi realizada a **diafanização**, que consiste na substituição do álcool dos tecidos por xilol, substância que tem por finalidade, neste procedimento, tornar o tecido translúcido e permeável à luz do microscópico, e, por fim, a **impregnação**, na qual o xilol é substituído por parafina fundida e catalogada em blocos.
- Microtomia: Utilizando micrótomo, são obtidos cortes sucessivos, delgados e uniformes a partir dos blocos de parafina com as amostras de tecidos.
- Montagem da lâmina: Os cortes obtidos por microtomia são, então, desparafinados, reidratados e corados com hematoxilina entre 5 e 15 minutos. Depois de lavados com água corrente por 10 minutos, os cortes são corados com eosina por um período entre 1 e 10 minutos, lavados em água e desidratados em álcool 70% rapidamente. Finalmente, os cortes são montados em lâminas, cobertos com uma lamínula e, em seguida, catalogados para posteriores análises. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico convencional (NIKON ECLIPSE E200, Japão). Os resultados das análises histopatológicas foram utilizados como complemento dos resultados obtidos das análises por citometria de fluxo.

2.1.6 Análises estatísticas

Primeiramente os dados foram submetidos ao teste de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (BioEstat). Conforme esses resultados, as amostras foram classificadas como paramétricas. O teste ANOVA, de uma ou duas vias com o pós-teste Bonferroni, foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. Diferenças com valor de $p \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3. REFERÊNCIAS

Campbell MJ, Tonlaar NY, Garwood ER, Huo D, Moore DH, Khramtsov AI, Au A, Baehner F, Chen Y, Malaka DO, Lin A, Adeyanju OO, Li S, Gong C, McGrath M,

Chew V, Toh HC, Abastado JP Immune microenvironment in tumor progression: characteristics and challenges for therapy. *Oncol.* 2012;2012:608406.

De Lorenzo, B.H.; Brito, R.R.; Godoy, L.C.; Lopes, J.D.; Mariano, M. Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. *Immunol Lett.* v. 114, n. 2, p. 110-118, 2007.

Joyce, J.A. e Pollard, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev.Cancer.* v. 9, n. 4, p. 239-252, 2009.

Heusinkveld M, Van Der Burg S. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med.* 2011;9:216.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : Inca, 2011. 128 p.: il.

Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van den Bossche J, Schouppe E, Mommer C, Nikolaou A, Morias Y, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol.* 2011;55:861–867.

Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer.* 2010;10:112.

Menetrier-Caux C, Faget J, Biota C, Gobert M, Blay JY, Caux C. Innate immune recognition of breast tumor cells mediates CCL22 secretion favoring Treg recruitment within tumor environment. *OncolImmunology.* 2012;1:759–761.

Mukhtar RA, Nseyo Campbell MJ, Esserman LJ. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;11:91–100.

Olopade OI, Esserman LJ. Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128:703–11.

Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 2010;29(8):1093–1102.

Pérez, E.C.; Machado, J.JR.; Aliperti, F.; Freymüller, E.; Mariano, M.;Lopes, J.D. B-1 lymphocytes increase metastatic behavior of melanoma cells through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cancer Sci.* v. 99, n. 5, p. 920-928, 2008.

Porter PL. Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Pública de México.* 2009;51:141–146.

Quail, D.F. e Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 2013.

Rody A, Holtrich U, Pusztai L, Liedtke C, Gaetje R, Ruckhaeberle E, Solbach C, Hanker L, Ahr A, Metzler D, Engels K, Karn T, Kaufmann M. T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2-positive breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2009; 11(2):R15.

Rogers, T.L. e Holen, I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *JTransl. Med.* v. 9, p. 177, 2011.

Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9-29.

Spano D, Zollo M. Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. *Clin Exp Metastasis.* 2012; **29**: 381-95.

Staquicini FI, Tandle A, Libutti SK. et al. (2008) A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesionmolecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans.*Cancer Res.* 68, 8419-28.

4. ARTIGO

(Artigo a ser enviado para *International Journal of Experimental Pathology*).

Aumento de macrófagos no microambiente do tumor de mama pode estar associado à diminuição de linfócitos B-1 no peritônio

Edilaine S. M. do Nascimento¹, José R. Carvalho¹, Fabiana T. C. Konno¹, Leoni V. Bonamim¹, José Guilherme Xavier¹, Elizabeth C. Pérez^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, Brazil². Disciplina de Imunologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Correspondência

Elizabeth C. Pérez Hurtado

Docente do Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – Campus Indianópolis. Av. Dr. José Maria Whitaker, 290 - Vila Clementino - São Paulo – SP - CEP 04057-000 - Tel.: (11) 5594-3207 - Fax: (11) 5594-3207. elicristin@hotmail.com

Os autores declaram não haver qualquer conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade deste trabalho científico.

RESUMO

Interações com os elementos celulares e moleculares que compõem o microambiente onde o tumor se desenvolve são determinantes tanto para a eliminação como para a aquisição de um fenótipo mais agressivo das células tumorais. Por isto, a identificação e caracterização dos componentes do microambiente tumoral são alvos de estudo nos centros de pesquisa do câncer. Embora diversos trabalhos tenham mostrado presença de macrófagos, linfócitos T e B no microambiente tumoral, pouco é conhecido em relação à cinética de migração destas células ao local onde o tumor se desenvolve. Assim, o intuito do presente

trabalho foi verificar a cinética do recrutamento destas células ao local onde o tumor se desenvolve no modelo de adenocarcinoma mamário. Para isto, camundongos da linhagem BALB/c foram injetados ou não subcutaneamente, com PBS ou com células de adenocarcinoma mamário 4T1. Após 2, 7, 14 e 30 dias da injeção, os animais foram eutanasiados e células do lavado peritoneal, baço, linfonodo e local de injeção foram coletadas e submetidas a análises por citometria de fluxo para expressão de CD45, CD19, CD23, CD5, CD11b, CD4. Resultados obtidos no microambiente tumoral mostraram aumento de linfócitos T CD4 após 2 dias do desafio. Já os macrófagos aumentaram de forma significativa no sítio do tumor nos quatro períodos analisados. De forma semelhante, no peritônio, os macrófagos aumentaram também após 2, 7 e 30 dias do desafio. Em contraste, houve diminuição do percentual de linfócitos B-1 no peritônio após dois dias da injeção das células de adenocarcinoma mamário. Embora outros ensaios sejam necessários para confirmar esta hipótese, estes resultados podem ser indícios de que linfócitos B-1 migram para o microambiente tumoral adquirindo fenótipo de macrófagos e, assim, favorecer o aumento desta população no local de desenvolvimento do tumor.

Palavras-chave: Células de adenocarcinoma mamário 4T1. Microambiente tumoral. Macrófagos. Linfócitos B-1.

INTRODUÇÃO

Câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que se caracterizam pela perda de controle da proliferação celular e ganho da capacidade de invadir tecidos adjacentes formando tumores secundários ou metástases. Entre os tipos mais prevalentes de tumores, o câncer de mama é o mais comum em mulheres e representa um grande problema de saúde pública (Basu et al., 2013), com 1,38 milhão de novos casos e 458 mil mortes por ano em todo o mundo (Bray et al., 2012).

Na progressão do câncer de mama, diversos estudos têm mostrado a participação de múltiplos fatores, como alterações genéticas do hospedeiro e interações das células tumorais com os elementos que compõem o microambiente no qual o tumor se desenvolve (Haass et al., 2013).

O microambiente tumoral é definido como o local de desenvolvimento do tumor, formado não só por células neoplásicas, mas também pelo seu estroma, células do sistema imunes e vários outros tipos de células. Neste local, são encontrados também outros elementos, como citocinas, quimiocinas, fatores de

crescimento, entre outras moléculas produzidas tanto pelas células tumorais como pelas não tumorais (Joyce; Pollard, 2009; Rogers; Holen, 2011; Quail; Joyce, 2013).

As células do sistema imune presentes no microambiente são as responsáveis pela vigilância imunológica por meio da qual o sistema imune reconhece as células tumorais e tenta eliminá-las. Estudos sugerem que este processo compreende três fases: eliminação, equilíbrio e evasão (Schreiber et al., 2011; Vesely et al., 2011). Nas fases de eliminação e de equilíbrio, os tumores podem ser eliminados ou mantidos em estado de dormência por indução do processo inflamatório ou por inibição somente do crescimento do tumor. Produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células do sistema imune inato (macrófagos, células NK e NKT) e adaptativo (linfócitos T e B) são características típicas destas fases (Schreiber et al., 2011; Vesely et al., 2011; Jiang; Shapiro, 2014). Já na fase de evasão, as células tumorais subvertem as respostas antitumorais e, por interações com outros elementos presentes no microambiente, adquirem a capacidade de proliferar e/ou invadir novos tecidos para sustentar um fenótipo metastático.

Entre as células do sistema imune, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) podem auxiliar na alteração fenotípica das células tumorais (Qian; Pollard, 2010). Por isto, o aumento da infiltração de macrófagos no tumor está associado ao pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (Leek et al., 1996; Tsutsui et al., 2005; Mahmoud et al., 2012). Os TAMs também se correlacionam de forma inversa com a expressão de receptores hormonais (ER, PR, HER2 / neu), que são considerados fatores prognósticos favoráveis (Campbell et al., 2011). Os TAMs no microambiente tumoral podem ser encontrados como macrófagos M-1 e M-2. Os M-1, ou macrófagos clássicos, induzidos pelos linfócitos T do perfil Th1, favorecem as respostas antitumor. Já o M-2, ou macrófagos alternativos, induzidos pelos linfócitos T do perfil Th2, favorecem as respostas pró-tumor. Os macrófagos nos sítios tumorais são geralmente do subtipo M2 que proporcionam um microambiente imunossupressor, favorecendo o crescimento tumoral, angiogênese e metástases (Mantovani et al., 2008 ; Biswas; Mantovani, 2010).

Relatos da literatura têm mostrado que as células B-1, um subtipo de linfócitos B, encontrados predominantemente nas cavidades pleural e peritoneal de camundongos adultos, podem modular a polarização de macrófagos para um perfil imunossupressor (Revisado por Lopes e Mariano, 2009; Wong et al., 2010). Embora

existam relatos mostrando que linfócitos B-1 induzem aumento no potencial metastático das células de melanoma após cocultivo de ambas as células, até o momento não há relatos da presença destas células no microambiente tumoral.

Evidências da presença de linfócitos T, B e macrófagos no microambiente têm sido descritas por diversos autores. Entretanto, a cinética de migração destas células de órgãos linfoides secundários ao microambiente onde o tumor tem sido bem caracterizado. Por isto, o intuito do presente trabalho é investigar a presença de linfócitos TCD4, B e macrófagos no baço, linfonodo, peritônio e tumor, para verificar o recrutamento destas células após 2, 7, 14 e 30 dias do desafio com células de adenocarcinoma mamário 4T1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c adultos, pesando entre 25 e 30 gramas, fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram mantidos livres de germes (SPF) em microisoladores, com água e ração autoclavadas. Os procedimentos realizados nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Paulista (Processo n.172/13 CEP/ICS/UNIP).

Cultura de células de adenocarcinoma mamário 4T1

As células 4T1 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de ciprofloxacina, e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂. O descolamento das células para posteriores ensaios foi realizado por breve exposição à tripsina (Cultilab).

Desafio tumoral

Os animais correspondentes ao grupo experimental foram injetados subcutaneamente na mama esquerda com 2×10^4 células de adenocarcinoma

mamário 4T1, ressuspendidas em 50 µl de PBS 1X. Os animais do grupo PBS foram injetados no mesmo local com 50 µl de PBS e os do grupo controle são animais sem injeção.

Citometria de fluxo

Após 2, 7, 14 e 30 dias do desafio, células do baço, linfonodo, lavado peritoneal, sítio de injeção das células tumorais e pulmão (só no grupo de 30d) foram coletadas nos três grupos de animais (experimental, PBS, controle). Após tratamento com tampão de hemólise, 1×10^6 células de cada amostra foram incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 por 20 min a 4 °C. Uma vez lavadas, as células foram incubadas por 1 h a 4 °C com o anticorpo de escolha CD4, CD5, CD19, CD23 e CD45 (todos da BD Biosciences, Mountain View, CA), já conjugado com o fluorocromo desejado, diluído em PBS/BSA 1%. Para análises das populações celulares presentes no microambiente tumoral e pulmão, células foram também marcadas com anti-CD45 para diferenciar a população leucocitária (CD45⁺) das células tumorais. Células marcadas foram adquiridas no citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Bioscience). Os quadrantes para definição das populações celulares de interesse foram determinados com base na fluorescência de células não marcadas. As análises dos dados foi realizada usando os *softwares* de análises FlowJo (Tree Star, USA) e GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA).

Histologia

Fragmentos de baço, local das injeções ou pulmão foram coletados após 2, 7, 14 e 30 dias de todos os grupos. Em seguida, as amostras foram fixadas em formol 10% para posterior confecção dos blocos de parafina. Após montagem, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para subseqüentes análises histopatológicas.

Análise estatística

Cinco animais por grupo foram avaliados em cada situação experimental. Os dados são expressos pela média do grupo e pelo desvio padrão. As comparações

estatísticas foram realizadas pela análise de variância de uma ou duas vias seguidas dos *post-test* Turkey ou Bonferroni. Diferenças no valor de $p \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

RESULTADOS

Desafio com células de adenocarcinoma mamário induz diminuição de linfócitos T CD4 no baço e no linfonodo e aumento de linfócitos B-2 e macrófagos no linfonodo e no baço respectivamente

Com o intuito de verificar a distribuição das populações presentes nos órgãos linfoides secundários, baço e linfonodo após desafio com células de adenocarcinoma mamário 4T1, animais dos grupos sem injeção (controle) ou injetados com as células tumorais (grupo experimental) ou com PBS (grupo PBS) foram sacrificados após 2, 7, 14 e 30 dias do desafio.

Análises por citometria de fluxo no baço mostraram diminuição do percentual de linfócitos T CD4 (CD19⁻CD4⁺) após 2, 7 e 30 dias do desafio no grupo experimental (Figura 1 Ca). Em contraste, o percentual de linfócitos B-2 apresenta aumento no grupo experimental após 14 e 30 dias (Figura CAb). Já os macrófagos apresentaram aumento no grupo experimental somente após de 30 dias (Figura 1Cc).

De forma semelhante ao baço, no linfonodo, o percentual de linfócitos T CD4 também apresentou diminuição no grupo experimental após 2, 7 e 30 dias do desafio (Figura 1Aa). Aumento de linfócitos B-2 foi também evidenciado no linfonodo, porém somente após 7 e 14 dias (Figura 1Ab). Já a população de macrófagos no linfonodo não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 1Ac).

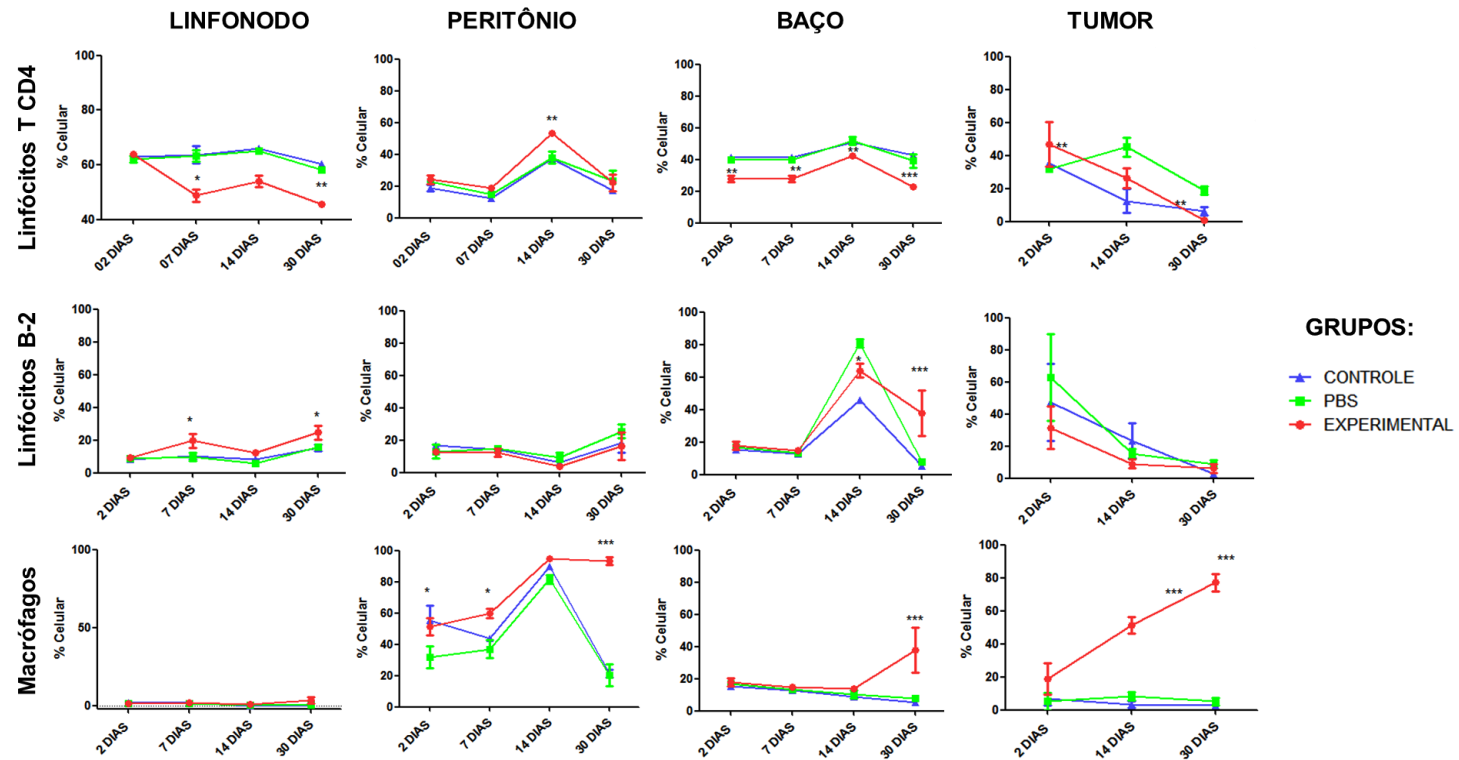


Figura 1. Percentuais celulares em órgãos linfoides secundários, peritônio e tumor após desafio com células de adenocarcinoma mamário 4T1. Grupos de camundongos sem injeção (Controle) ou injetados com PBS 1X (PBS) ou com 2×10^4 células de adenocarcinoma mamário 4T1 (Experimental) foram eutanasiados após 2, 7, 14 e 30 dias do desafio. Células obtidas do linfonodo inguinal direito (A. linfonodo), peritônio (B. peritônio) ou de fragmentos do baço (C. Baço) e do sítio de injeção das células tumorais/PBS (D. Tumor) foram submetidas a análises por citometria de fluxo para identificação de (a) linfócitos T CD4 ($CD19^-$, $CD4^+$), (b) linfócitos B-2 ($CD19^+$, $CD23^+$) e (c) macrófagos ($CD19^-$, $CD11b^+$). Gráficos correspondem ao valor médio dos percentuais de linfócitos T CD4 e B presentes no *gate* de leucócitos e de macrófagos presentes no *gate* de fagócitos no linfonodo, peritônio, baço e tumor. * $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

Células de adenocarcinoma mamário promovem aumento do percentual de macrófagos no início do desenvolvimento do tumor

Análises da população leucocitária (CD45⁺) presente no sítio de injeção das células tumorais mostraram aumento significativo do percentual de linfócitos T CD4 após dois dias e de macrófagos nos quatro períodos analisados (Figura 2).

Apesar de o aumento da população de linfócitos B-1 não ter sido observado no microambiente tumoral, a correlação dos percentuais desta população no peritônio e no tumor sugere que linfócitos B-1 possam estar sendo recrutados ao local de desenvolvimento do tumor (Figura 3).

Além das análises do tumor e do peritônio, o percentual de linfócitos B-1 foi também avaliado no linfonodo e no baço, entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo experimental, PBS e controle, possivelmente porque esta população celular é quase inexistente nestes locais (figura não mostrada).

Para melhor compreensão dos resultados obtidos até o momento, a Tabela 1 mostra em resumo os dados obtidos no grupo experimental e apresenta os valores de significância em relação ao grupo PBS.

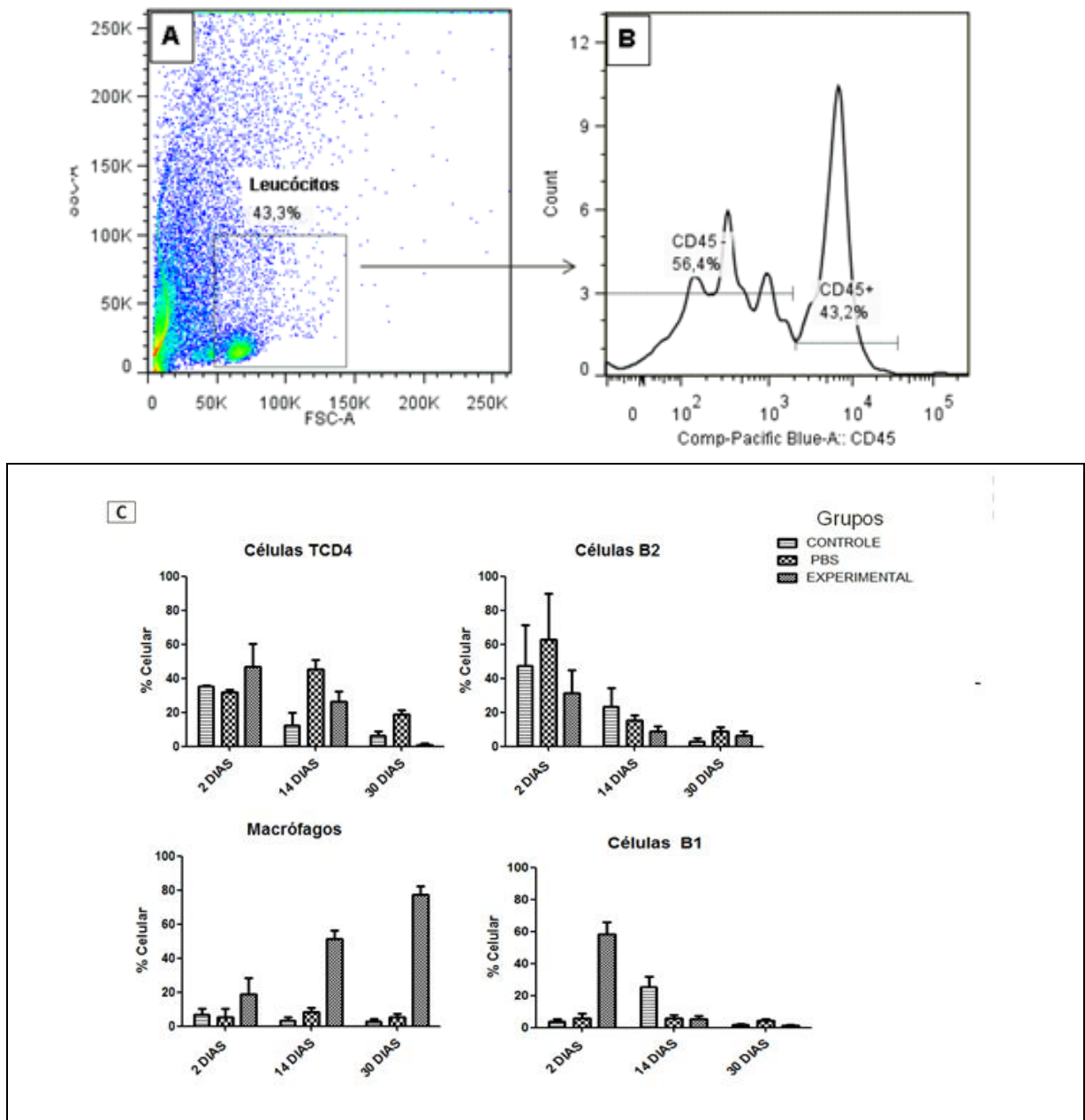


Figura 2. Percentual de células presentes no microambiente tumoral. Para análises da população leucocitária presente no microambiente tumoral (A), células leucocitárias foram primeiramente selecionadas pela expressão do marcador CD45 (B). Da população CD45⁺, foram identificados os linfócitos T CD4 (CD19⁻, CD4⁺), B-2 (CD19⁺, CD23⁺), macrófagos (CD19⁻, Cd11b⁺) e células B-1 (CD19⁺, CD23⁻) (C). As colunas correspondem ao valor médio dos percentuais de linfócitos T CD4, células B (B-1 e B-2) e macrófagos presentes no *gate* de leucócitos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Os resultados estatísticos aqui expressos referem-se aos resultados do grupo experimental x PBS.

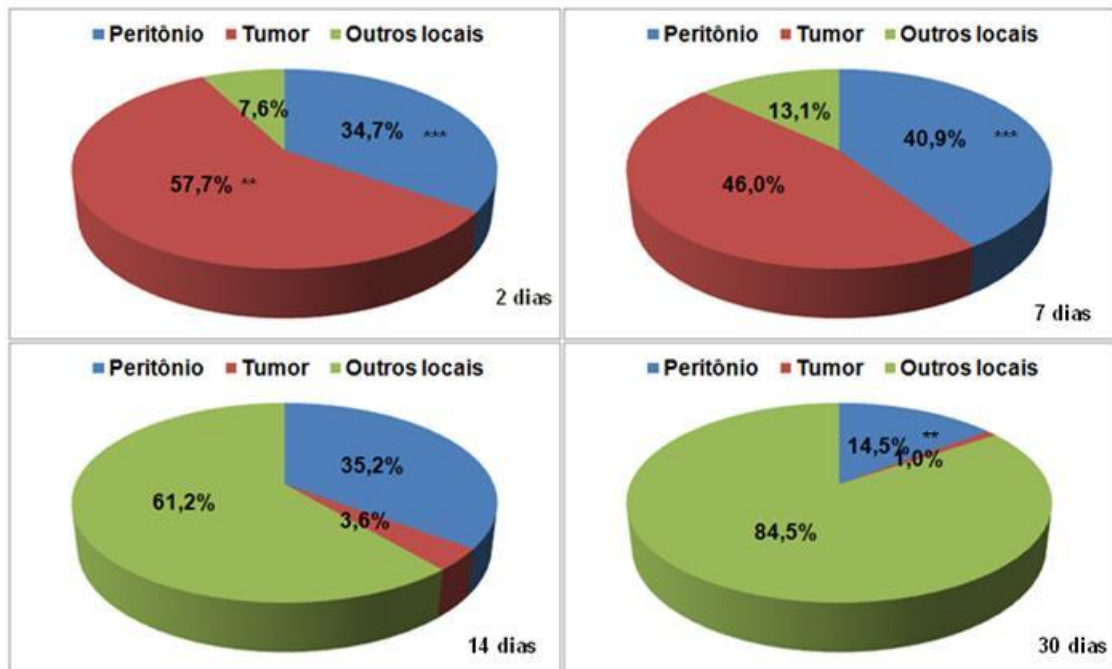


Figura 3. Correlação dos percentuais de macrófagos e linfócitos B-1 presentes no peritônio e tumor do grupo experimental. Percentuais de macrófagos, linfócitos T, B-2 e B-1 encontrados no peritônio e no microambiente tumoral nos animais injetados com células de adenocarcinoma mamário 4T1, após 2, 7, 14 e 30 dias do desafio. Valores correspondem ao valor médio dos percentuais de linfócitos B-1 presentes nos tecidos avaliados no *gate* de leucócitos. Valores de p em relação ao grupo PBS. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Tabela 1. Resumo das populações celulares observadas após 2, 7, 14 e 30 dias do desafio com PBS ou com células de adenocarcinoma mamário 4T1. Grupos de camundongos injetados com PBS 1X (PBS) ou com 2×10^4 células de adenocarcinoma mamário 4T1 (Experimental) na mama esquerda foram eutanasiados após 2, 7, 14 e 30 dias do desafio. Células obtidas do linfonodo inguinal direito (linfonodo), peritônio ou de fragmentos de baço (baço) e do sítio de injeção das células tumorais/PBS (tumor) foram submetidas a análises por citometria de fluxo para identificação de linfócitos T CD4 (CD19⁻, CD4⁺), macrófagos (CD19⁻, CD11b⁺), linfócitos B-2 (CD19⁺, CD23⁺) e B-1 (CD19⁺, CD23⁻). Valores correspondem ao valor médio dos percentuais de linfócitos T CD4 e B presentes no *gate* de leucócitos e de macrófagos presentes no *gate* de fagócitos no linfonodo, peritônio, baço e tumor (no tumor todas as análises foram realizadas a partir de um único *gate*, leucócitos). * $p < 0.05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p < 0,001$.

		BAÇO EXPERIMENTAL	LINFONODO EXPERIMENTAL	PERITÔNIO EXPERIMENTAL	TUMOR EXPERIMENTAL
2 DIAS	CÉLULAS B1	4,2%	-	34,7% ↓***	57,7% ↑**
	CÉLULAS B2	15,4%	9,1%	12,8%	31,3%
	MACRÓFAGOS	17,8%	2,8%	51,2% ↑*	6,7%
	CÉLULAS TCD4	2,8 % ↓**	63,8%	24,0% ↑ *	46,8% ↑**
7 DIAS	CÉLULAS B1	-	-	40,9% ↓***	46,0%
	CÉLULAS B2	64,8% ↑**	19,7% ↑*	12,4%	42,0%
	MACRÓFAGOS	23,5%	-	59,6% ↑*	-
	CÉLULAS TCD4	48,8% ↓**	48,8 ↓*	18,6%	-
14 DIAS	CÉLULAS B1	-	-	35,2%	3,6%
	CÉLULAS B2	12,0% ↓ *	12,4%	3,8%	9,0%
	MACRÓFAGOS	14,1%	2,4%	94,9%	51,3% ↑***
	CÉLULAS TCD4	53,9% ↓***	53,9%	24% ↑**	26,5% ↓
30 DIAS	CÉLULAS B1	-	-	14,5 ↓**	1,0%
	CÉLULAS B2	24,6 ↑% ***	24,6% ↑*	16,3%	6,1%
	MACRÓFAGOS	37,9% ↑***	2,8%	93,3% ↑***	77,2% ↑ ***
	CÉLULAS TCD4	45,7% ↓***	45,7% ↓*	22,1%	5,9% ↓**

Aumento de macrófagos é também observado em locais de metástases

Uma vez que os pulmões apresentam alta suscetibilidade ao surgimento de metástases e sabendo que as células 4T1 têm a característica de formar metástases espontâneas, foram verificados os percentuais celulares nesses órgãos somente após 30 dias do desafio com as células tumorais. De forma semelhante aos resultados obtidos no tumor, análise das populações celulares presentes no pulmão evidenciou aumento de linfócitos T CD4 e macrófagos (Figura 4).

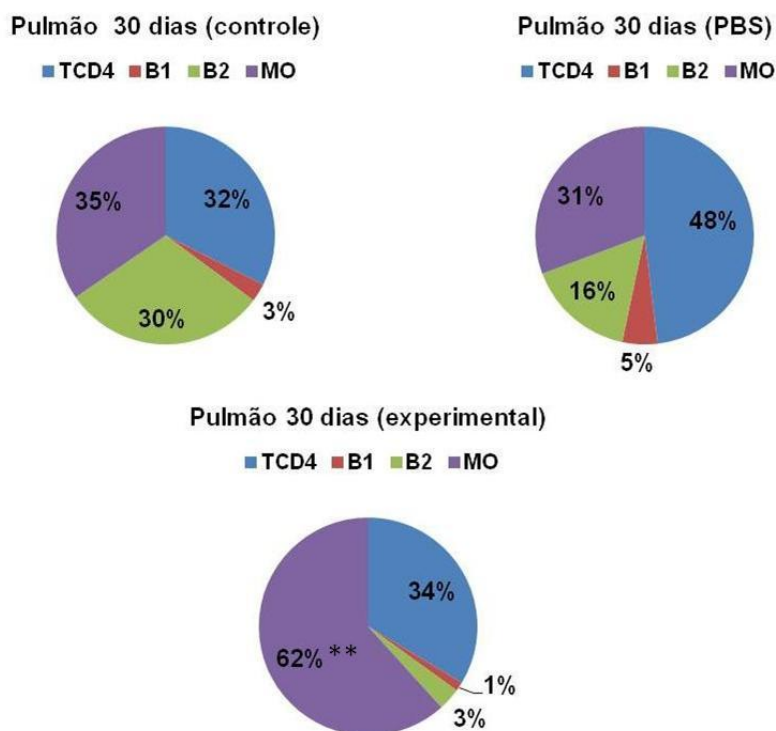


Figura 4. Percentuais de linfócitos TCD4, B1, B2 e macrófagos presentes no pulmão após desafio ou não com PBS ou células de adenocarcinoma mamário 4T1. Animais desafiados ou não (Controle) com PBS (PBS) ou com células tumorais (experimental) foram eutanasiados para retirada dos pulmões após 30 dias do desafio. Células obtidas após maceração do órgão foram submetidas a análises por citometria de fluxo para identificação de linfócitos B-1 (CD19⁺ CD23⁻), B-2 (CD19⁺, CD23⁺), T CD4 (CD19⁻, CD4⁺) e macrófagos (CD19⁻, CD11b⁺). Valores correspondem ao valor médio dos percentuais de linfócitos B-1, B2, TCD4 e macrófagos presentes no pulmão. * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Infiltrado leucocitário na região da injeção das células tumorais é maior após 30 dias do desafio

Para melhor caracterizar o tipo de resposta após desafio ou não com PBS ou com células tumorais, análises histopatológicas com HE foram realizadas nos fragmentos de baço e tumor após 2, 7, 14 e 30 dias, e do pulmão após 30 dias do desafio.

Análises histopatológica do baço não demonstraram diferenças morfológicas evidentes entre os grupos PBS, tumor e controle (dados não mostrados).

Conforme mostrado na Figura 5, análises histopatológicas com HE do sítio de injeção do PBS ou do tumor permitem observar a evolução do adenocarcinoma mamário em camundongos BALB/c em 2, 7, 14 e 30 dias (Figura 5A, B, C e D respectivamente). Nesta figura, podemos também observar que este tipo de tumor possui crescimento desorganizado, o que pode apoiar seu comportamento agressivo.

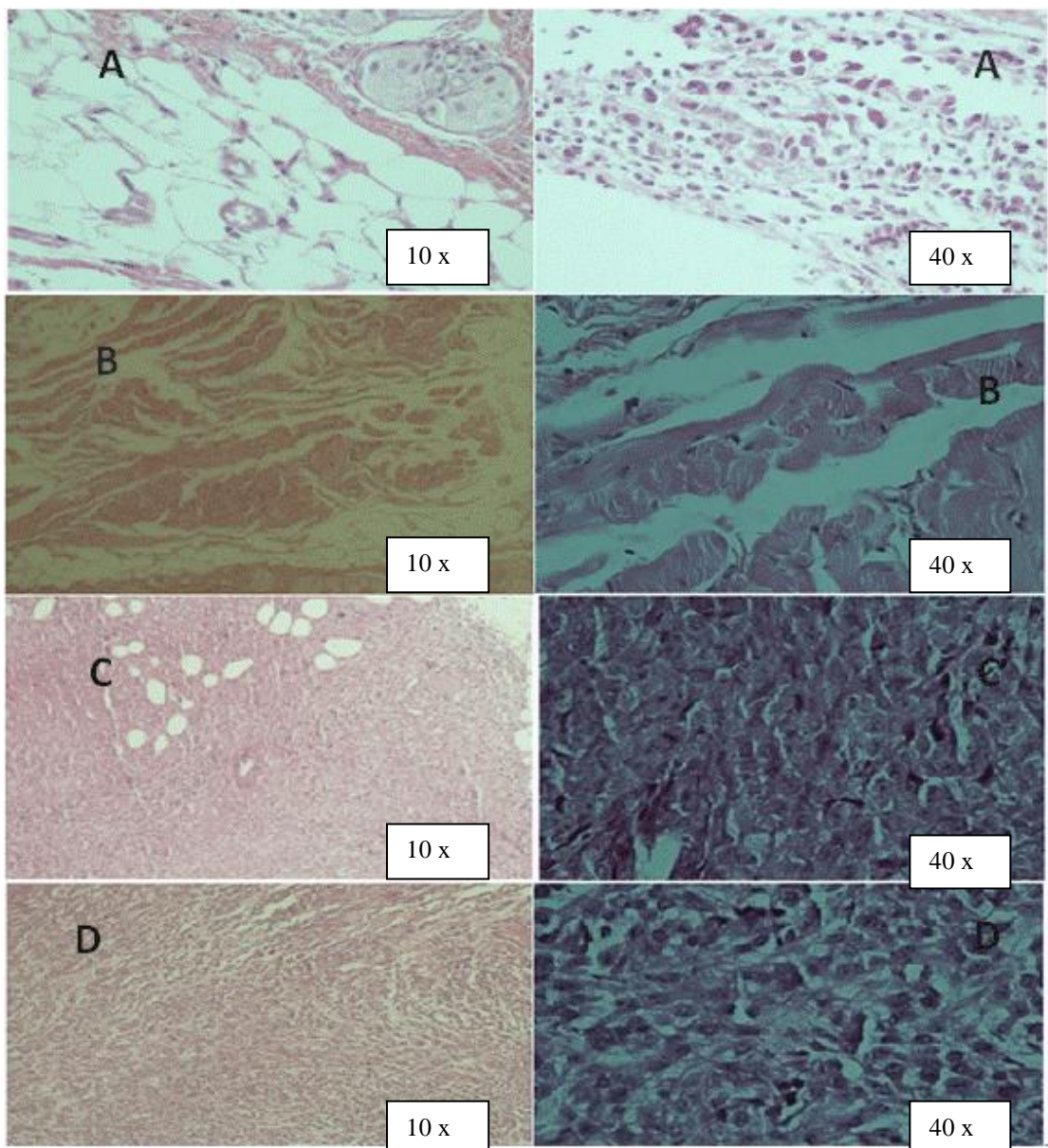


Figura 5. Micrografias do tumor de mama em camundongos BALB/c após 2, 7, 14 e 30 dias do desafio. Avaliação histopatológica do infiltrado leucocitário após (A) 2, (B) 7, (C) 14 e (D) 30 dias da injeção na mama esquerda de 2×10^4 células de adenocarcinoma mamário 4T1. Aumentos de 10X e 40X são apresentados.

Aumento leucocitário no pulmão dos animais do grupo experimental correlacionado com os achados na citometria de fluxo

Evidente infiltrado leucocitário é observado no pulmão dos camundongos desafiados com células de adenocarcinoma mamário 4T1 (Figura 5). Estes dados corroboram os achados na citometria de fluxo nos quais o número de macrófagos é elevado. Neste mesmo período, também podemos identificar a formação de micrometástases no pulmão, conforme mostra a Figura 8B.

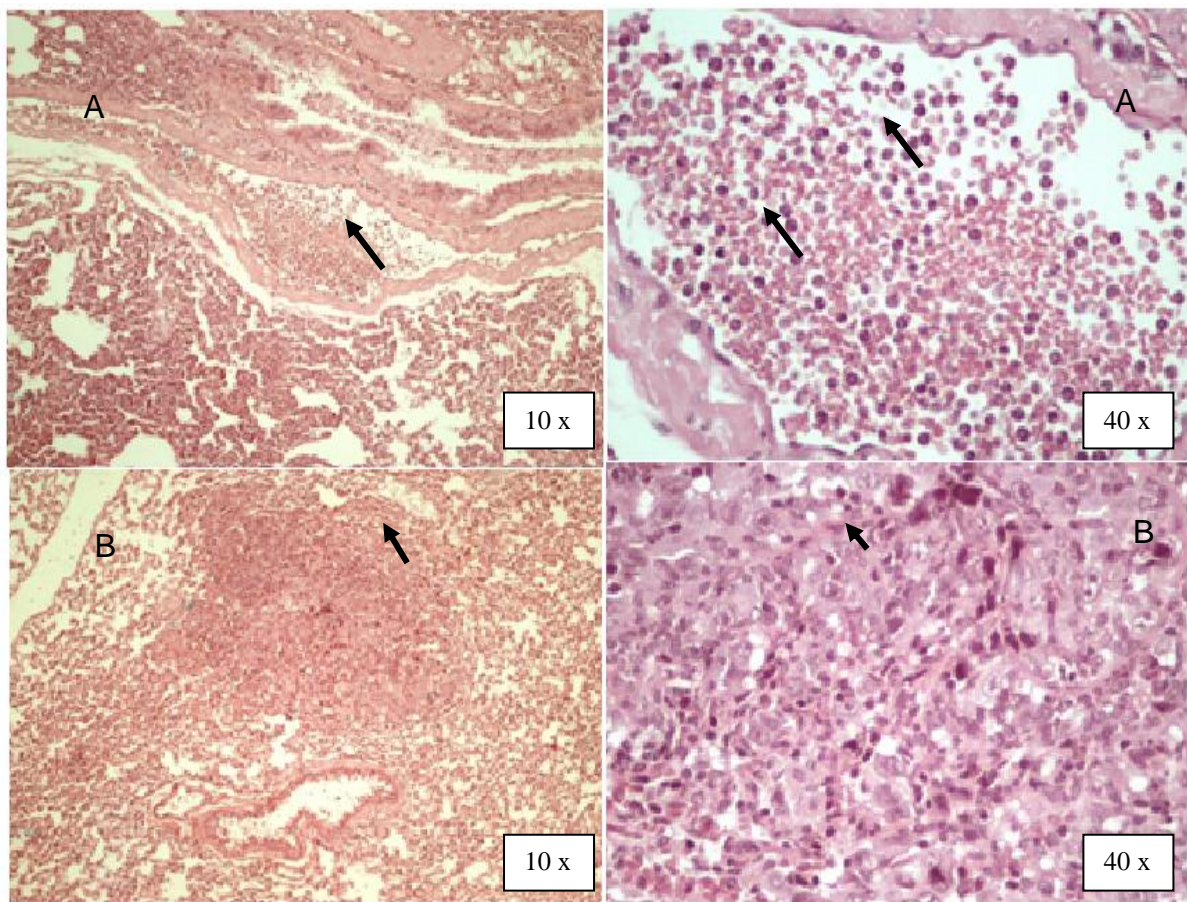


Figura 6. Microscopia de pulmão de camundongos BALB/c em 30 dias após injeções de células de adenocarcinoma mamário 4T1. (A) Infiltração leucocitária indicada pelas setas nos respectivos aumentos, 10X e 40X. (B) Presença de micrometástases no pulmão após 30 dias da injeção de células de adenocarcinoma mamário 4T1.

DISCUSSÃO

Embora muitos estudos tenham demonstrado o papel das células do sistema imune no microambiente tumoral, ainda não estão bem estabelecidos quais são os

mecanismos pelos quais essas células favorecem a alteração fenotípica das células tumorais.

A infiltração de linfócitos no microambiente tumoral geralmente é considerado bom prognóstico (De Nardo et al., 2010). Análises do baço e linfonodo realizadas no atual trabalho mostraram diminuição do percentual de linfócitos T CD4 em 2 e 30 dias no baço (Figura 1) 7 e 30 dias no linfonodo (Figura 1) nos animais desafiados com as células tumorais. Em contraste com o microambiente tumoral, a percentagem de linfócitos TCD4 aumentou, o que pode sugerir recrutamento destas células dos órgãos linfoides secundários ao tumor. Embora tenham sido realizados ensaios na tentativa de verificar o perfil de citocinas em cada um dos tempos avaliados, não foi possível determinar um padrão de resposta específica, mas podemos sugerir que este influxo de linfócitos T CD4 no início do desenvolvimento do tumor poderia favorecer um perfil de resposta do tipo Th1 (Allavena et al., 2012). Além disso, Haabeth et al. (2014) relatam que células T CD4 podem reconhecer antígenos tumorais expressos diretamente de uma célula neoplásica via MHC de classe II e, a partir de então, as células T CD4 assumirem o papel de células citotóxicas e passarem a destruir as células tumorais. Entretanto, para confirmar o envolvimento dos linfócitos T CD4 como mediadores da resposta antitumor neste modelo de estudo outros testes devem ser realizados.

De acordo com outros autores, nossos resultados também mostraram aumento do percentual de macrófagos no microambiente do tumor. Como esta população também apresentou aumento no baço e no peritônio no grupo experimental, podemos sugerir que o índice de proliferação destas células é aumentado após desafio com células de adenocarcinoma mamário 4T1.

Um dos achados mais relevantes deste trabalho foi a diminuição expressiva de linfócitos B-1 no peritônio após desafio com as células tumorais. Embora não tenha sido observada diferença estatística no percentual de linfócitos B-1 no tumor, baseados nos dados de Popi et al. (2009, 2012), podemos sugerir que linfócitos B-1 se diferenciam em macrófagos e migram para o tumor favorecendo aumento desta população no microambiente do tumor. Este indício pode ser também sustentado pela correlação dos linfócitos B-1 no peritônio e no tumor, que permite perceber um alto percentual dessas células no tumor. Migração de linfócitos B-1 já foi demonstrada inicialmente por Almeida et al. (2001), portanto, a possibilidade de B-1

migrar ao microambiente do tumor e se diferenciar em macrófago ao perder seus marcadores fenotípicos da linhagem linfoide é uma questão que deve ser estudada.

Uma vez que linfócitos B-1 podem favorecer a polarização dos macrófagos de um perfil M-1 para M-2 (DeLorenzo et al., 2007), além de promover aumento *in vitro* do potencial metastático das células de melanoma murino (Perez et al., 2008; Staquicini et al., 2008), é possível sugerir que elas influenciam o aumento de macrófagos no microambiente tumoral para sustentar o crescimento e a progressão do tumor de mama

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho são relevantes e trazem informações inéditas que contribuíram na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do adenocarcinoma mamário. O estudo da cinética de migração de linfócitos T CD4, B e macrófagos serviu como base para avaliar a participação e o envolvimento destas células nas diferentes etapas da formação de tumores com alta capacidade invasiva. Ademais, indícios da influência dos linfócitos B-1 no aumento do percentual de macrófagos no microambiente tumoral sugerem novas abordagens de estudos nas descobertas de alvos mais eficientes para prevenção e tratamento de tumores com alto potencial maligno.

CONCLUSÃO

Em conjunto, estes dados sugerem possível recrutamento de células potencialmente efetoras, como linfócitos T CD4 e macrófagos, de órgãos linfoides secundários e cavidade peritoneal ao microambiente tumoral, principalmente nos períodos iniciais do desenvolvimento do tumor (2 e 7 dias).

Diminuição de linfócitos B-1 no peritônio após desafio com as células tumorais sugere que as B-1 podem influenciar o aumento de macrófagos observado no tumor após 2, 14 e 30 dias de injeção das células de adenocarcinoma.

REFERÊNCIAS

- Allavena P. & Mantovani A. (2012) Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin .Exp. Immunol.* **167**, 195-205.
- Almeida SR & Aroeira LS & Frymuller E & Dias MA, & Bogsan CS. (2001) Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int Immunol.* **13**, 1193–1201.
- Basu S & Nachat-Kappes R & Caldefie-Chezet F. (2011) Eicosanoids and adipokines in breast cancer: from molecular mechanisms to clinical considerations. *Antioxid Redox Signal.* **18**(3), 323–360.
- Biswas SK1, Mantovani A Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* **11**(10):889-96.
- Bray F & Jemal A & Grey N. (2012) Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* **13**(8), 790–801.
- Campbell MJ, Esserman LJ. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;**11**:91–100.
- De Lorenzo B.H., Brito R.R., Godoy L.C., Lopes J.D., Mariano M. (2007) Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. *Immunol Lett.* **114**, 110-8.
- DeNardo DG & Andreu P & Coussens LM. (2010) Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 2010; **29**, 309-16.
- Haabeth O.A., Tveita A.A., Fauskanger M. et al. (2014) How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules?. *Front. Immunol.* **5**, 174.
- Haass, N.K.; SMALLEY, K.S.; LI, L.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* v. **18**, n. **3**, p. 150-159, 2013.
- Joyce JA, & Pollard JW. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* **9**: 239-52.

- Li J & Zhang BN & Fan JH.(2011). A nation-wide multicenter 10-year (1999–2008) retrospective clinical epidemiological study of female breast cancer in China. *BMC Cancer*. **11**(1).364.
- Lopes J.D & Mariano M. (2009) B-1 cell: the precursor of a novel mononuclear phagocyte with immuno-regulatory properties. *An. Acad. Bras. Cienc.* 81, 489-96.
- Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J Clin Pathol.*2012;65:159-63
- Wong S.C., Puaux A.L., Chittezhath M. et al. (2010) Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. *Eur. J. Immunol.* 40, 2296-307.
- Mantovani A & Marchesi F,& Porta C,& Sica A,& Allavena P. Inflammation and cancer: breast cancer as a prototype. *Breast*. 2007;16:S27–S33
- Martins & M.C.F.N. Participação de células B-1 na rejeição de aloenxertos no camundongo. Tese de doutorado. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2009
- Mosser DM & Edwards JP. (2008)Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* **8**,958-69.
- Novaes & Brito RR & Cortez BA & Machado-Santelli GM & Xander P& De Lorenzo BH. (2010) *In vitro* and *in vivo* phagocytic ability of mouse B-1 cells. *Immunology and Immunogenetics Insights*. **2**,31–39.
- Osborne CK & Schiff R. (2011) Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med.***62**(1),233–247.
- Pérez, E.C.; Machado, J.JR.; Aliperti, F.; Freymüller, E.; Mariano, M.;Lopes, J.D. B-1 lymphocytes increase metastatic behavior of melanoma cells through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cancer Sci.* v. 99, n. 5, p. 920-928, 2008.
- Popi AF & Motta FL, Mortara RA & Schenkman S & Lopes JD.(2009) Co-ordinated expression of lymphoid and myeloid specific transcription factors during B-1b cell differentiation into mononuclear phagocytes in vitro. *Immunology*.**126**,114–122
- Popi AF1, Osugui L, Perez KR, Longo-Maugéri IM, Mariano M.Could a B-1 cell derived phagocyte "be one" of the peritoneal macrophages during LPS-driven

- inflammation? PLoS One. 2012;7(3):e34570. doi: 10.1371/journal.pone.0034570. Epub 2012 Mar 30.
- Quail D.F. & Joyce J.A. (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 19, 1423-37.
- Rogers T.L. & Holen I. (2011) Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J. Transl. Med.* 9, 177.
- Shin MS&Kim HS& Lee SH. (2001) Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (*TRAIL-R1*) and receptor 2 (*TRAIL-R2*) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res.* 61:4942–4946.
- Stagg J & Allard B.(2013) Immunotherapeutic approaches in triple-negative breast cancer: latest research and clinical prospects. *Ther Adv Med.* 5(3).169–181.
- Staquicini FI, Tandle A, Libutti SK. et al. (2008) A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans. *Cancer Res.* 68, 8419-28.
- Wang B, He M, Wang L. (2013) Breast cancer screening among adult women in China, *Prev Chronic Dis.* **10**,130-136.
- Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G (2011) Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 151–160.

ANEXOS**UNIVERSIDADE PAULISTA**

Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº172 /13 CEP/ICS/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Cinética de migração de células do sistema imune após desafio com células de adenocarcinoma mamário 4t1", Espécie utilizada: "camundongo isogênico" Número de animais utilizados: "Sessenta" sob a responsabilidade de EDILAINE SUDRÉ MARCELINO DE NASCIMENTO", está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 14 dias do mês de agosto de 2013.

Hailey Barros F. Gonçalves
Secretária do Comitê de Ética
em Pesquisa da 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: cep@unip.br – <http://www.unip.br>