

UNIVERSIDADE PAULISTA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS
CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE PRESENTES
NO MICROAMBIENTE TUMORAL EM
MODELO DE MELANOMA MURINO**

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.

JOSÉ RENILDO DE CARVALHO

SÃO PAULO
2014

UNIVERSIDADE PAULISTA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS
CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE PRESENTES
NO MICROAMBIENTE TUMORAL EM
MODELO DE MELANOMA MURINO**

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.

JOSÉ RENILDO DE CARVALHO

SÃO PAULO
2014

Carvalho, José Renildo de.

Identificação e caracterização das células do sistema imune presentes no microambiente tumoral em modelo de melanoma murino / José Renildo de Carvalho... [et al.]. - 2014.

58 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.^a Dra. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado.

1. Microambiente tumoral.
 2. Melanoma murino.
 3. Linfócitos B-1.
 4. Linfócitos B-2.
- I. Carvalho, José Renildo. II. Hurtado, Elizabeth Cristina Pérez (orientadora). III. Título.

JOSÉ RENILDO DE CARVALHO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS
CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE PRESENTES
NO MICROAMBIENTE TUMORAL EM
MODELO DE MELANOMA MURINO**

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

_____/_____/_____

Profa. Dra. Maria Fernanda Lucatelli Laurindo
Laboratório Fleury

_____/_____/_____

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista

_____/_____/_____

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

A todos os meus familiares, em especial aos meus pais,
Joaquim Bernardino de Carvalho
e Maria Filha de Carvalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, pela dádiva maior, a vida, e por ser à base das minhas conquistas;

Aos meus pais Joaquim Bernardino de Carvalho e Maria Filha de Carvalho por terem me dado o apoio necessário para a minha realização pessoal, por terem sempre acreditado em mim;

Aos meus irmãos Jucelino Bernardino de Carvalho, Jucicleudo Bernardino de Carvalho, Socorro Renize de Carvalho e as minhas cunhadas Luzia Gonçalves de Sousa e Suely Carvalho de Sousa, pelo apoio e incentivo;

A professora Doutora Elizabeth Cristina Pérez Hurtado, pela dedicação em suas orientações prestadas na elaboração deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, bem como a todos os professores do programa, por tornar possível a realização deste trabalho e por todo conhecimento transmitido;

A CAPES, por fornecer a bolsa de mestrado;

A Doutora Fabiana Toshie de Camargo Konno, e a todos os funcionários do laboratório de Biologia celular e molecular da UNIP, por toda ajuda que recebi de vocês;

A minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda de todos vocês, expresso aqui minha eterna gratidão e o reconhecimento de que sem vocês eu não teria conseguido percorrer todo este caminho.

"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

Recentes estudos têm demonstrado que, no microambiente onde o tumor se desenvolve, existe uma conversa dinâmica entre o tumor e as células do sistema imune que podem tanto favorecer como inibir o crescimento do tumor e/ou a formação de metástases. Entretanto, pouco se conhece sobre a cinética de migração destas células ao local onde o tumor se desenvolve. Assim, o intuito do presente trabalho foi verificar a cinética de migração de linfócitos T, B e macrófagos de órgãos linfoideos e peritônio para o local de desenvolvimento do melanoma murino. Para isto, camundongos da linhagem C57BL/6 foram injetados ou não (grupo controle) subcutaneamente com PBS (grupo PBS) ou com células de melanoma murino B16F10 (grupo experimental). Após 2, 7, 14 e 21 dias da injeção, os animais foram eutanasiados e células do lavado peritoneal, baço, linfonodo e local de injeção foram coletadas e submetidas a análises de citometria de fluxo para avaliar a expressão de CD45, CD19, CD23, CD11b e CD4. Resultados obtidos destas análises mostram migração de várias populações celulares em todos os grupos analisados, nos primeiros dias após implantação do tumor. Interessantemente, o grupo experimental, quando comparado com os grupos controle e PBS, apresenta aumento da população de células B-1 no sítio do tumor após 2, 14 e 21 dias e diminuição dessa população no peritônio após 21 dias. Em conjunto, estes resultados, ainda inéditos, sugerem que células B-1 migram da cavidade peritoneal para o sítio do tumor onde provavelmente interagem fisicamente com células de melanoma favorecendo o crescimento e a metastatização destas células tumorais.

Palavras-chave: Microambiente de melanoma. Células B-1. Células B-2. Macrófagos.

ABSTRACT

Recent studies have shown that the microenvironment of the tumor develops there is a dynamic cross talk between tumor and immune system cells that can either promote or inhibit tumor growth and / or metastasis. However, little is known about the kinetics of the migration of these cells to the site of the tumor develops. Thus, the aim of this study was to assess the kinetics of the migration of T and B lymphocytes and macrophages from secondary lymphoid organs or peritoneum to tumor microenvironment. For this purpose, C57BL/6 strain of mice were injected or not (control group) subcutaneously with PBS (PBS group) or with B16F10 murine melanoma cells (experimental group). After 2, 7, 14 and 21 days after injection, the animals were euthanized and cells of the peritoneal cavity, spleen, lymph node and injection site were collected and subjected to flow cytometry analysis to assess the expression of CD45, CD19, CD23, CD11b and CD4. Results of these analyze show migration of various cell populations in all groups, in the first days after tumor implantation. Interestingly, the experimental group compared to the control and the PBS group has increased population of B-1 lymphocytes in the tumor microenvironment after 2, 14 and 21 days and has reduction in the peritoneum after 21 days. Taken together, these results suggest that B-1 lymphocytes migrate from the peritoneal cavity to the tumor site where it would physically interact with melanoma cells favoring the growth and metastasis of these tumor cells.

Key-words: Melanoma microenvironment. B-1 lymphocytes. B-2 cells. macrophages.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1.1. Animais.....	13
2.1.2. Cultura de células de melanoma B16F10.....	13
2.1.3. Desafio tumoral.....	13
2.1.4. Citometria de fluxo.....	14
2.1.5. Histologia.....	15
2.1.6. Análises estatísticas.....	17
3. REFERÊNCIAS.....	18
4. ARTIGOS.....	22
4.1. Artigo 1 (Células de melanoma: interação com o microambiente).....	22
Resumo.....	22
Introdução.....	23
Microambiente e melanoma.....	24
Macrófagos (TAMs) e melanoma.....	26
Linfócitos B e melanoma.....	28
Linfócitos T e melanoma.....	30
Interleucinas, quimiocinas e melanoma.....	30
Conclusões.....	32
Referências.....	33
4.2. Artigo 2 (Células B-1: novo componente do microambiente tumoral)....	37
Resumo.....	37
Introdução.....	38
Materiais e métodos.....	40
Animais.....	40
Cultura de Células.....	40
Desafio tumoral.....	40
Citometria de fluxo.....	40
Histologia.....	41
Análises estatísticas.....	41

Resultados.....	42
Discussão.....	51
Conclusões.....	53
Referências.....	54
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
ANEXOS.....	58

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado e maligno de diversas linhagens celulares, podendo espalhar-se para outros sítios distantes do local de origem formando os tumores secundários ou metástases (ROBBINS; COTRAN, 2008).

Hoje se sabe que o câncer é a segunda doença que mais causa óbitos no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Os cânceres podem ser causados por diversos fatores como hereditariedade, tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, medicamentos e fatores ambientais, os quais são responsáveis por 80% a 90% dos casos conhecidos (INCA, 2014).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014 foi de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, estimativa que se manteve para o ano de 2015. Entre os tipos de câncer, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas da pele, entretanto é considerado o mais grave devido à sua alta tendência para promover metástases (INCA, 2014), que são as responsáveis por aproximadamente 90% de todas as mortes relacionadas a este tipo de câncer (NGUYEN; MASSAGUÉ, 2007). A formação de metástases é um processo complexo no qual as células tumorais adquirem propriedades que permitem degradar a matriz extracelular (MEC), viajar através de vasos (sanguíneos e/ou linfáticos) e invadir órgãos ou tecidos diferentes do local de origem do tumor primário (NGUYEN; MASSAGUÉ, 2007; SPANO; ZOLLO, 2012).

Melanoma é o câncer de pele que tem origem nos melanócitos (HAASS et al., 2005) e predominância em adultos brancos (revisado por MAIRE et al., 2014). Na progressão do melanoma, estão envolvidos múltiplos fatores como alterações genéticas no hospedeiro e interação com o microambiente onde o tumor se desenvolve (HAASS et al., 2005; TAWBI; KIRKWOOD, 2007; revisado por BRANDNER; HAASS, 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 imunológico e vários outros tipos de célula. No microambiente tumoral, também são encontrados outros elementos, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e nutrientes (JOYCE; POLLARD, 2009; ROGERS; HOLEN, 2011; QUAIL; JOYCE, 2013).

As células do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral geralmente são células inflamatórias, como os macrófagos (TAMs, Macrófagos Associados ao Tumor), mastócitos, neutrófilos, linfócitos T e B, células *natural killer* (NK) e linfócitos T invariantes (células NKT) (MURDOCH et al., 2008; EGEBLAD et al., 2010; DeNARDO et al., 2010; GAJEWSKI et al., 2013).

Os TAMs, quando ativados pela via clássica (IFN- γ), se diferenciam em macrófagos M-1. Estes normalmente aparecem no microambiente tumoral em lesões iniciais (inflamação aguda) e são capazes de eliminar células tumorais por produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio. Estas células também secretam grandes quantidades de IL-12, que atua nas células NK, e linfócitos T CD8 $^{+}$, aumentando o potencial citotóxico destas células, favorecendo, assim, as respostas do tipo Th1. Entretanto, na tentativa do sistema imunológico de manter a homeostasia do corpo, ou por mecanismos de evasão das células tumorais, os macrófagos passam a ser ativados pela via alternativa (IL-4 e IL-13) e se diferenciam em M-2. Os macrófagos M-2 secretam grandes quantidades de IL-10, que regulam negativamente a resposta imunológica a tumores, por interferir na ativação de células citotóxicas e favorecer um ambiente imunossupressor que promove a progressão tumoral (LENGAGNE et al., 2011; SPANO; ZOLLO, 2012; ALLAVENA; MANTOVANI, 2012; QUAIL; JOYCE, 2013).

Outras células que podem tanto favorecer quanto inibir a progressão tumoral são os linfócitos B: B-1 e B-2. As células B-1 se diferenciam das células B-2 convencionais pela fenotipagem, distribuição tecidual, morfologia e função (HAYAKAWA et al., 1983). As células B-1 são encontradas predominantemente nas cavidades pleural e peritoneal de camundongos (HAYAKAWA et al., 1984; HAYAKAWA et al., 1986), têm suas funções efetoras diversificadas, participando assim tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, já que podem secretar imunoglobulinas (HAYAKAWA et al., 1986), apresentar抗ígenos (VIGNA et al., 2002), oferecer memória imunológica (De LORENZO et al., 2007) e secretar citocinas pró e anti-inflamatórias como TNF- α e IL-10 (O'GARRA et al., 1992). Entre outras funções, os linfócitos B-1 podem também participar do processo de cicatrização tecidual (OLIVEIRA et al., 2010) e atuar em diferentes respostas imunológicas mediadas por células T (MARTINS, 2009). Por sua vez, os linfócitos B-2 ou células B convencionais, quando identificadas no microambiente tumoral em modelos de melanoma, podem secretar grandes quantidades de citocinas anti-

inflamatórias com interleucina-10 (IL-10), que pode regular de forma negativa a resposta imunológica a tumores ao favorecer a polarização de macrófagos para um perfil imunossupressor (DiLILLO et al., 2010).

Já as células T CD4⁺ desempenham papéis múltiplos na resposta antitumoral, por serem células auxiliadoras que participam da ativação e polarização de outras células. As células T CD4⁺ tipo Th1 auxiliam a ativação clássica de macrófagos favorecendo uma resposta antitumoral. Em contraste, os linfócitos T CD4 tipo Th2, auxiliam a ativação alternativa dos macrófagos e bloqueiam a resposta do tipo Th1m, favorecendo portanto uma resposta pró-tumoral, (ALLAVENA; MANTOVANI, 2012; QUAIL; JOYCE, 2013).

Embora as células T CD8⁺ e células NKT não tenham sido descritas neste estudo, hoje sabemos por estudos *in vivo* que estas células são recrutadas para o microambiente tumoral, onde exercem um papel importante nas respostas antitumorais (UGUREL et al., 2008; ZHANG et al., 2009; WETZEL et al., 2007).

Assim, considerando o importante papel que desempenham as células do sistema imunológico no desenvolvimento e progressão de tumores, o intuito deste trabalho foi verificar a presença de linfócitos T, B e macrófagos no microambiente tumoral após 2, 7, 14 e 21 dias do desafio com células de melanoma murino B16F10. Os dados obtidos no atual trabalho fornecerão novas informações para a compreensão dos mecanismos celulares e/o moleculares envolvidos no desenvolvimento de tumores agressivos como o melanoma.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 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 21 dias do desafio:

- Controle: Animais sem injeção;
- PBS: Animais injetados com 100 µl de PBS 1X;
- Experimental: Animais injetados com células de melanoma B16F10 ressuspensas em PBS 1X.

2.1.2 Cultura de células de melanoma B16F10

As células B16 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), mantida sem estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. O descolamento das células para posteriores ensaios foi realizado por breve exposição ao PBS 1% + EDTA 2 mM. O meio de cultura das células em cultivo era trocado a cada dois dias.

2.1.3 Desafio tumoral

Os animais correspondentes ao grupo experimental foram injetados subcutaneamente no dorso direito com 1×10^5 células de melanoma murino B16, ressuspensas em 100 µl de PBS 1X.

2.1.4 Citometria de fluxo

Células do baço, linfonodo e 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 21 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 ressuspendidas 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 de linfócitos foi utilizado para caracterizar principalmente as populações linfocitárias. O *gate* denominado de fagócitos foi empregado para as análises de células fagocíticas e o *gate* denominado de granulócitos, para análises de células granulocíticas. Já no tumor foi utilizado apenas um *gate* denominado de 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 numero muito maior do que a população leucocitária.

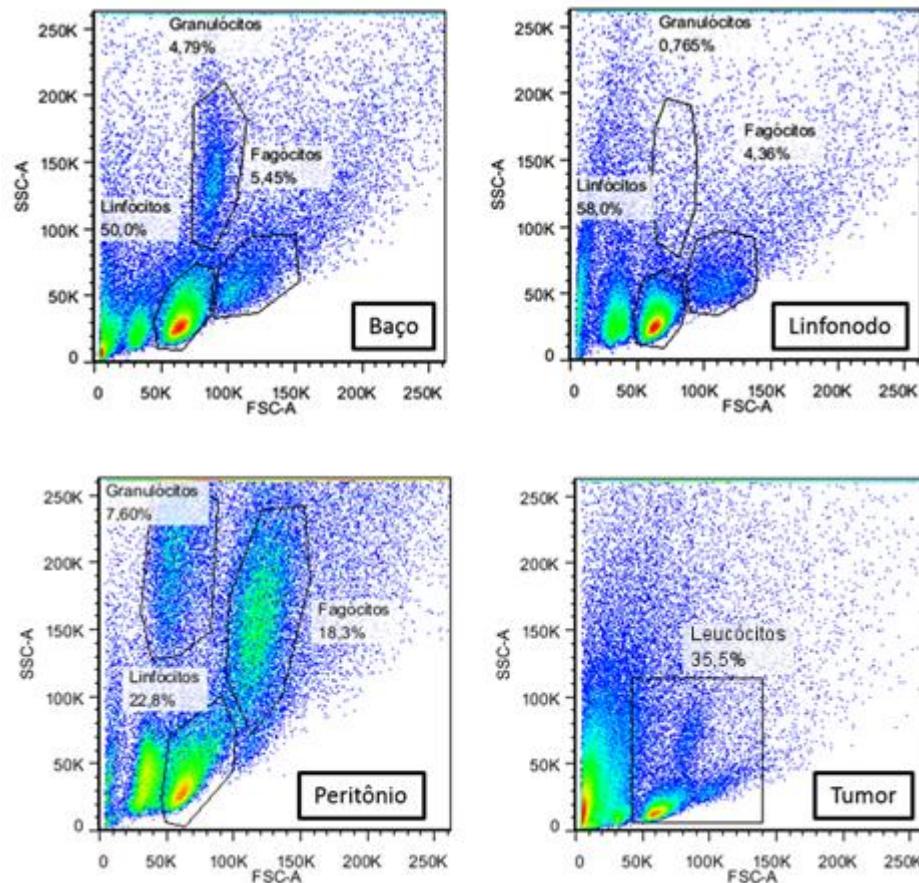


Figura 1: Estratégias de gates. Imagem das estratégias de *gates* utilizadas nas análises das populações celulares no baço, linfonodo, peritônio e tumor de camundongos C57BL/6 após 2, 7, 14 e 21 dias das injeções.

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 21 dias após dos desafios (figura não mostrada).

2.1.5 Histologia

Para avaliar o tipo e quantidade de infiltrado após 2, 7, 14 e 21 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, obtendo-se dois fragmentos: um para análises por citometria de fluxo e outro

para análises histopatológicas. Já o fragmento analisado do tumor corresponde à metade do material retirado.

Após obter material para as análises histopatológicas, este 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 sua arquitetura tecidual.
- Inclusão: Este procedimento consiste na impregnação do tecido com uma substância firme que permita posteriormente seccioná-la em camadas delgadas (cortes). Aqui foi utilizada a parafina, por ter um fácil manuseio e excelentes resultados. As etapas da inclusão compreendem a **desidratação**, quando é feita a retirada da água dos tecidos e a substituição por álcool, já que a parafina não é miscível em água. Em seguida, é realizada a **diafanização**, que consiste na substituição do álcool dos tecidos por xanol, 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 xanol é substituído por parafina fundida e catalogada em blocos.
- Microtomia: Esta etapa utiliza micrótomas com o objetivo de obter 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. Após lavados com água corrente por 10 minutos, os cortes são corados com eosina 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 catalogados para análises posteriores. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico convencional (NIKON ECLIPSE E200, Japão). Os resultados das análises histopatológicas foram utilizados como complementares aos 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 os resultados do teste de normalidade, as amostras foram classificadas como paramétricas. O teste ANOVA de uma ou duas vias com o pós-teste Bonferroni foi utilizada para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. Diferenças com valor de $p \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3. REFERÊNCIAS

- 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: 195-205.
- ALMEIDA SR, AROEIRA LS, FRYMULLER E, DIAS MA, BOGSAN CS, LOPES JD, et al. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. **Int Immunol.** 2001; 13: 1193-201.
- BRANDNER JM, HAASS NK. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. **Pathology.** 2013; 45: 443-52.
- De LORENZO BH, BRITO RR, GODOY LC, LOPES JD, MARIANO M. Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. **Immunol Lett.** 2007; 114: 110-8.
- DENARDO DG, ANDREU P, COUSSENS LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. **Cancer Metastasis Rev.** 2010; 29: 309-16.
- 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 Jan;1183:38-57.
- EGEBLAD M, NAKASONE ES, WERB Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. **Dev Cell.** 2010; 18: 884-901.
- GAJEWSKI TF, SCHREIBER H, FU YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nat Immunol.** 2013; 14: 1014-22.
- HAASS NK, SMALLEY KS, LI L, HERLYN M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res.** 2005 Jun;18(3):150-9.

HAYAKAWA K, HARDY RR, HERZENBERG LA. Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. **Eur J Immunol.** 1986; 16: 450-6.

HAYAKAWA K, HARDY RR, HONDA M, HERZENBERG LA, STEINBERG AD, HERZENBERG LA. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1984; 81: 2494-8.

HAYAKAWA K, HARDY RR, PARKS DR, HERZENBERG LA. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice. **J Exp Med.** 1983; 157: 202-18.

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: Inca; 2014.

JOYCE JA, POLLARD JW. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer.** 2009; 9: 239-52.

LENGAGNE R, POMMIER A, CARON J, DOGUET L, GARCETTE M, KATO M, et al. T cells contribute to tumor progression by favoring pro-tumoral properties of intra-tumoral myeloid cells in a mouse model for spontaneous melanoma. **PLoS One.** 2011; 6: e20235.

MAIRE C, VERCAMBRE-DARRAS S, DESMEDT E. [Diagnosis of melanoma]. **Rev Prat.** 2014 Jan;64(1):61-8.

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.

MURDOCH C, MUTHANA M, COFFELT SB, LEWIS CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer.** 2008; 8: 618-31.

NGUYEN DX, MASSAGUÉ J. Genetic determinants of cancer metastasis. **Nat Rev Genet.** 2007 May;8(5):341-52.

O'GARRA A, CHANG R, GO N, HASTINGS R, HAUGHTON G, HOWARD M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. **Eur J Immunol.** 1992; 22: 711-7.

OLIVEIRA HC, POPI AF, BACHI AL, NONOGAKI S, LOPES JD, MARIANO M. B-1 cells modulate the kinetics of wound-healing process in mice. **Immunobiology.** 2010; 215: 215-22.

QUAIL DF, JOYCE JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med.** 2013; 19: 1423-37.

ROBBINS & COTRAN. **Patologia básica.** Tradução da 8^a edição. Elsevier, 2008.

ROGERS TL, HOLEN I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. **J Transl Med.** 2011; 9: 177.

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

TAWBI HA, KIRKWOOD JM. Management of metastatic melanoma. **Semin Oncol.** 2007;34:532-45.

TIMM LL. Técnicas rotineiras de preparação e análises de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI.** 2005; 2: 231-239.

UGUREL S1, SCHRAMA D, KELLER G, SCHADENDORF D, BRÖCKER EB, Houben R, ZAPATKA M, FINK W, KAUFMAN HL, BECKER JC. Impact of the CCR5 gene polymorphism on the survival of metastatic melanoma patients receiving immunotherapy. **Cancer Immunol Immunother.** 2008 May;57(5):685-91.

VIGNA AF, GODOY LC, ROGERIO DE ALMEIDA S, MARIANO M, LOPES JD. Characterization of B-1b cells as antigen presenting cells in the immune response to gp43 from Paracoccidioides brasiliensis in vitro. **Immunol Lett.** 2002; 83: 61-6.

WETZEL K, STRUYF S, VAN DAMME J, KAYSER T, VECCHI A, SOZZANI S, ROMMELAERE J, CORNELIS JJ, DINSArt C. MCP-3 (CCL7) delivered by parvovirus MVmp reduces tumorigenicity of mouse melanoma cells through

activation of T lymphocytes and NK cells. **Int J Cancer.** 2007 Mar 15;120(6):1364-71.

ZHANG C, ZHANG F, TSAN R, FIDLER IJ. Transforming growth factor-beta2 is a molecular determinant for site-specific melanoma metastasis in the brain. **Cancer Res.** 2009 Feb 1;69(3):828-35.

4. ARTIGOS

4.1 Artigo 1 (Artigo a ser enviado para a *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*)

Artigo de revisão de literatura

Componentes do microambiente tumoral em modelo de melanoma

Components of the tumor microenvironment in melanoma model

José R. Carvalho*, Edilaine S. M. Nascimento*, Elizabeth C. Pérez Hurtado*

* Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, Campus Indianópolis, Av. Dr. José Maria Whitaker, São Paulo, São Paulo, Brasil.

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

Resumo

A incidência do câncer tem sido mundialmente alarmante nos últimos 10 anos, constituindo um grave problema de saúde pública, com expectativas de aumento para as próximas décadas. No Brasil, o câncer de maior prevalência é o de próstata, entretanto os cânceres de pele têm impactado de forma significativa. Dentre os cânceres de pele, o melanoma é o que mais causa óbitos devido a sua alta capacidade de metastatizar. Vários fatores estão envolvidos no

desenvolvimento do melanoma, entre eles destacam-se as interações das células neoplásicas com células normais presentes no local onde o tumor se desenvolve e mutações genéticas específicas, como a mutação do gene BRAF, que ocorre em cerca de 50% a 70% dos casos de melanoma humano. Nesta revisão, são apresentados os principais achados descritos nos últimos 10 anos em relação às mutações e às interações das células neoplásicas com os componentes do microambiente tumoral em modelo de melanoma.

Palavras-chave: Melanoma. Macrófagos. Células B-1. Linfócitos T. Citocinas.

Introdução

Entende-se por câncer o conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado e maligno de diversas linhagens celulares, podendo espalhar-se para outros sítios distantes do local de origem formando os tumores secundários ou metástases (Robbins e Cotran, 2008).

Hoje se sabe que o câncer é a segunda doença que mais causa óbitos no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Os cânceres podem ser causados por diversos fatores como hereditariedade, tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, medicamentos, fatores ambientais, os quais são responsáveis por 80% a 90% dos casos conhecidos (INCA, 2011).

O melanoma, um tipo de câncer de pele, representa apenas 4% das neoplasias malignas da pele, entretanto é considerado o mais grave devido à sua alta tendência para gerar metástases (INCA, 2014), que são responsáveis por aproximadamente 90% de todas as mortes relacionadas a este tipo de câncer (Nguyen e Massagué, 2007). O melanoma se origina nos melanócitos (Haass et al., 2005) e acomete principalmente adultos brancos (Revisado por Maire et al., 2014). Na progressão do melanoma, estão envolvidos múltiplos fatores como alterações genéticas no hospedeiro e interações com o microambiente onde o tumor se desenvolve (Revisado por Brandner e Haass, 2013).

A aquisição de fenótipos metastáticos por células de melanoma pode ocorrer pela mutação de genes específicos, como, por exemplo, a mutação no gene BRAF que codifica a proteína RAF, molécula constitutiva da via de sinalização intracelular RAS-RAF-MEK-ERK, (Revisado por Ott e Bhardwaj, 2013; Bello et al., 2013). A mutação em BRAF ocorre em cerca de 50 a 70% dos pacientes com melanoma e leva à constante ativação da cascata MAPK, que favorece a aquisição de um fenótipo metastático das células tumorais ao induzir proliferação, resistência a apoptose e neoangiogênese (Revisado por Ott e Bhardwaj, 2013; Bello et al., 2013).

Outras mutações que aparecem frequentemente em pacientes com melanoma e favorecem o comportamento mais agressivo do tumor são as mutações no gene GNAQ, que codifica a proteína de ligação ao nucleotídeo guanina (50% dos casos de melanoma) e mutações no gene NRAS (15% dos casos), que codifica a proteína RAS, molécula também constitutiva da via de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK (Revisado por Ott e Bhardwaj, 2013; Bello et al., 2013).

Microambiente tumoral e melanoma

Diversos estudos têm demonstrado que a aquisição de um fenótipo mais agressivo das células tumorais é dependente de interações diretas e/ou indiretas com os componentes do local onde o tumor se desenvolve (Revisado por Brandner e Haass, 2013). Esse comportamento mais agressivo das células tumorais é caracterizado pela proliferação incontrolada, evasão de supressores de crescimento, escape da resposta imune, indução de inflamação, angiogênese, instabilidade genômica, mutações, resistência à morte celular, invasão e metástases (Revisado por Hanahan e Weinberg, 2011; Brandner; Haass, 2013).

O microambiente tumoral, definido como o local de desenvolvimento do tumor, é formado não só por células neoplásicas, mas também por células do estroma, células do sistema imunológico e vários outros tipos de células não tumorais (Figura 1). Neste microambiente, também são encontrados outros elementos, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e nutrientes que podem igualmente favorecer alterações fenotípicas das células tumorais (Joyce; Pollard, 2009; Rogers; Holen, 2011; Revisado por: Quail e Joyce, 2013).

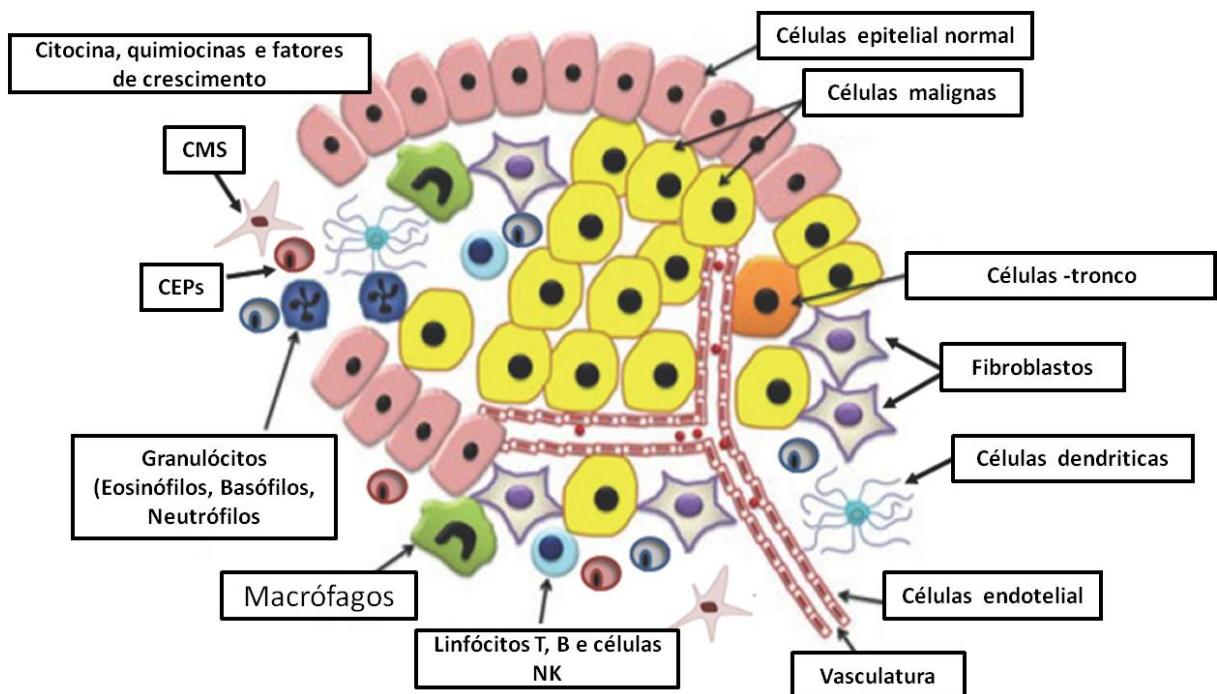


Figura 1: Microambiente tumoral. Modelo representativo dos componentes do microambiente tumoral. CMS = Células mesenquimais; CEPs = células endoteliais progenitoras. Figura adaptada de: Upreti et al., (2013)

As células do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral geralmente são células inflamatórias como macrófagos (TAMs, Macrófagos Associados ao Tumor), mastócitos, neutrófilos, linfócitos T e B, células *natural killer* (NK) e linfócitos T invariantes (células NKT) (Murdoch et al., 2008; Egeblad et al., 2010; DeNardo et al., 2010; Gajewski et al., 2013).

Macrófagos (TAMs) e melanoma

Os TAMs, maiores componentes do microambiente tumoral, são considerados importantes reguladores da tumorigênese por desempenhar papéis efetores durante a resposta ao desenvolvimento dos tumores. Entretanto, por serem células funcionalmente plásticas, que podem mudar seu estado de polarização de M-1 (macrófagos ativados pela via clássica) para M-2 (macrófagos ativados pela via alternativa), os TAMs podem também promover a progressão tumoral (Rogers e Holen, 2011; Quail e Joyce, 2013).

Os TAMs, quando ativados pela via clássica (IFN- γ , Interferon gama), se diferenciam em macrófagos M-1. Estes normalmente aparecem no microambiente tumoral em lesões iniciais (inflamação aguda), são capazes de eliminar células tumorais por produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio, secretam grandes quantidades de IL-12, que atua nas células NK, e linfócitos T CD8 $^{+}$, aumentando o potencial citotóxico destas células, favorecendo, assim, respostas do tipo Th1 ou antitumoral (Figura 2). Entretanto, na tentativa do sistema imunológico de manter a homeostasia do corpo, ou por mecanismos de evasão das células tumorais, os macrófagos passam a ser ativados pela via alternativa (IL-4 e IL-13) e se diferenciam em M-2 (Figura 3). Os macrófagos M-2 secretam grandes quantidades de IL-10, que regulam negativamente a resposta imunológica aos tumores, por interferir na ativação de células citotóxicas e favorecer um ambiente imunossupressor que favorece a progressão tumoral (Revisado por: Spano e Zollo, 2012; Allavena e Mantovani, 2012; Quail e Joyce, 2013). Os macrófagos do fenótipo M-2 também produzem fatores de crescimento como o VEGF (fator de crescimento endotelial), que contribui com a manutenção do tumor e facilita a formação de metástases por ser uma proteína que auxilia na produção de novos vasos sanguíneos e/ou linfáticos e metaloproteinases, como MMP-9, que degradam a matriz

extracelular para favorecer a formação de metástases (Revisado por Allavena e Mantovani, 2012).

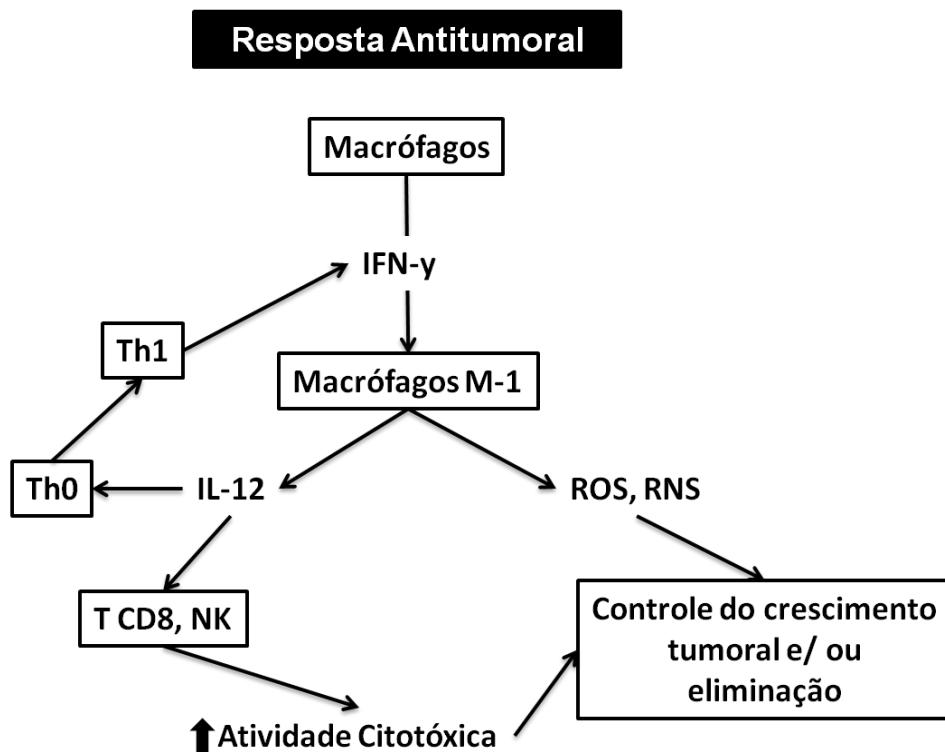


Figura 2. Ativação clássica dos macrófagos. Os macrófagos, após entrarem em contato com INF- γ no microambiente tumoral, polarizam para o perfil M-1, os quais passam a secretar grandes quantidades de IL-12, que auxilia na diferenciação de linfócitos Th0 em Th1. Os linfócitos Th1 produzem INF- γ , que mantém o ciclo de ativação clássica dos macrófagos. A IL-12 também age em células T CD8 e NK, aumentando o potencial citotóxico destas células e, consequentemente, auxiliando no controle e na eliminação de células tumorais. Os macrófagos ativados pela via clássica produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), que também auxiliam na eliminação de células tumorais. IL = interleucina

No microambiente do melanoma, assim como na maioria dos tumores sólidos, predominam os macrófagos do fenótipo M-2 (Tham et al., 2014; Schönhaar et al., 2014). Relatos da literatura têm mostrado que a polarização dos macrófagos para o perfil M-2 pode ser influenciada por células B-1 (Revisado por Lopes e Mariano, 2009; Wong et al., 2010).

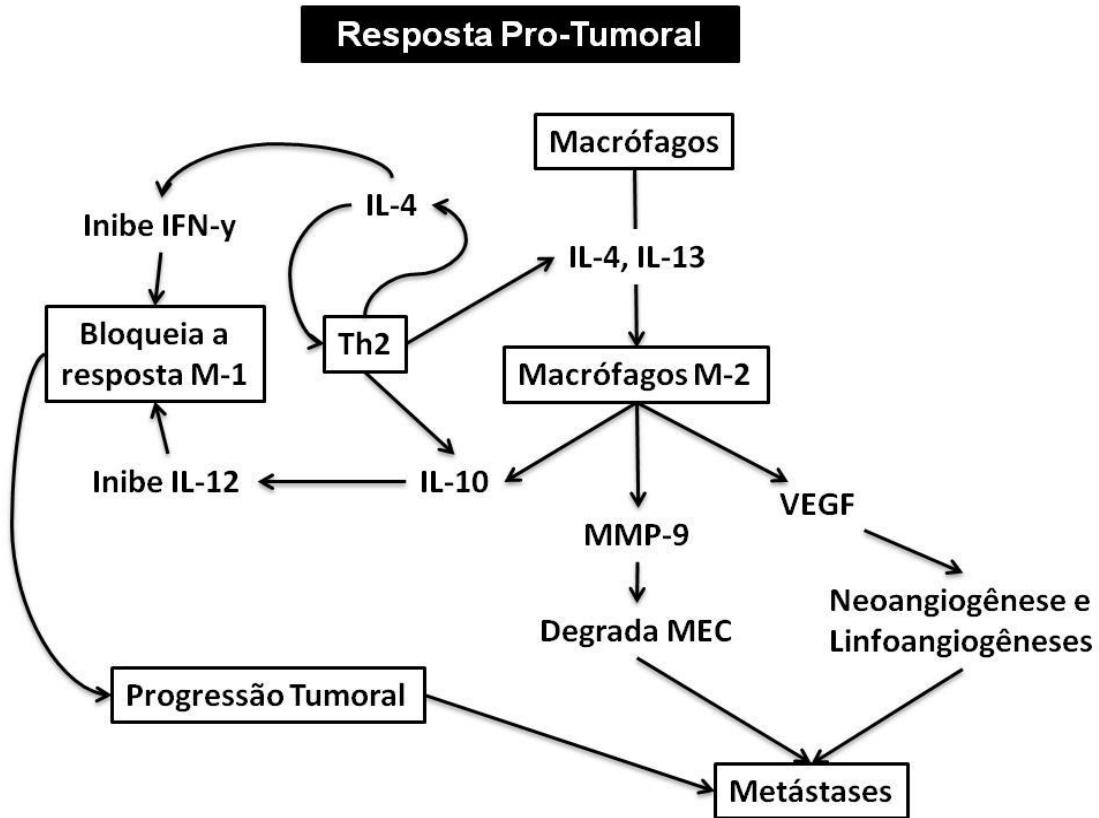


Figura 3. Ativação alternativa dos macrófagos. Os macrófagos, após entrarem em contato com as citocinas IL-4 e IL-13 no microambiente tumoral, polarizam para o perfil M-2, passando a secretar grandes quantidades de IL-10, que inibe a ação da IL-12 bloqueando a resposta do tipo Th1 e dando prevalência à resposta Th2, diminuindo a produção de INF- γ e assim auxiliando na progressão tumoral. Os macrófagos M-2 produzem MMP-9 (metaloproteinases), que degradam MEC (matriz extracelular) e produzem VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), que auxilia na formação de novos vasos no microambiente do tumor favorecendo a progressão tumoral e metástases. IL = Interleucina

Linfócitos B e melanoma

As células B-2, ou linfócitos B convencionais, são conhecidos por ser mediadoras da imunidade tumoral. Entretanto, os mecanismos utilizados para exercer esta função são controversos ou não estão completamente elucidados. Alguns autores postulam que no modelo de melanoma murino os linfócitos B aumentam a infiltração de linfócitos T citotóxicos e a produção de citocinas no microambiente tumoral, favorecendo a imunidade tumoral contra este tipo de células tumorais (Kobayashi et al., 2014).

No entanto, outros autores demonstram que as células B-2 no microambiente tumoral em modelos de melanoma secretam grandes quantidades de IL-10, que regula negativamente a resposta imunológica ao tumor por promover a polarização de macrófagos para um perfil imunossupressor (DiLillo et al., 2010; Inoue et al., 2006).

Outro tipo de linfócitos B, também estudados no modelo de melanoma murino, são as células B-1. Este tipo de linfócitos são encontrados predominantemente nas cavidades pleural e peritoneal de camundongos adultos (Hayakawa et al., 1984; Hayakawa et al., 1986), têm suas funções efetoras diversificadas participando tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, já que podem secretar imunoglobulinas (Hayakawa et al., 1986), apresentar抗ígenos (Vigna et al., 2002), oferecer memória imunológica (De Lorenzo et al., 2007) e secretar citocinas pró e anti-inflamatórias, como TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) (TNF- α) e IL-10 (O'Garra et al., 1992). Entre outras funções, as células B-1 também participam do processo de cicatrização tecidual (Oliveira et al., 2010) e atuam em diferentes respostas imunológicas mediadas por células T (Nogueira-Martins e Mariano, 2010). Em 2004, Popi et al. demonstraram em modelos *in vitro* que linfócitos B-1 em *cocultivo* com macrófagos, regulam negativamente a atividade fagocítica destas células, demonstrando um papel imunossupressor dos linfócitos B-1 pela alta secreção da citocina IL-10. Assim como demonstrado por Popi (2004), outros autores (Revisado por Lopes e Mariano, 2009; Wong et al., 2010) sugerem que células B-1 podem favorecer a polarização de macrófagos para um perfil M-2, o qual pode promover respostas pró-tumorais. Além disso, estudos *in vitro* mostraram que interações físicas entre linfócitos B-1 e células de melanoma murino B16F16 promovem aumento do potencial metastático dessas células tumorais (Perez et al., 2008, Staquicini et al., 2008, Xander et al., 2013). Embora tenha sido descrito que células B-1 podem migrar para focos de inflamação (Almeida et al., 2001), até o momento a presença de linfócitos B-1 no microambiente tumoral não tem sido abordada.

Linfócitos T e melanoma

Já se demonstrou *in vivo* que células de melanoma produzem quimiocinas que favorecem o recrutamento de linfócitos TCD8 específicos e células NKT para o sítio onde o tumor se desenvolve (Ugurel et al., 2008; Zhang et al, 2009). Uma vez que a principal função destas células é eliminar células alteradas, a presença delas no microambiente do tumor pode favorecer uma resposta antitumoral adequada (Wetzel et al., 2007).

Já as células T CD4⁺ desempenham papéis múltiplos na resposta antitumoral, por serem células auxiliadoras que participam tanto da ativação como da polarização de outras células. As células T CD4⁺ do perfil Th1 auxiliam na ativação clássica de macrófagos favorecendo a resposta antitumoral (Figura 2). Em contraste, as células T CD4⁺ do perfil Th2 exercem papéis pró-tumorais, por auxiliar na ativação alternativa dos macrófagos e bloquear a resposta do tipo Th1 (Fig. 1; Allavena e Mantovani, 2012; Quail e Joyce, 2013).

Recentemente Haabeth et al. (2014) revisaram que as células T CD4⁺ podem também realizar funções citotóxicas eliminando as células tumorais após o reconhecimento, via MHC de classe II, de抗ígenos tumorais expressos nessas células. Entretanto, ainda há várias questões em relação às funções citotóxicas das células TCD4 que devem ser esclarecidas em breve.

Interleucinas, quimiocinas e melanoma

As células de melanoma expressam vários tipos de citocinas e quimiocinas, entre outros fatores solúveis, que podem agir em outras células para apoiar seu comportamento maligno, favorecendo sua progressão e disseminação (Richmond et al., 2009).

Durante a progressão do melanoma, a produção de quimiocinas aumenta progressivamente no microambiente tumoral, em parte devido à alteração de vias de sinalização, como a via NF-kappa B (Richmond, 2002). As principais quimiocinas produzidas pelas células de melanomas são as CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7 e 8, que se ligam a receptores CXCR2, expressos em células endoteliais, promovendo, assim, o recrutamento dessas células para a formação de novos vasos no microambiente tumoral (Varney et al., 2003; Varney et al., 2006). A expressão da quimiocina CXCL8, junto com outras proteínas, possibilita às células de melanoma formar estruturas que anastomosam com vasos já formados, garantindo o aporte de nutrientes e oxigênio no interior do tumor. Este fenômeno é conhecido como mimetismo vasculogênico (Maniotis et al., 1999; Mourad-Zeidan et al., 2008). Além das quimiocinas angiogênicas, as células de melanoma também podem produzir quimiocinas angiostáticas, como a CXCL9, 10 e 11, que, quando ligadas ao receptor de quimiocina CXCR3, inibem a angiogênese (Mehrad et al., 2007; Keeley et al., 2008).

Em relação à presença de citocinas, Mantovani (2009) revisou o papel das citocinas inflamatórias no microambiente tumoral mostrando que elas favorecem a formação de metástases. Entre essas citocinas, a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são reguladas pelo fator de transcrição NF-kappa B.

Os receptores Toll-like (TLR) também podem agir na ativação da via NF-kappa B induzindo a expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas, para aumentar o processo inflamatório e o recrutamento de macrófagos, com a produção de citocinas e a ativação de vias de transdução de sinal, que podem promover o crescimento de tumores e metástases conforme demonstrado na Figura 3 e revisado por Wang et al., 2014.

Moretti et al. (1999) demonstraram que no microambiente de tumores primários de melanoma são encontradas altas concentrações de IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e seus receptores, IL-8, TNF- α , TGF- β e seus receptores e GM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos e

granulócitos) e seus receptores. A produção das citocinas, quimiocinas e seus receptores pode ativar diversas vias pró-metastáticas nas células tumorais, seja por mecanismos autócrinos, seja por interação indireta com outras células que sustentam o comportamento maligno das células neoplásicas.

Conclusões

Os dados apresentados nesta revisão nos levam a concluir que células de melanoma estabelecem constante comunicação com células não tumorais presentes no microambiente tumoral, seja para apoiar seu comportamento maligno, seja para favorecer sua eliminação. A presença de macrófagos M-1, linfócitos T CD4 tipo Th1, linfócitos T CD8 e células NKT no microambiente tumoral pode estar associada com uma melhor resposta antitumoral. Já a presença de macrófagos M-2, linfócitos T CD4 tipo Th2 e os linfócitos B-1 e B-2 pode estar relacionada com respostas pró-tumorais.

Além das interações das células tumorais com seu microambiente, a existência de mutações tanto nas células tumorais como nas não tumorais pode também favorecer o crescimento e a metastatização do melanoma assim como de outros tipos de tumores. Portanto, novos estudos devem ser realizados para identificar e caracterizar melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e na metastatização de tumores. Isto com o intuito de delinear novas estratégias para a prevenção e o controle de vários tipos de câncer.

Referências

- ALLAVENA, P. e MANTOVANI, A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin. Exp. Immunol.* v. 167, n. 2, p. 195-205, 2012.
- ALMEIDA, S.R.; AROEIRA, L.S.; FRYMULLER, E.; DIAS, M.A.; BOGSAN, C.S.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int. Immunol.* v. 13, n. 9, p. 1193-1201, 2001.
- BELLO, D.M.; ARIYAN, C.E.; CARVAJAL, R.D. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. *Cancer Control.* v. 20, n. 4, p. 261-281, 2013.
- BRANDNER, J.M. e HAASS, N.K. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology.* v. 45, n. 5, p.443-452, 2013.
- 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.
- De NARDO, D.G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L.M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* v. 29, n. 2, p. 309-316, 2010.
- DiLILLO, D.J.; MATSUSHITA, T.; TEDDER, T.F. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 1183, p. 38-57, 2010.
- EGEBLAD, M.; NAKASONE, E.S.; WERB, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell.* v. 18, n. 6, p. 884-901, 2010.
- GAJEWSKI, T.F.; SCHREIBER, H.; FU, Y.X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* v. 14, n. 10, p. 1014-1022, 2013.
- HAABETH, O.A.; TVEITA, A.A.; FAUSKANGER, M.; SCHJESVOLD, F.; LORVIK, K.B.; HOFGAARD, P.O.; OMHOLT, H.; MUNTHE, L.A.; DEMBIC, Z.; CORTHAY, A.; BOGEN, B. How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules?. *Front Immunol.* v.5, p. 174, 2014.
- 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, 2005.
- HANAHAN, D. e WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HAYAKAWA, K.; HARDY, R.R.; HERZENBERG, L.A. Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. *Eur. J. Immunol.* v. 16, n. 4, p. 450-456, 1986.
- HAYAKAWA, K.; HARDY, R.R.; HONDA, M.; HERZENBERG, L.A.; STEINBERG, A.D.; HERZENBERG, L.A. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 81, n. 8, p. 2494-2498, 1984.
- INOUE, S.; LEITNER, W.W.; GOLDING, B.; SCOTT, D. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res.* v. 66, n. 15, p. 7741-7747, 2006.

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.

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca; 2014.

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

KEELEY, E.C.; MEHRAD, B.; STRIETER, R.M. Chemokines as mediators of neovascularization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* v. 28, n. 11, p. 1928-1936, 2008.

KOBAYASHI, T.; HAMAGUCHI, Y.; HASEGAWA, M.; FUJIMOTO, M.; TAKEHARA, K.; MATSUSHITA, T. B Cells Promote Tumor Immunity against B16F10 Melanoma. *Am. J. Pathol.* v. 184, n. 11, p. 3120-3129, 2014.

LOPES, J.D. e MARIANO, M. B-1 cell: the precursor of a novel mononuclear phagocyte with immuno-regulatory properties. *An. Acad. Bras. Cienc.* v. 81, n. 3, p. 489-496, 2009.

MAIRE, C.; VERCAMBRE-DARRAS, S.; DESMEDT, E. [Diagnosis of melanoma]. *Rev. Prat.* v. 64, n. 1, p. 61-68, 2014.

MANIOTIS, A.J.; FOLBERG, R.; HESS, A.; SEFTOR, E.A.; GARDNER, L.M.; PE'ER, J.; TRENT, J.M.; MELTZER, P.S.; HENDRIX, M.J. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol.* v. 155, n. 3, p. 739-752, 1999.

MANTOVANI, A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature.* v. 457, n. 7225, p. 36-37, 2009.

MEHRAD, B.; KEANE, M.P.; STRIETER, R.M. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemost.* v. 97, n. 5, p. 755-762, 2007.

MORETTI, S.; PINZI, C.; SPALLANZANI, A.; BERTI, E.; CHIARUGI, A.; MAZZOLI, S.; FABIANI, M.; VALLECCHI, C.; HERLYN, M. Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *Int. J. Cancer.* v. 84, n. 2, p. 160-168, 1999.

MOURAD-ZEIDAN, A.A.; MELNIKOVA, V.O.; WANG, H.; RAZ, A.; BAR-ELI M. Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol.* v. 173, n. 6, p. 1839-1852, 2008.

MURDOCH, C.; MUTHANA, M.; COFFELT, S.B.; LEWIS, C.E. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* v. 8, n. 8, p. 618-631, 2008.

NGUYEN, D.X. e MASSAGUÉ, J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat. Rev. Genet.* v. 8, n. 5, p. 341-352, 2007.

NOGUEIRA-MARTINS, M.F. e MARIANO, M. B-1 cell participation in T-cell-mediated alloimmune response. *Immunobiology.* v. 215, n. 4, p. 264-274, 2010.

O'GARRA, A.; CHANG, R.; GO, N.; HASTINGS, R.; HAUGHTON, G.; HOWARD, M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur. J. Immunol.* v. 22, n. 3, p. 711-717, 1992.

OLIVEIRA, H.C.; POPI, A.F.; BACHI, A.L.; NONOGAKI, S.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. B-1 cells modulate the kinetics of wound-healing process in mice. *Immunobiology.* v. 215, n. 3, p. 215-222, 2010.

- OTT, P.A. e BHARDWAJ, N. Impact of MAPK Pathway Activation in BRAF(V600) Melanoma on T Cell and Dendritic Cell Function. *Front Immunol.* v. 28, n. 4, p. 346, 2013.
- 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, A.F.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. *Immunology*. v. 113, n.4, p. 348-354, 2004.
- QUAIL, D.F. e JOYCE, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 2013.
- RICHMOND, A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.* v. 2, n. 9, p. 664-674, 2002.
- RICHMOND, A.; YANG, J.; SU, Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* v. 22, n. 2, p. 175-186, 2009.
- ROBBINS e COTRAN. Patologia básica. Capítulo 6 (Neoplasias), tradução da 8^a edição. Elsevier. 2008.
- ROGERS, T.L. e HOLEN, I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J Transl. Med.* v. 9, p. 177, 2011.
- SCHÖNHAAR, K.; SCHLEDZEWSKI, K.; MICHEL, J.; DOLLT, C.; GKANIATSOU, C.; GÉRAUD, C.; KZHYSHKOWSKA, J.; GOERDT, S.; SCHMIEDER, A. Expression of stabilin-1 in M2 macrophages in human granulomatous disease and melanocytic lesions. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* v. 7, n. 4, p. 1625-1634, 2014.
- SPANO, D. e ZOLLO, M. Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. *Clin. Exp. Metastasis*. v. 29, n. 4, p. 381-395, 2012.
- STAQUICINI, F.I.; TANDLE, A.; LIBUTTI, S.K.; SUN, J.; ZIGLER, M.; BAR-ELI, M.; ALIPERTI, F.; PÉREZ, E.C.; GERSHENWALD, J.E.; MARIANO, M.; PASQUALINI, R.; ARAP, W.; LOPES, J.D. 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.* v. 68, n. 20, p. 8419-8428, 2008.
- THAM, M.; TAN, K.W.; KEEBLE, J.; WANG, X.; HUBERT, S.; BARRON, L.; TAN, N.S.; KATO, M.; PREVOST-BLONDEL, A.; ANGELI, V.; ABASTADO, J.P. Melanoma-initiating cells exploit M2 macrophage TGFβ and arginase pathway for survival and proliferation. *Oncotarget*. 2014. Online ISSN: 1949-2553.
- UGUREL, S.; SCHRAMA, D.; KELLER, G.; SCHADENDORF, D.; BRÖCKER, E.B.; HOUBEN, R.; ZAPATKA, M.; FINK, W.; KAUFMAN, H.L.; BECKER, J.C. Impact of the CCR5 gene polymorphism on the survival of metastatic melanoma patients receiving immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* v.57, n. 5, p. 685-691, 2008.
- UPRETI, M.; JYOTI, A.; SETHI, P. Tumor microenvironment and nanotherapeutics. *Transl. Cancer Res.* v. 2, n. 4, p. 309-319, 2013.
- VARNEY, M.L.; JOHANSSON, S.L.; SINGH, R.K. Distinct expression of CXCL8 and its receptors CXCR1 and CXCR2 and their association with vessel density and aggressiveness in malignant melanoma. *Am. J. Clin. Pathol.* v. 125, n. 2, p. 209-216, 2006.
- VARNEY, M.L.; LI, A.; DAVE, B.J.; BUCANA, C.D.; JOHANSSON, S.L.; SINGH, R.K. Expression of CXCR1 and CXCR2 receptors in malignant melanoma with different

- metastatic potential and their role in interleukin-8 (CXCL-8)-mediated modulation of metastatic phenotype. *Clin. Exp. Metastasis.* v. 20, n. 8, p. 723-731, 2003.
- VIGNA, A.F.; GODOY, L.C.; ROGERIO DE ALMEIDA, S.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Characterization of B-1b cells as antigen presenting cells in the immune response to gp43 from Paracoccidioides brasiliensis in vitro. *Immunol Lett.* v. 83, n. 1, p. 61-66, 2002.
- WANG, J.Q.; JEELALL, Y.S.; FERGUSON, L.L.; HORIKAWA, K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front Immunol.* v. 5, p. 367, 2014.
- WETZEL, K.; STRUYF, S.; VAN DAMME, J.; KAYSER, T.; VECCHI, A.; SOZZANI, S.; ROMMELAERE, J.; CORNELIS, J.J.; DINSART, C. MCP-3 (CCL7) delivered by parvovirus MVMp reduces tumorigenicity of mouse melanoma cells through activation of T lymphocytes and NK cells. *Int. J. Cancer.* v. 1120, n. 6, p. 1364-1371, 2007.
- WONG, S.C.; PUAX, A.L.; CHITTEZHATH, M.; SHALOVA, I.; KAJIJI, T.S.; WANG, X.; ABASTADO, J.P.; LAM, K.P.; BISWAS, S.K. Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. *Eur. J. Immunol.* v. 40, n. 8, p. 2296-307, 2010.
- XANDER, P.; BRITO, R.R.; PÉREZ, E.C.; POZZIBON, J.M.; DE SOUZA, C.F.; PELLEGRINO, R.; BERNARDO, V.; JASIULIONIS, M.G.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Crosstalk between B16 melanoma cells and B-1 lymphocytes induces global changes in tumor cell gene expression. *Immunobiology.* v. 218, n. 10, p. 1293-1303, 2013.
- YANG, J.; AMIRI, K.I.; BURKE, J.R.; SCHMID, J.A.; RICHMOND, A. BMS-345541 targets inhibitor of kappaB kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor kappaB and mitochondria pathways. *Clin. Cancer Res.* v. 12, n. 3 Pt 1, p. 950-960, 2006.
- YANG, J.; PAN, W.H.; CLAWSON, G.A.; RICHMOND, A. Systemic targeting inhibitor of kappaB kinase inhibits melanoma tumor growth. *Cancer Res.* v. 67, n. 7, p. 3127-3134, 2007.
- ZHANG, C.; ZHANG, F.; TSAN, R.; FIDLER, I.J. Transforming growth factor-beta2 is a molecular determinant for site-specific melanoma metastasis in the brain. *Cancer Res.* v. 69, n. 3, p. 828-835, 2009.

4.2 Artigo 2 (Artigo a ser enviado ao *International Journal of Experimental Pathology*)

Identificação e caracterização das células do sistema imune presentes no microambiente tumoral em modelo de melanoma murino

Células B-1: novo componente do microambiente tumoral

José R. Carvalho¹, Edilaine S. M. Nascimento¹, Fabiana T. C. Konno¹, Leoni V. Bonamim¹, José Guilherme Xavier¹, José Daniel Lopes², Elizabeth C. Pérez Hurtado^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, Brazil. ²Disciplina 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

Recentes estudos têm demonstrado que no microambiente onde o tumor se desenvolve existe uma conversa dinâmica entre as células tumorais e as células do sistema imune, que podem tanto favorecer como inibir o crescimento do tumor e/ou a formação de metástases. Entretanto, pouco se conhece sobre a cinética de migração dessas células ao local onde o tumor se desenvolve. Assim, o intuito do presente trabalho foi verificar alterações na porcentagem de linfócitos T CD4, linfócitos B e macrófagos nos tecidos linfoideos durante o desenvolvimento do

melanoma. Para isto, camundongos C57BL/6 foram injetados subcutaneamente com células de melanoma murino B16F10 ou com PBS para avaliação das populações celulares no peritônio, baço, linfonodo e sítio de injeção do tumor após 2, 7, 14 e 21 dias do desafio tumoral. Análises dos resultados obtidos na citometria de fluxo revelaram aumento no percentual de linfócitos B-2 e B-1 no microambiente tumoral após 2, 14 e 21 dias, respectivamente. Mas as análises das populações de CD4 e fagócitos presentes no microambiente tumoral nos mesmos períodos não evidenciaram diferenças notáveis, quando comparadas às percentagens dessas células presentes no mesmo local em animais injetados com PBS. Em contraste aos achados no microambiente tumoral, a percentagem de linfócitos B-1 diminuiu no peritônio após 21 dias do desafio. Este achado sugere possível migração dos linfócitos B-1 do peritônio ao local onde o tumor se desenvolve. Assim, estes dados em conjunto confirmam a presença de linfócitos B-2 no microambiente tumoral e revelam pela primeira vez o aparecimento de um novo componente do microambiente tumoral: os linfócitos B-1.

Palavras-chave: Microambiente tumoral. Melanoma murino. Linfócitos B-1. Linfócitos B-2.

INTRODUÇÃO

Melanoma é considerado o mais agressivo dos cânceres de pele pelo seu alto potencial para produzir metástases, que são as responsáveis por aproximadamente 90% de todas as mortes relacionadas a este tipo de câncer (Weber et al., 2007; Nguyen; Massagué, 2007; Spano; Zollo, 2012; Weinstein et al., 2014).

A formação de metástases é um processo complexo no qual as células tumorais adquirem propriedades que permitem degradar a matriz extracelular (MEC), viajar através de vasos sanguíneos e/ou linfáticos e invadir órgãos e tecidos diferentes do local de origem do tumor (Nguyen; Massagué 2007; Spano; Zollo 2012). Para isso acontecer, diversos estudos têm mostrado que as células tumorais interagem de forma direta ou indireta com os componentes do microambiente onde o tumor se desenvolve (Brandner; Haass, 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 imune e vários outros tipos de células. Neste local, são encontrados também outros elementos, como citocinas e quimiocinas, fatores de

crescimento, produzidos tanto pelas células do estroma quanto pelas células tumorais (Joyce; Pollard, 2009; Rogers; Holen, 2011; Quail; Joyce, 2013).

As células do sistema imune presentes no microambiente tumoral geralmente são células inflamatórias, como macrófagos (TAMs, Macrófagos Associados ao Tumor), mastócitos, neutrófilos, linfócitos T e B, células *natural killer* (NK) e linfócitos T invariantes (células NKT) (Murdoch et al., 2008; Egeblad et al., 2010; DeNardo et al., 2010; Gajewski et al., 2013). Os TAMs, são considerados importantes reguladores da tumorigênese por desempenhar papéis efetores importantes na resposta antitumoral. Entretanto, por serem células funcionalmente plásticas, que podem mudar seu estado de polarização de M-1, quando ativados pela via clássica (IFN- γ), para M-2, quando ativados pela via alternativa (IL-4 e IL-13), os TAMs podem também promover a progressão tumoral (Mosser; Edwards, 2008; Rogers; Holen, 2011; Quail; Joyce, 2013).

Relatos da literatura têm mostrado que as células B-1, um subtipo de linfócitos B encontrado predominantemente nas cavidades pleural e peritoneal de camundongos, modulam a polarização de macrófagos para um perfil imunossupressor (Revisado por: Lopes; Mariano, 2009; Wong et al., 2010). Por sua vez, as células B-2, ou linfócitos B convencionais, são conhecidas por ter um papel importante como mediadoras da imunidade tumoral (Kobayashi et al., 2014). Entretanto, os mecanismos utilizados para exercer esta função são controversos ou não estão completamente elucidados.

Embora existam evidências da presença das células do sistema imune no microambiente, ainda não está bem caracterizada a cinética de migração destas células dos órgãos linfoideos secundários ao sítio do tumor nas fases iniciais do desenvolvimento do melanoma murino. Por isto, no atual trabalho, investigamos as populações de células TCD4, linfócitos B, B-1 e macrófagos no baço, linfonodo, peritônio e tumor, com o intuito de verificar a cinética dessas células após 2, 7, 14 e 21 dias do desafio com células tumorais ou injúria por injeção de PBS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 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 patogênicos (SPF), em microisoladores com água e ração autoclavadas. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Paulista (Protocolo n. 171/13 CEP/ICS/UNIP).

Cultura de células

As células de melanoma murino B16F10 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) em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. O descolamento das células para posteriores ensaios foi realizado por breve exposição ao PBS 1% + EDTA 2 mM.

Desafio tumoral

Os animais correspondentes ao grupo experimental foram injetados subcutaneamente no dorso direito com 1×10^5 de células B16F10, ressuspensas em 100 µL de PBS 1X. Como controles, foram adicionados dois grupos: grupo PBS, animais injetados somente com 100 µL de PBS, e grupo controle, animais sem injeção.

Citometria de fluxo

Células do baço, linfonodo, lavado peritoneal e sítio de injeção das células tumorais foram coletadas, lavadas e tratadas com tampão de hemólise. Para cada

amostra, 1×10^6 células foram incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 por 20 min a 4 °C. Após a lavagem, as células foram 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%. Para análises das populações celulares presentes no microambiente tumoral, células foram também marcadas com anti-CD45 para diferenciar a população leucocitária ($CD45^+$) das células tumorais ($CD45^-$). Células marcadas foram adquiridas em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Bioscience). Os quadrantes para a definição das populações celulares foram determinados com base na fluorescência de células não marcadas. Os dados foram analisados usando os softwares de análise FlowJo (Tree Star, USA) e GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA). As populações analisadas foram: linfócitos T CD4 ($CD19^-$ e $CD4^+$), linfócitos B convencionais ($CD19^+$ e $CD23^+$), linfócitos B-1 ($CD19^+$ e $CD23^-$) e macrófagos ($CD19^-$ e $CD11b^+$).

Histologia

Fragmentos de baço e de tumor ou sítio de injeção tumoral foram coletados após 2, 7, 14 e 21 dias do desafio do tumor nos animais injetados com células tumorais, com PBS ou sem injeção. Amostras foram fixadas em formol 10% para posterior confecção de bloco de parafina. Lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para 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, respectivamente. Diferenças com valor de $p \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

RESULTADOS

Linfócitos T CD4 no baço aumentam após 7 dias da injeção de células de melanoma.

Com o intuito de verificar possíveis alterações nos percentuais de linfócitos T CD4, B e fagócitos, no baço, linfonodo, peritônio e sítio de injeção durante o desenvolvimento do melanoma, animais C57BL/6 foram ou não (grupo controle) desafiados com células de melanoma B16F10 (grupo experimental) ou somente PBS (grupo PBS). Análises das populações celulares presentes no baço mostraram diferenças significantes no percentual de linfócitos T CD4 ($CD19^-$, $CD4^+$) no grupo experimental quando comparados com os grupos controle e PBS, após 7 e 14 dias do desafio. No entanto, análises para identificação destas células no linfonodo, peritônio e no tumor não revelaram diferenças estatísticas quando comparado aos grupos PBS e controle em 2, 7, 14 e 21 dias após o desafio (Figura 1).

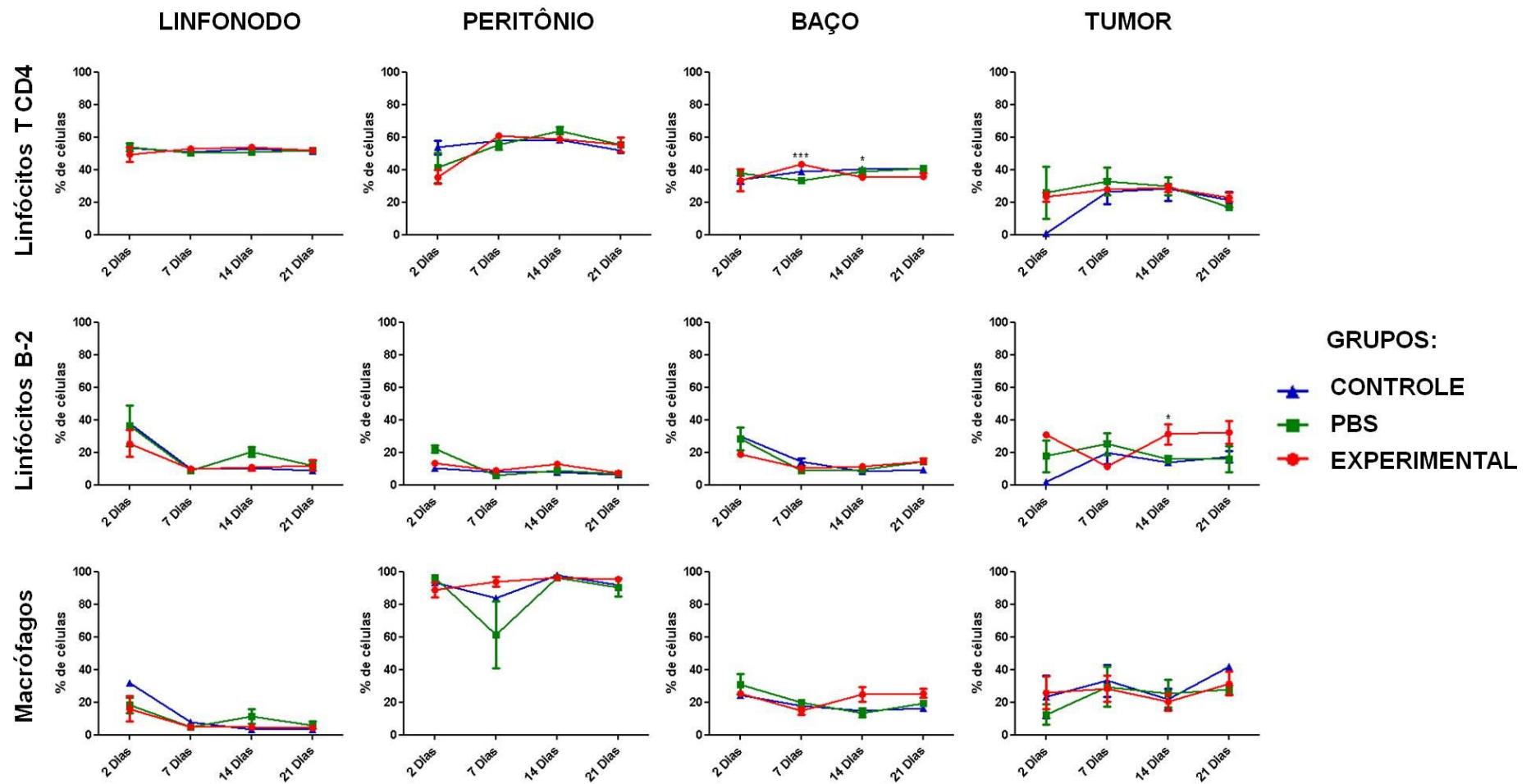


Figura 1: Populações celulares em camundongos C57BL/6 após desafio com células de melanoma B16F10. Grupos de camundongos sem injeção (Controle) ou injetados com PBS 1X (PBS) ou com 1×10^5 células de melanoma B16F10 (Experimental) foram eutanasiados após 2, 7, 14 e 21 dias do desafio. Células obtidas do linfonodo inguinal direito (Linfonodo), peritônio ou de fragmento do 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 ($CD19^-$, $CD4^+$), células B-2 ($CD19^+$, $CD23^+$) e 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. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Células B16F10 promovem aumento do percentual de linfócitos B-2 e B-1 no sitio onde o tumor se desenvolve.

Análise da população leucocitária ($CD45^+$) presente no sitio de injeção das células tumorais, mostraram aumento significativo da percentagem de linfócitos B-2 e B-1, após 14 e 2, 14 , 21 dias, respectivamente do desafio, no grupo experimental quando comparado com os grupos controle e PBS (Figuras 2 e 3).

De acordo com o mostrado na Figura 2, linfócitos B-1 aumentam no microambiente tumoral em 2, 14 e 21 dias após desafio com células de melanoma. Interessantemente, a avaliação dessas células no peritônio revelou redução significante dessas células só após 21 dias (Figura 4).

Análise do percentual de linfócitos B-1 foi também realizado no linfonodo e no baço, entretanto não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimental, PBS e controle, possivelmente porque esta população celular é quase inexistentes no linfonodo e baço (Figura não mostrada).

De forma semelhante com os linfócitos B-1, o percentual de fagócitos não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos, no baço e no linfonodo. Mais surpreendentemente ainda, também no peritônio e no microambiente tumoral, o percentual de fagócitos se manteve relativamente semelhante entre os grupos experimental, PBS e controle (Tabela 1).

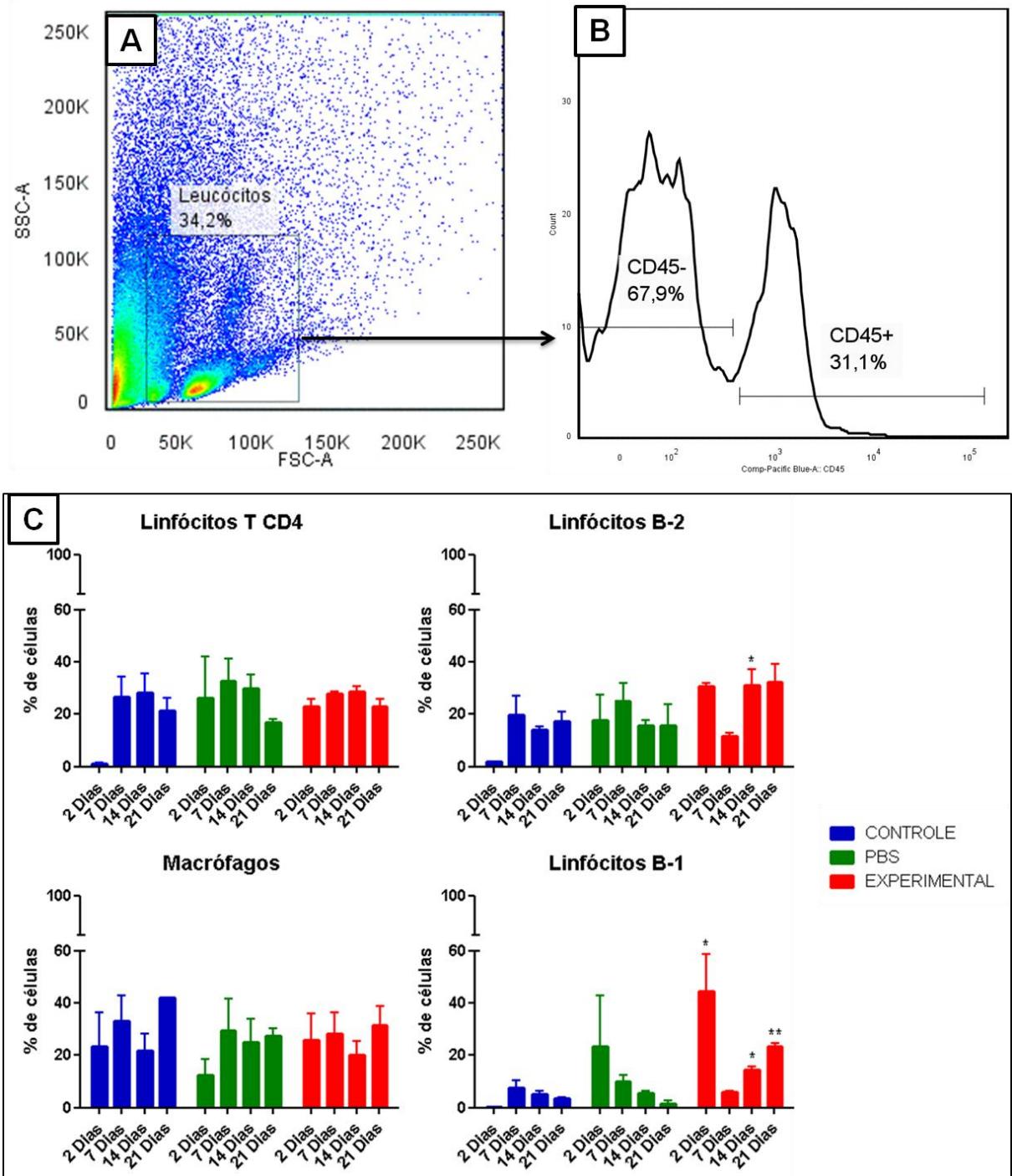


Figura 2. Percentual de células presentes no microambiente tumoral. Para análises da população leucocitária presente no microambiente tumoral (A), células foram primeiramente selecionadas pela expressão do marcador CD45 (B). Da população CD45+, foram identificados os linfócitos T CD4 (CD19-, CD4+), B-2 (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 *versus* PBS.

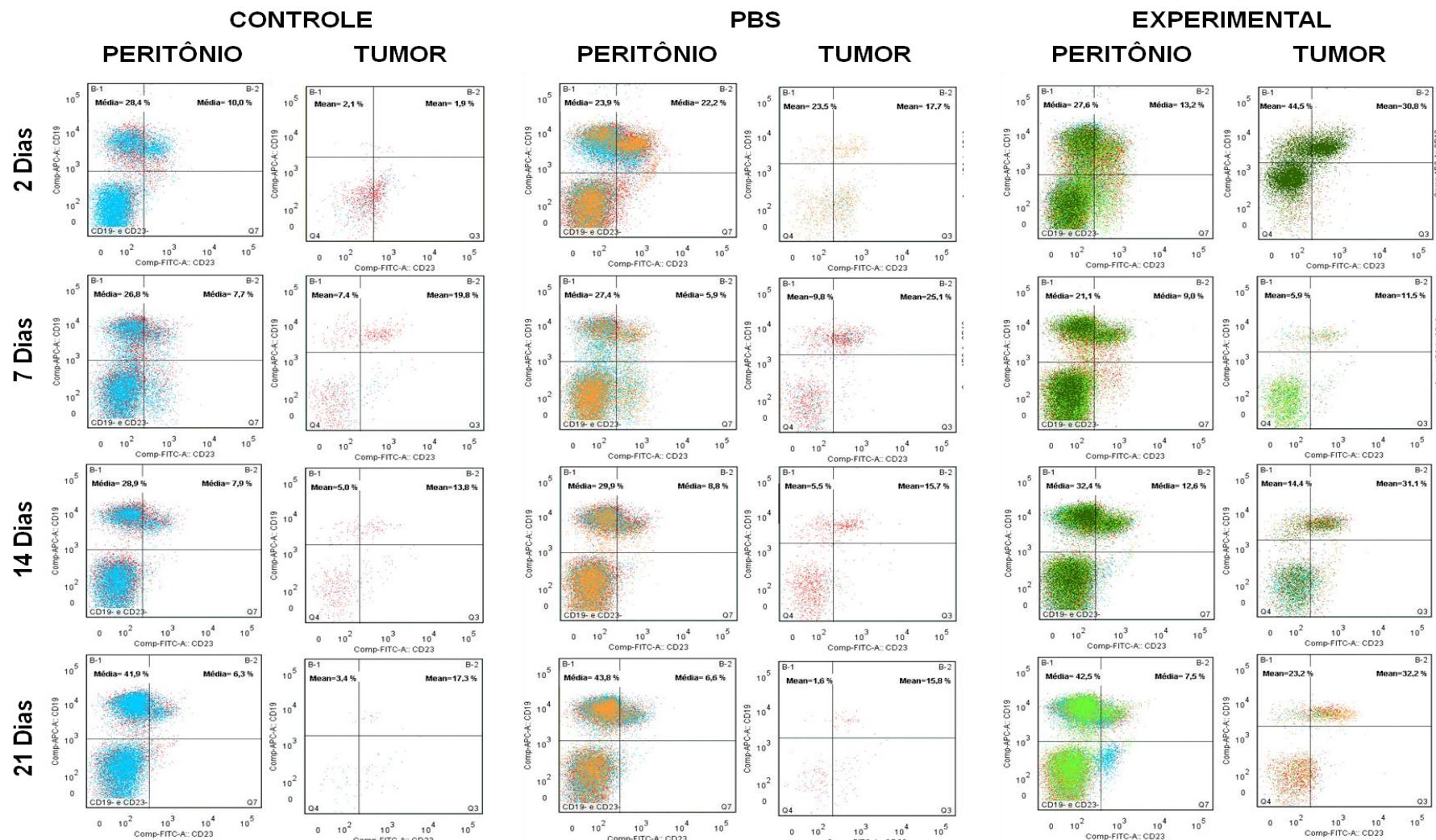


Figura 3: Avaliação de linfócitos B e B-1 no peritônio e no tumor. Grupos de camundongos sem injeção (Controle) ou injetados com PBS 1X (PBS) ou com 1×10^5 células de melanoma B16F10 (Experimental) foram eutanasiados após 2, 7, 14 e 21 dias do desafio. Células peritoneais totais ou de sítio de injeção das células tumorais/PBS (Tumor) foram submetidas a análises por citometria de fluxo para identificação de linfócitos B-2 ($CD19^+$, $CD23^+$) e B-1 ($CD19^+$, $CD23^-$). Gráficos correspondem ao valor médio dos percentuais de linfócitos B-2 e B-1 presentes no gate de leucócitos.

Tabela 1: Resumo das populações celulares observadas após 2, 7, 14 e 21 dias do desafio com PBS ou com células tumorais B16F10. Grupos de camundongos injetados com PBS 1X (PBS) ou com 1×10^5 células de melanoma B16F10 (Experimental) no dorso direito foram eutanasiados após 2, 7, 14 e 21 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). * $p < 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p < 0,001$.

	LINFONODO		PERITÔNIO		BAÇO		TUMOR	
	PBS	EXPERIMENTAL	PBS	EXPERIMENTAL	PBS	EXPERIMENTAL	PBS	EXPERIMENTAL
2 Dias	Linfócitos B-1	3,1%	2,7%	23,9%	27,6%	13,0%	10,0%	23,5% 44,5% * ↑
	Linfócitos B-2	36,4%	25,5%	22,2%	13,2%	28,2%	19,0%	17,2% 30,8%
	Macrófagos	18,1%	16,0%	96,1%	88,8%	30,0%	25,0%	12,4% 25,9%
	Linfócitos T CD4	53,9%	49,3%	41,1%	35,4%	37,7%	33,4%	26,0% 23,1%
7 Dias	Linfócitos B-1	1,3%	1,8%	27,4%	21,1%	6,7%	7,2%	9,8% 5,9%
	Linfócitos B-2	8,6%	10,0%	5,9%	9,0%	8,9%	10,2%	25,1% 11,5%
	Macrófagos	4,8%	5,0%	61,1%	93,8%	19,2%	14,8%	29,4% 28,4%
	Linfócitos T CD4	50,1%	52,9%	55,1%	61,0%	33,3%	43,1% *** ↑	26,5% 28,0%
14 Dias	Linfócitos B-1	3,7%	2,2%	29,9%	32,4%	9,4%	13,3%	5,5% 14,4% * ↑
	Linfócitos B-2	20,2%	11,0%	8,8%	12,6%	9,5%	11,2%	15,7% 31,1% * ↑
	Macrófagos	11,2%	4,6%	96,5%	96,5%	13,3%	24,2%	25,2% 20,2%
	Linfócitos T CD4	50,8%	53,7%	63,9%	59,0%	38,7%	35,5% * ↓	29,7% 28,6%
21 Dias	Linfócitos B-1	2,0%	2,0%	43,8%	29,2% *** ↓	11,7%	11,0%	1,6% 23,2% ** ↑
	Linfócitos B-2	11,8%	12,0%	6,6%	7,5%	14,3%	14,1%	15,8% 32,2%
	Macrófagos	6,0%	4,4%	90,2%	95,5%	19,7%	25,2%	27,6% 31,4%
	Linfócitos T CD4	52,5%	51,6%	55,4%	55,2%	40,7%	36,0%	17,0% 22,9%

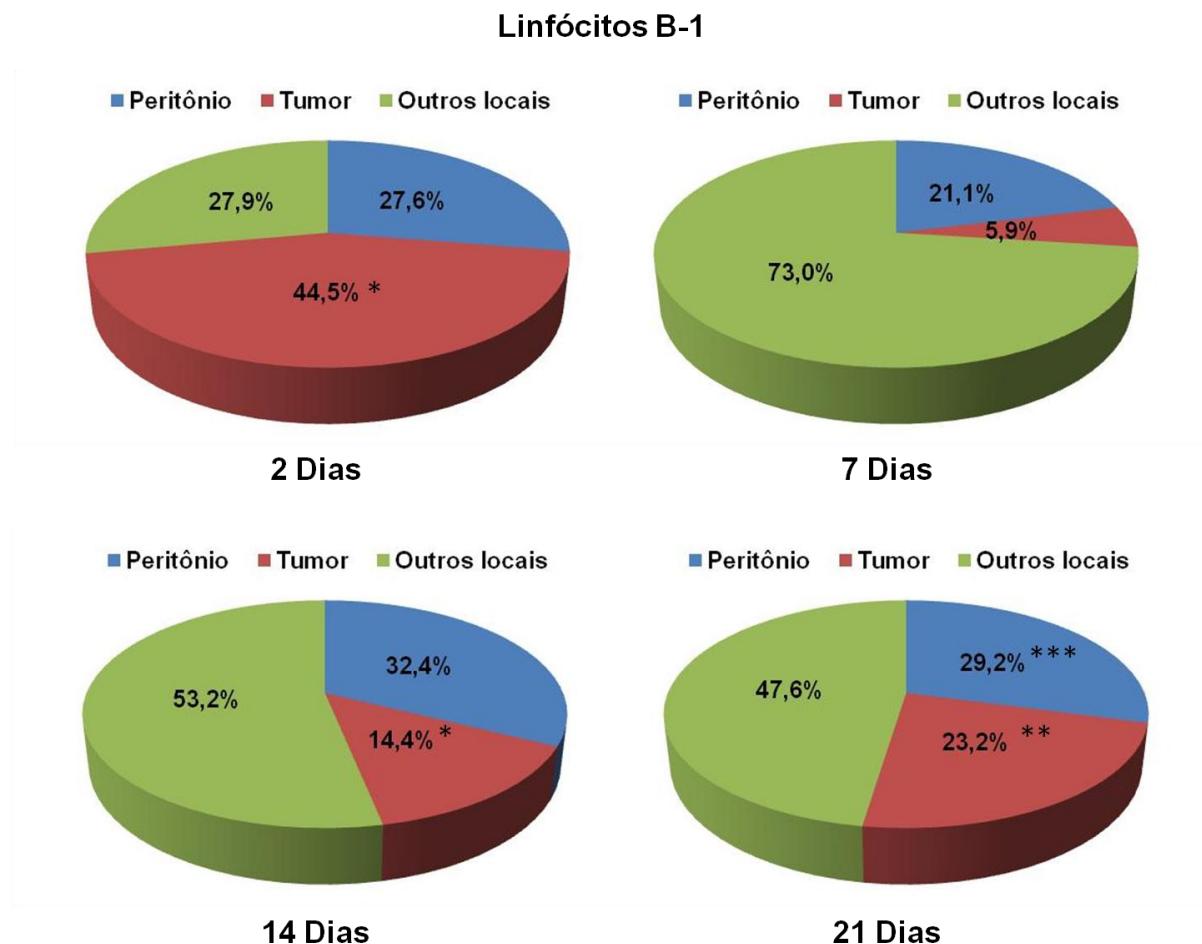


Figura 4: Distribuição do percentual de linfócitos B-1 no tumor e peritônio dos animais desafiados com células de melanoma B16F10. Células obtidas de fragmento do sítio de injeção das células tumorais ou células peritoneais totais foram submetidas a análises por citometria de fluxo para identificação de linfócitos B-1 ($CD19^+$, $CD23^+$). Valores correspondem ao valor médio dos percentuais de linfócitos B-1 presentes no tumor e peritônio no (gate de leucócitos). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. O valor de “ p ” corresponde àquele calculado entre o grupo experimental e o grupo PBS no tumor e peritônio.

Infiltrado leucocitário na região da injeção das células tumorais é maior após 14 dias do desafio

Para melhor caracterizar o tipo de infiltrado presente no sítio de injeção do PBS ou das células tumorais, análises histopatológicas com coloração de HE foram realizadas nos fragmentos de baço e tumor após 2, 7, 14 e 21 dias. De acordo com o observado na Figura 5, células de melanoma B16F10 comumente se ajustam umas às outras mantendo um padrão celular e preservando sua arquitetura em todas as fases aqui analisadas. As células de melanoma são células de crescimento acelerado, e, aos 21 dias aproximadamente da injeção das células tumorais, o tumor

chega a atingir a epiderme, evidenciando lesões ulcerativas, degradação de tecido muscular e formação de novos vasos que podem favorecer o crescimento e a metastatização das células tumorais (Figura 5 G, H).

De acordo com os achados nas análises de citometria de fluxo, avaliações histopatológicas da região de injeção das células tumorais apresentam um infiltrado maior após 2 e 14 dias do desafio somente com células tumorais (Figura 5). Uma avaliação mais criteriosa dos ensaios revela infiltrado leucocitário perivascular em 2 dias (Figura 5 A e B). Em 7 dias, o infiltrado é escasso, mas, após 14 dias, o infiltrado fica visível, predominando principalmente a população linfoide (Figura 5 F).

Em contraste com o tumor, as análises histopatológicas do baço não evidenciaram diferenças morfológicas relevantes entre os grupos PBS, tumor, e controle (figura não mostrada).

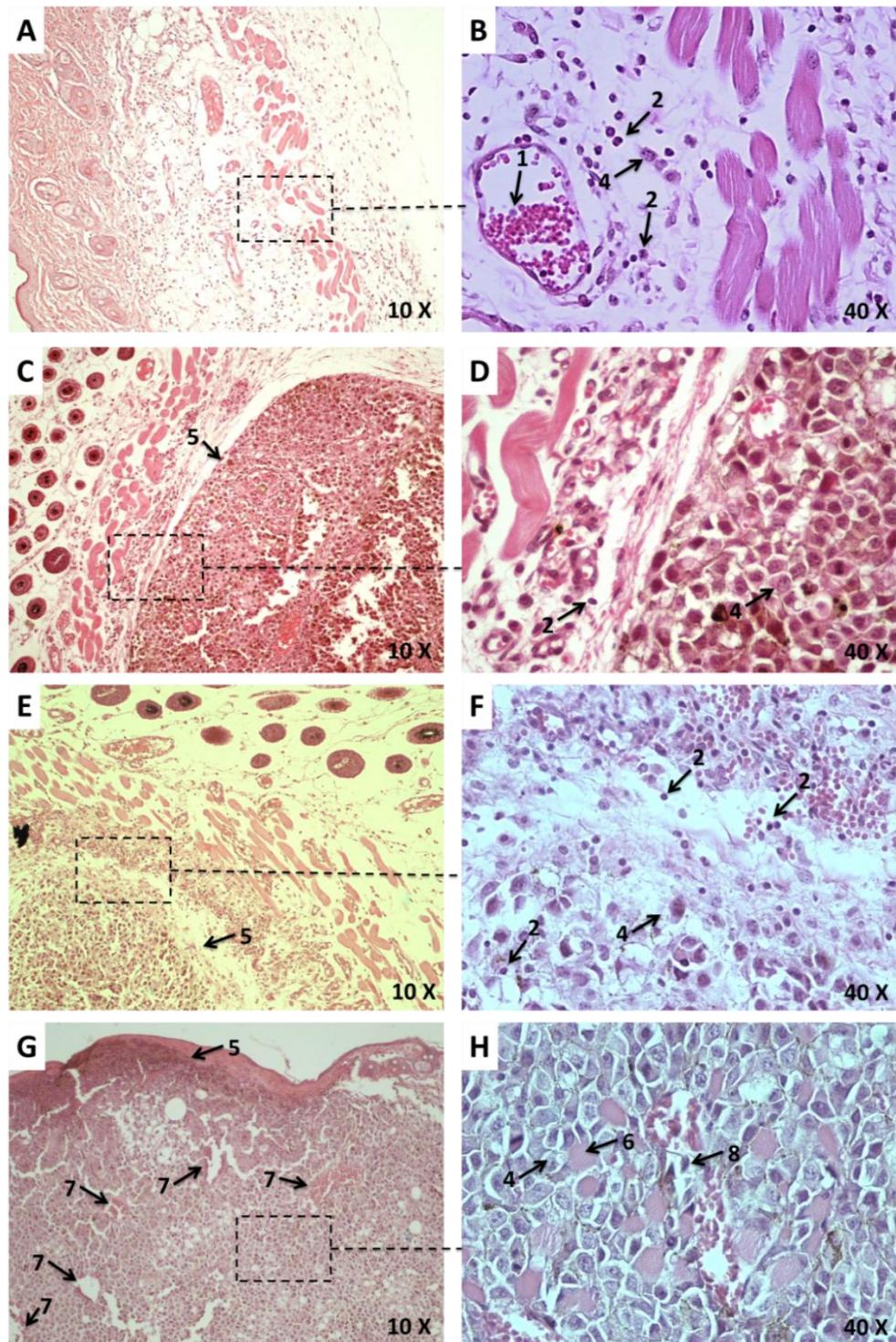


Figura 5: Micrografias do microambiente tumoral em 2, 7, 14 e 21 (G, H) dias após injeções de células B16F10. Em 2 dias (A e B), pode ser observada possível migração leucocitária (setas 1 e 2) para o local da injeção das células tumorais (seta 4). Em 7 dias (C e D), já foi possível observar a formação do nódulo tumoral (seta 5) na hipoderme, entretanto o infiltrado leucocitário era baixo (seta 2) e as células tumorais (seta 4). Em 14 dias (E e F), o nódulo tumoral (seta 5) aproxima-se da derme e o infiltrado leucocitário volta a aumentar (seta 2). Em 21 dias (G e H), o nódulo tumoral já tomou toda a derme e atinge a epiderme causando ulcerações (seta 5), promovendo a formação de novos vasos (seta 7) e a degradação de tecidos musculares (seta 6). Este cenário pode ser favorável a metástases, nas quais é comum observar células tumorais atingindo a luz da circulação (seta 8). Imagens captadas no microscópio óptico convencional (NIKON ECLIPSE E200, Japão) no aumento de 10X e 40X, conforme indicado na figura.

DISCUSSÃO

De acordo com dados da literatura, nossos achados corroboram o influxo de células do sistema imune no local de injúria, seja pela injeção de PBS, seja pelo desafio com células tumorais (Murdoch et al., 2008; Egeblad et al., 2010; DeNardo et al., 2010; Gajewski et al., 2013). Entretanto, até o momento pouco tem sido mostrado em relação à cinética dessas células durante a evolução de tumores.

No presente trabalho, foi avaliada a presença de linfócitos T CD4, B, B-1 e macrófagos no linfonodo proximal ao sítio de injeção tumoral, no peritônio, baço e microambiente tumoral durante a evolução do melanoma murino. Resultados obtidos nas análises por citometria de fluxo das populações no baço revelam influxo significativo da população de linfócitos T CD4 em 7 e 14 dias no grupo experimental (Figura 1). Já nas análises histopatológicas, não foi possível observar diferenças na reatividade deste órgão entre os grupos experimental, PBS e controle (figura não mostrada).

O aumento de linfócitos T CD4 no baço pode estar associado às tentativas do sistema imune de controlar o aumento de células tumorais via resposta Th1 (Ramanathan et al., 2014). A resposta Th1 tem sido descrita por ser favorável à eliminação de tumores por promover a ativação de células citotóxicas como NK, NKT e linfócitos T CD88 e ativação dos macrófagos pela via clássica (IFN- γ) (Revisado por: Allavena; Mantovani, 2012; Haabet et al., 2014). No entanto, após 14 dias do desafio, observou-se diminuição no percentual de células T CD4 no baço no grupo experimental quando comparado com os outros grupos. Para verificar se esta redução poderia estar associada à migração de linfócitos T CD4 para o foco de inflamação, foi avaliada a presença destas células no local de injeção das células tumorais/PBS. Mas não foram constatadas diferenças no percentual destas células entre o grupo experimental, PBS ou controle (Figura 2). Portanto, podemos sugerir que esta diminuição após 14 dias do desafio pode estar relacionada à tentativa do sistema imune de manter a homeostasia ou por mecanismos de escape das células tumorais, para assegurar sua integridade e capacidade alta de proliferação.

De forma semelhante a relatos da literatura, o aumento no percentual de linfócitos B-2 ou B convencionais foi observado no local de injeção das células tumorais após 14 dias do desafio (Figuras 1 e 2). Alguns autores postulam que no modelo de melanoma murino os linfócitos B-2 aumentam a infiltração de linfócitos T

citotóxicos e a produção de citocinas no microambiente tumoral, favorecendo a resposta antitumoral (Kobayashi et al., 2014). Em contraste, outros autores demonstram que as células B no microambiente tumoral, também no modelo de melanoma, podem secretar grandes quantidades de IL-10, que regula de forma negativa a resposta imunológica ao tumor por promover a polarização de macrófagos para um perfil imunossupressor (Inoue et al., 2006; DiLillo et al., 2010).

Outro achado importante e inédito do atual trabalho foi a presença significativa de linfócitos B-1 no microambiente tumoral após 2, 14 e 21 dias do desafio tumoral (Figuras 2, 3 e 4). Estes achados, junto com as análises do percentual destas células no peritônio, poderiam sugerir que células B-1 migram do peritônio ao microambiente tumoral (Figura 4). Esta hipótese é sustentada pelos dados da literatura que observaram a migração destas células do peritônio ao local de injúria por corpo estranho (Almeida et al., 2001).

As células B-1 diferem das células B-2 convencionais pela fenotipagem, distribuição tecidual, morfologia e função (Hayakawa et al., 1983). As células B-1 são encontradas predominantemente nas cavidades pleural e peritoneal de camundongos (Hayakawa et al., 1984; Hayakawa et al., 1986), têm suas funções efetoras diversificadas, participando, assim, tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, já que podem secretar imunoglobulinas (Herzenberg et al., 1986), apresentar抗ígenos (Vigna et al., 2002), participar de respostas imunes supressoras (De Lorenzo et al., 2007) e secretar citocinas pró e anti-inflamatórias como TNF- α e IL-10 (O'Garra et al., 1992). Entre outras funções, as células B-1 também participam do processo de cicatrização tecidual (Oliveira et al., 2010) e atuam em diferentes respostas imunológicas mediadas por células T (Martins, 2009).

Em 2004, Popi et al. demonstraram em modelo *in vitro* que células B-1, em cocultivo com macrófagos, regulam negativamente a atividade fagocítica destas células, indicando um papel imunossupressor dos linfócitos B-1, provavelmente pela alta secreção da citocina IL-10.

Além disso, Perez et al. (2008) e Staquicini et al. (2008) demonstraram em modelos *in vitro* que linfócitos B-1 podem modular o crescimento e a metastatização das células de melanoma murino B16F10 por interações físicas entre ambas as células. Entretanto, interação física *in vivo* entre linfócitos B-1 e células tumorais não foi ainda descrita na literatura. Por isto, o achado dos linfócitos B-1 no

microambiente tumoral pode sugerir fortemente que estas células interagem também *in vivo*, provavelmente para promover perfil mais agressivo das células tumorais.

Uma vez que o melanoma é considerado um câncer muito agressivo, nossos resultados em conjunto sugerem que interações físicas entre as células do melanoma e as células B-1 podem favorecer o desenvolvimento do tumor. Isto possivelmente mediado pela IL-10, pois as células B-1 produzem grandes quantidades desta citocina, que inibe a ativação dos macrófagos tipo M-1 e favorece o desenvolvimento de respostas supressoras orquestradas principalmente por macrófagos tipo M-2 (O'Garra et al., 1992; Popi et al., 2004; Perez et al., 2008).

Embora este trabalho seja de grande valor na compreensão dos mecanismos celulares envolvidos no estabelecimento do melanoma, novos ensaios devem ser realizados para avaliar a cinética de linfócitos T CD8, NK, NKT, células reconhecidas por orquestrar a resposta antitumoral.

CONCLUSÕES

Aumento de linfócitos T CD4 no baço e aumento de linfócitos B-2 no microambiente tumoral após 7 e 14 dias, respectivamente, sugere a participação destas células no desenvolvimento do melanoma e correlacionam essas constatações com dados já descritos por outros autores.

Os resultados aqui apresentados mostram de forma inédita a presença de linfócitos B-1 no microambiente tumoral. A redução no percentual dessas células no peritônio e o aumento no microambiente tumoral sugere que células B-1 migram da cavidade peritoneal ao sítio do tumor após 21 dias do desenvolvimento do melanoma. Considerando que células B-1 interagem *in vitro* com células B16F10, os achados no atual trabalho sugerem que essas células interagem também *in vivo* favorecendo possivelmente o crescimento e a metastatização das células de melanoma murino B16F10.

Novos estudos são necessários para caracterizar a expansão de células B-1 no microambiente tumoral.

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 S.R., Aroeira L.S., Frymuller E. et al. (2001) Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int. Immunol.* **13**, 1193-201.
- Brandner J.M. & Haass N.K. (2013) Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology.* **45**, 443-52.
- 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 D.G., Andreu P., Coussens L.M. (2010) Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 309-16.
- DiLillo D.J., Matsushita T., Tedder T.F. (2010) B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1183**, 38-57.
- Egeblad M., Nakasone E.S., Werb Z. (2010) Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell.* **18**, 884-901.
- Gajewski T.F., Schreiber H., Fu Y.X. (2013) Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* **14**, 1014-22.
- 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.
- Hayakawa K., Hardy R.R., Herzenberg L.A. (1986) Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. *Eur. J. Immunol.* **16**, 450-6.
- Hayakawa K., Hardy R.R., Honda M., Herzenberg L.A., Steinberg A.D., Herzenberg L.A. (1984) Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **81**, 2494-8.
- Hayakawa K., Hardy R.R., Parks D.R., Herzenberg L.A. (1983) The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice. *J. Exp. Med.* **157**, 202-18.

- Herzenberg L.A., Stall A.M., Lalor P.A. *et al.* (1986) The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev.* **93**, 81-102.
- Inoue S., Leitner W.W., Golding B., Scott D. (2006) Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res.* **66**, 7741-7.
- Joyce J.A. & Pollard J.W. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 239-52.
- Keibel A., Singh V., Sharma M.C. (2009) Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 1949-55.
- Kobayashi T., Hamaguchi Y., Hasegawa M., Fujimoto M., Takehara K., Matsushita T. (2014) B Cells Promote Tumor Immunity against B16F10 Melanoma. *Am. J. Pathol.* **184**, 3120-9.
- Lengagne R., Pommier A., Caron J. *et al.* (2011) T cells contribute to tumor progression by favoring pro-tumoral properties of intra-tumoral myeloid cells in a mouse model for spontaneous melanoma. *PLoS One.* **6**, e20235.
- 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.
- Martins M.C.F.N. Participação de células B-1 na rejeição de aloenxertos no camundongo. 2009. 97 f. Tese. Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.
- Mosser D.M. & Edwards J.P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958-69.
- Murdoch C., Muthana M., Coffelt S.B., Lewis C.E. (2008) The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* **8**, 618-31.
- Mussalem JS, Squaiella-Baptistão CC, Teixeira D. *et al.* (2012) Adjuvant effect of killed Propionibacterium acnes on mouse peritoneal B-1 lymphocytes and their early phagocyte differentiation. *PLoS One.* **7**, e33955.
- Nguyen D.X. & Massagué J. (2007) Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat. Ver. Genet.* **8**, 341-52.
- O'Garra A., Chang R., Go N., Hastings R., Haughton G., Howard M. (1992) Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur. J. Immunol.* **22**, 711-7.
- Oliveira H.C., Popi A.F., Bachi A.L., Nonogaki S., Lopes J.D., Mariano M. (2010) B-1 cells modulate the kinetics of wound-healing process in mice. *Immunobiology.* **215**, 215-22.

- Pérez E.C., Machado J. Jr., Aliperti F., Freymüller E., Mariano M., Lopes J.D. (2008) B-1 lymphocytes increase metastatic behavior of melanoma cells through the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cancer Sci.* **99**, 920-8.
- Popi A.F., Lopes J.D., Mariano M. (2004) Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. *Immunology.* **113**, 348-54.
- Quail D.F. & Joyce J.A. (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423-37.
- Ramanathan P, Dhandapani H, Jayakumar H, Ganeshrajah S, Thangarajan R. (2014) Dendritic cells primed with HPV positive cervical tumor lysate are superior to unprimed DCs in migratory capacity and induce a potent Th1 response. *Hum. Immunol.* **75**, 1216-24.
- Rogers T.L. & Holen I. (2011) Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J. Transl. Med.* **9**, 177.
- Spano D. & Zollo M. (2012) Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. *Clin. Exp. Metastasis.* **29**, 381-95.
- Staquinini 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.
- Vigna A.F., Godoy L.C., Rogerio A.S., Mariano M., Lopes J.D. (2002) Characterization of B-1b cells as antigen presenting cells in the immune response to gp43 from Paracoccidioides brasiliensis in vitro. *Immunol Lett.* **83**, 61-6.
- Weber A.L., Nunes D.H., Souza Filho J.J., Pinto C.J.C. (2007) A comparison of cutaneous melanoma cases diagnosed by different medical specialists. *An. Bras. Dermatol.* **82**, 311-5.
- Weinstein D., Leininger J., Hamby C., Safai B. (2014) Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Melanoma. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **7**, 13-24.
- 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.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora não tenham sido descritas nos procedimentos e resultados, as análises de citocinas inflamatórias nas amostras de fragmentos do tumor/local de injeção foram realizadas também em todas as amostras avaliadas. Entretanto, os resultados obtidos nessas análises não permitiram definir um perfil característico de citocinas entre os grupos, por este motivo, os dados não foram apresentados no trabalho.

ANEXOS

Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 171/13 CEP/ICS/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Identificação e caracterização das células do sistema imune presentes no microambiente tumoral em modelo de melanoma murino”, Espécie utilizada: “camundongo isogênico” Número de animais utilizados: “Sessenta” sob a responsabilidade de “JOSE RENILDO DE CARVALHO E EDILAINA 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.

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Hailey Barros F. Gonçalves".

Hailey Barros F. Gonçalves
Secretaria do Comitê de Ética
em Pesquisa da UNIP