

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

**INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS B-1 NO
CRESCIMENTO DO CARCINOMA DE
EHRLICH EM CAMUNDONGOS**

BEATRIZ DE BEM KERR MARTINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

**SÃO PAULO
2011**

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS B-1 NO CRESCIMENTO DO
CARCINOMA DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS**

BEATRIZ DE BEM KERR MARTINS

Dissertação Apresentada ao Programa
de Mestrado em Medicina Veterinária da
Universidade Paulista – UNIP para
obtenção do Título de Mestre. Área de
concentração: Imunopatologia
Veterinária, sob orientação do Prof. Dr.
Mario Mariano

**SÃO PAULO
2011**

Martins, Beatriz de Bem Kerr.

Influência das células B-1 no crescimento do carcinoma de Ehrlich em camundongos. / Beatriz de Bem Kerr Marins. — São Paulo, 2011.

49 f. il. Color. + CD-ROM

Dissertação (mestrado) — Apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista, São Paulo, 2011.

Área de Concentração: Imunopatologia veterinária
"Orientação: Prof. Dr. Mario Mariano"

1. Tumor de Ehrlich. 2. Células B-1. 3. Imunidade. I. Mariano, Mario. II. Azevedo, Maria Carolina Andrade de. III. Título.

BEATRIZ DE BEM KERR MARTINS

**INFLUÊNCIA DAS CÉLULAS B-1 NO CRESCIMENTO DO
CARCINOMA DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS**

Dissertação Apresentada ao Programa de
Mestrado em Medicina Veterinária da
Universidade Paulista – UNIP para
obtenção do Título de Mestre. Área de
concentração: Imunopatologia
Veterinária, sob orientação do Prof. Dr.
Mario Mariano

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

____ / ____
Prof. Dr. Mario Mariano
Universidade Paulista – UNIP

____ / ____
Prof. Dr. Milton Kolber
Universidade Paulista – UNIP

____ / ____
Prof. Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

*À minha mãe Maria Ignez, agradeço pelo apoio
e amor incondicional.*

*À minha Vó Flora, por tanto carinho e
sabedoria frente à vida.*

*À minha irmã Gisela, pela alegria e
companheirismo.*

*Ao meu querido pai, Manoel Kerr Martins, que
deixou eternas saudades.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador Prof. Dr. Mario Mariano, que tão gentilmente me aceitou e me mostrou exatamente o caminho a ser seguido.

À minha co-orientadora Ms. Maria Carolina Andrade de Azevedo, pelo precioso auxilio na execução deste trabalho, e também pela boa vontade e paciência, sempre presentes.

À Profa. Dra. Selene Dall'Acqua, pela atenção e apoio no início do meu projeto.

A todos os professores da Pós-graduação, pelos ensinamentos e lições durante esses anos.

Aos funcionários da Pós-graduação da UNIP, pela amizade e convivência nesse período.

A todos do Laboratório de Imunologia do Prof. Dr. Mario Mariano – UNIFESP-EPM, Ana Flavia, Maria Fernanda, Maiko, Felipe, Ronni e Heloisa, por todo apoio e ensinamentos a mim proporcionados.

Ao Severino da Silva Ferreira e a Suely Nonogaki do Laboratório de Patologia Investigativa do Hospital do Câncer A C Camargo, por toda ajuda a mim prestada.

Agradeço, especialmente, ao André Bachi do Departamento de Imunologia da UNIFESP, pela preciosa atenção durante todo experimento.

Aos funcionários da Disciplina de Imunologia e do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP.

A todos meus familiares, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

MARTINS, B.B.K. Influência das Células B-1 no crescimento do Carcinoma de Ehrlich em Camundongos (Influence of B-1 cells in the growth of Ehrlich carcinoma in mice). Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração Imunopatologia Veterinária) – Instituto de Ciências e Saúde, Universidade Paulista 2011.

O tumor de Ehrlich (TE) é uma neoplasia de origem epitelial mamária, transplantável em camundongos. O TE pode ter duas formas: a forma ascítica; quando a inoculação das células neoplásicas é feita na cavidade peritoneal, e forma sólida; quando a inoculação é feita no tecido subcutâneo. Células B-1 são encontradas predominantemente nas cavidades peritoneal e pleural. Tem sido demonstrado que as células de melanoma B16F10 são capazes de interagir com células B-1 por meio de uma molécula de adesão, MUC18, tornando o tumor mais invasivo e metastático. Neste estudo, foi avaliada a influência de células B-1a e B-1b no crescimento do tumor quando são inoculadas simultaneamente às células do TE no coxim plantar. Foram utilizados quatro grupos de animais e avaliado o crescimento do tumor nos animais do grupo controle (esses grupos receberam somente as células tumorais), animais que receberam as células tumorais e células B-1a e animais que receberam as células tumorais e células B-1b. Um segundo grupo controle foi utilizado, o qual recebeu as células tumorais e linfócitos B-2. Foi observado diferença significativa entre os grupos, sugerindo que células B-1 participam negativamente na evolução deste tipo de neoplasia. Este trabalho demonstra que o efeito que a célula B-1 causa no crescimento do melanoma não é um fenômeno generalizado.

Palavras-chave: Tumor de Ehrlich. Células B-1. Imunidade.

ABSTRACT

MARTINS, B.B.K. Influence of B-1 cells in the growth of Ehrlich carcinoma in mice

Ehrlich's tumor is a transplantable mouse neoplasm of mammary epithelial origin. The tumor may have two forms: the ascitic form when the inoculation of the neoplastic cells is made into the peritoneal cavity and solid, when the inoculation is made into the subcutaneous tissue. B-1 cells are lymphocytes found predominantly in the peritoneal and pleural cavities. It has been demonstrated that B16F10 melanoma cells are able to interact with B-1 cells through an adhesion molecule, MUC18, turning the tumor more invasive and metastatic. In this study, we evaluated the influence of B-1a and B-1b cells on the growth of the tumor when simultaneously inoculated in the footpad. Using four groups of mice, we evaluated the tumor growth in control animals (these groups received only tumor cells), animals that received tumor cells and B-1a cells and animals that received tumor cells and B-1b cells. A negative control group which received the tumor cells and B-2 was also used. A significant difference between groups was observed suggesting that B-1 cells negatively participate in the evolution of this type of neoplasia. These data demonstrate that the enhancing effect that B-1 cells causes in melanoma growth is not a generalized phenomenon.

Key-words: Ehrlich tumor. B-1 cells. Immunity.

Lista de abreviaturas

BCR-	(<i>B cell receptor</i>) Receptor de células B
BALB/c-	Linhagem de camundongo co-sanguínea albina
°C-	Graus Celsius
CD-	<i>Cluster de diferenciação</i>
CSC-	(<i>Cancer Stem Cells</i>) Célula progenitora cancerígena
DMIP-	Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
FACS-	(<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>) Citômetro de fluxo
FITC-	(<i>Fluorescein-labeled Antibodies</i>) Anticorpo conjugado a fluoresceína
FSC-	(<i>Forward Scatter</i>) Dispersão dianteira
SSC-	(<i>Side Scatter</i>) Dispersão lateral
g-	Gramas
Ig-	Imunoglobulina
LPS-	Lipopolissacarídeo
mL-	Mililitros
mm ³ -	Milímetros cúbicos
µM-	Micromolar
MUC18-	Molécula de adesão celular mucina 18
NK-	(<i>Natural Killer Cell</i>) Células extermínadora natural
Nu/nu-	Camundongos desnudos
PBS-	(<i>Phosphate buffered saline</i>) Tampão fosfato-salino
rpm-	Rotações por minuto
SFB-	Soro fetal bovino
TE-	Tumor de Ehrlich
µL-	Microlitros
µg-	Microgramas
Δ-	Variância

Lista de figuras

Figura 1 - Ilustração da Câmara de NeuBauer.....	31
Figura 2 - Citometria de fluxo para purificação de células B-2. Células provenientes de baço de camundongos BALB/c purificadas por FACSaria II, apresentando pureza de 99,3%. Marcação CD23 (FITC-A) e CD19 (PE-A).....	38
Figura 3 - Citometria de fluxo de cultura de células B-1a. Células provenientes de cultura de camundongos BALB/c	39
Figura 4 - Citometria de fluxo de cultura de células B-1b. Células provenientes de cultura de camundongos BALB/c	39
Figura 5 - Célula apresentando coloração castanha (marcação para F4/80) Aumento de 400x.....	40

Lista de gráficos

Gráfico 1- Curva de crescimento do tumor de Ehrlich. Análise do Δ da espessura da pata em mm, durante sete dias, dos animais inoculados com volume de 0,05 mL contendo 5×10^6 células do tumor de Ehrlich no coxim plantar do membro posterior esquerdo.....34

Gráfico 2- Curva de crescimento do tumor de Ehrlich. Análise do Δ da espessura da pata em mm, durante sete dias, dos animais inoculados com volume de 0,03mL contendo 5×10^6 células do tumor de Ehrlich no coxim plantar do membro posterior esquerdo juntamente com 1×10^5 células B2 no volume de 0,02mL.....35

Gráfico 3- Curva de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c. Análise do Δ da espessura da pata em mm, durante sete dias, dos animais inoculados com volume de 0,03mL contendo 5×10^6 células do tumor de Ehrlich no coxim plantar do membro posterior esquerdo (P<0.001)..... 36**

Gráfico 4- Curva de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c. Análise do Δ da espessura da pata em mm, durante sete dias, dos animais inoculados com volume de 0,03mL contendo 5×10^6 células do tumor de Ehrlich no coxim plantar do membro posterior esquerdo. (P<0.01, ***P<0.001).....37**

Gráfico 5- Gráfico representando a porcentagem de marcação obtida nas lâminas: foram utilizados 3 lâminas de cada grupo (Controle, Controle + TE, TE + B2, TE + B-1a e TE + B-1b) marcadas para F4/80 (*P<0,05).....41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Neoplasia.....	15
2.2 Tumor de Ehrlich	16
2.3 Imunidade Tumoral.....	17
2.4 Células B	20
2.5 Subpopulações de células B	21
2.6 Imunohistoquímica.....	23
2.7 Macrófago.....	24
3. OBJETIVO	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Animais	27
4.2 Cultura das células do Tumor de Ehrlich	27
4.3 Cultura das células B-1a.....	27
4.4 Cultura das células B-1b.....	28
4.5 Inoculação das células do tumor de Ehrlich	28
4.6 Inoculação das células B-1a e B-1b de cultura.....	28
4.7 Citometria de fluxo das culturas B-1a e B-1b	29
4.8 Obtenção de células B-2 e citometria de fluxo	29
4.9 Modelos Experimentais	30
4.9.1 Obtenção das formas sólida e ascítica do tumor	30
4.9.2 Contagem de células do fluido ascítico	30
4.10 Delineamento experimental	31
4.11 Imunohistoquímica das patas	32
4.12 Análise dos resultados.....	32
5. RESULTADOS.....	34

5.1 Curva de crescimento da forma sólida do tumor de Ehrlich em camundongos	34
5.2 Curva de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c inoculados com células B-2 purificadas com FACS.....	35
5.3 Curva de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c inoculados com cultura de B-1a.	36
5.4 Curva de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c inoculados a partir de cultura de B-1b.	37
5.5 Citometria de Fluxo da cultura de células B-2	38
5.6 Citometria de Fluxo da cultura de células B-1a e B-1b.....	39
6. IMUNOHISTOQUÍMICA	40
6.1 Imunohistoquímica de patas	40
6.1.1 Imunohistoquímica de patas marcadas para macrófago.....	40
7. DISCUSSÃO	42
8. CONCLUSÃO	45
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

O embasamento científico caracteriza-se por mudanças sucessivas, levando a contínuas pesquisas, fazendo a verdade de hoje não ser a mesma de amanhã. Aceita-se a ideia de que um organismo vivo e seus sistemas já não podem ser observados separadamente. O sistema imune, por exemplo, está intimamente ligado ao sistema nervoso e ao endócrino e isso justifica a nomenclatura utilizada de sistema neuroimuno-endócrino. Nesse contexto, destaca-se o processo inflamatório com os seus componentes humorais e celulares, constituindo um mecanismo de controle da homeostasia. A relação existente entre o processo inflamatório e a atuação do sistema imunológico é um fato estabelecido (AZEVEDO, 2007) (GUERRA, 1983).

O termo imune é originário do latim, “munis” que significa cargo, ofício, dever; que se refere àquele que cumpre seu dever. “In munis” significa livre de deveres ou encargos (HOUAISS *et al.*, 2001).

A palavra imunidade refere-se a um conjunto não apenas de privilégios, vantagens ou isenções de encargos, mas também, no intento de obter-se a homeostasia dos seres vivos, o produto final poderá ser não obrigatoriamente vantajoso ou positivo para o mesmo; sob o ponto de vista científico é um conjunto de mecanismos que garante a homeostasia dos seres vivos. Um exemplo característico desse prejuízo do sistema imune ao organismos vivo são as doenças autoimunes, como no caso do Lúpus Eritematoso Sistêmico ou a Artrite Reumatóide, em que as respostas imunes são direcionadas a alvos existentes no próprio indivíduo (AZEVEDO, 2007).

Há muito tempo, a célula tumoral tem sido interpretada como um agente autônomo capaz de pelo crescimento expansivo, invadir os tecidos e localizar-se e multiplicar a distância, mimetizando um verdadeiro parasita. Ao realizar o presente trabalho a indagação que desde logo se estabelece tem a ver com a importância do processo inflamatório na interação entre o tumor e o hospedeiro (GUERRA, 1983).

STAQUICINI *et al.* (2004) demonstraram que células B-1 promovem o crescimento e difusão do melanoma B16F10 no camundongo BALB/c. E também, esse efeito se dá pelo contato íntimo das células B-1 com as células do melanoma, mediado pela molécula de adesão MUC18 (molécula de adesão mucina 18). Seguindo uma linha semelhante de pesquisa no laboratório de Imunologia da

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), experimentos revelam o envolvimento das células B1 no crescimento do TE, porém este estudo, em controvérsia com os resultados anteriores, as células B1 promovem um menor crescimento do TE.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Neoplasia

A palavra de etiologia grega “Neoplasma”: *neos* significa novo e *plasma* significa formação, é literalmente, crescimento novo, anormal, progressivo e incontrolável de um tecido (CHEVILLE, 1994).

Os primeiros estudos realizados referentes à natureza das neoplasias revelaram que estas crescem independentemente. A transplantabilidade do tumor venéreo canino (sarcoma de Sticker) foi estabelecida em 1876 e no início do século XX, suspensões teciduais de tumores mamários de camundongos foram transplantadas por várias gerações (CHEVILLE, 1994).

Até o início do século XIX, sabia-se que o câncer ocorria em seres humanos, e questionava-se, se esse processo era de natureza celular ou infecciosa. Um importante marco na evolução do conhecimento desses processos ocorreu, através da demonstração da composição celular das neoplasias, e desde então, passou-se a estudá-los também sob o ponto de vista histológico (DAGLI, 1989).

As evidências da existência de neoplasias em animais surgiram quando um veterinário francês publicou seus estudos sobre tumores em animais, demonstrando serem estes constituídos por células semelhantes a dos humanos. Tumores humanos e de animais mostram grandes semelhanças e, de maneira geral, comportam-se como crescimento de células que adquiriram o atributo de se multiplicarem indefinidamente, originárias do próprio organismo. Essa constatação possibilitou o surgimento da “Oncologia Comparada”, um ramo da Oncologia que procura melhorar o conhecimento das neoplasias que ocorrem em outros seres vivos (DAGLI, 1989).

Um grande avanço da cancerologia, entretanto, ocorreu após o surgimento da Oncologia Experimental, um ramo da Oncologia Comparada, cuja existência se deu pela introdução dos tumores transplantáveis ou transmissíveis. Esses são tumores de animais, mantidos em laboratório pelo transplante de células tumorais a hospedeiros susceptíveis. (DAGLI, 1989).

Esse fato, aliado ao progresso do conhecimento da imunologia, da inflamação e de outras áreas envolvidas nos mecanismos de homeostase de hospedeiros

portadores de tumor, resultou em um arsenal de investigações sobre a relação tumor *versus* hospedeiro (DAGLI, 1989).

Atualmente, aceita-se a ideia de que nos tumores sólidos há uma mistura heterogênea de tipos celulares. A capacidade de reprodução e a natureza heterogênea dos tumores sugerem que uma população celular presente na neoplasia age como *stem cells* (células-tronco), e é responsável pelo crescimento tumoral e metástase. Essas células são denominadas *cancer stem cells* (CSC) e podem originar-se de *stem cells* ou progenitoras, levando a possibilidade de formarem múltiplas populações de CSC durante progressão neoplásica. A população de *stem cell* é uma candidata lógica para carcinogênese, em razão das habilidades inerentes de autorrenovação e diferenciação possuídas por essas células e possuem fatores intrínsecos e ambientais que podem controlar as *stem cells* normais, contribuindo para a formação de CSCs (GUO *et al.*, 2006).

2.2 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich foi, primeiramente, descrito em 1906 (GUERRA, 1983 *apud*, EHRLICH, 1906). Trata-se de uma neoplasia originária de carcinoma mamário de camundongos fêmeos, transplantada em animais dessa espécie na forma sólida. O tumor de Ehrlich foi convertido para a forma ascítica pela passagem seriada de fluido ascítico de animais inoculados intraperitonealmente com células tumorais. A conversão para forma ascítica trouxe grandes vantagens, como a possibilidade de padronização do número de células inoculadas, a quantificação da regressão e do crescimento tumoral, bem como o estudo da célula tumoral propriamente dita (DAGLI, 1989).

O tumor de Ehrlich, por ser um dos primeiros tumores transplantáveis conhecido, é o mais extensamente utilizado para experimentação (GUERRA, 1983).

A vantagem da utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação às demais recai sobre o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e sobre o desenvolvimento rápido da neoplasia, que restringe o tempo de estudo (SILVA *et al.*, 2006).

O tumor de Ehrlich se desenvolve com duas variáveis de comportamento, de conformidade com o local do implante. Quando a inoculação de suas células é feita

na cavidade peritoneal, cresce em suspensão, traduzindo-se na forma ascítica do tumor. Quando a inoculação de células é feita no tecido celular subcutâneo de qualquer localização do tegumento do animal, cresce sob a forma sólida. Por essa razão é que se justifica a denominação, habitualmente usada, de forma sólida ou ascítica do tumor (GUERRA, 1983).

Ao exame macroscópico a forma ascítica, depois de aproximadamente sete dias de implante na cavidade peritoneal, caracteriza-se pela presença de grande quantidade de fluido discretamente viscoso e de aspecto leitoso. A forma sólida nesse mesmo período de evolução, apresenta-se como uma massa palpável, de consistência firme, coloração esbranquiçada, aspecto homogêneo e brilhante, pouco aderente aos planos profundo e relativamente móvel. A histologia típica do tumor se caracteriza por apresentar parênquima indiferenciado e estroma delicado. As células tumorais são arredondadas, com limites celulares distintos, citoplasma escasso, núcleo central redondo ou ovóide, denso, com nucléolos proeminentes e pleomorfismo celular. Mitoses são quase sempre presentes e observa-se figuras aberrantes. Suas células, na maioria das vezes, distribuem-se caoticamente. Seu estroma é formado de fibras colágenas e delicados capilares (GUERRA, 1983).

2.3 Imunidade Tumoral

Apesar das variações observadas em diferentes tipos de tumores, e das teorias propostas para explicar os principais eventos determinantes de malignidade, o microambiente tumoral tem sido alvo de intensa investigação por mais de 100 anos. Dentre as células do hospedeiro capazes de interferir na proliferação de células malignas encontram-se as células do sistema imune (STAQUICINI *et al.*, 2004).

A possibilidade de que neoplasias possam ser erradicados por respostas imunes específicas foi o ímpeto de grande quantidade de trabalhos no campo da imunologia tumoral. No conceito de vigilância imunológica, na década de 1950, a função fisiológica do sistema imune é reconhecer e destruir os clones de células transformadas antes de se transformarem em tumores. O sistema imune de fato reage contra tumores, e o aproveitamento dessas reações para destruir tumores de

forma específica continua sendo um importante objetivo para imunologistas (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

O principal mecanismo de imunidade tumoral é a destruição das células tumorais pelos linfócitos TCD8⁺ os quais desempenham uma função de vigilância ao reconhecer e destruir células potencialmente malignas que expressam peptídos derivados de proteínas celulares mutantes ou proteínas virais oncogênicas, apresentados pelas moléculas de MHC de classe I. Essa resposta primária de células TCD8⁺ ocorre quando células tumorais ou seus抗ígenos são ingeridos pelas células apresentadoras de抗ígenos (APC) do hospedeiro; os抗ígenos tumorais são processados dentro dessa célula e os peptídos derivados desses抗ígenos são apresentados por meio das moléculas do MHC I para serem reconhecidas por células TCD8⁺ (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

Os linfócitos TCD4⁺ podem fornecer citocinas para o desenvolvimento de linfócitos citotóxicos efetores, os linfócitos TCD4+ secretarem citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) e interferon - gama (IFN- γ), que podem aumentar a expressão de MHC de classe I pelas células tumorais, assim como à lise por linfócitos T citotóxicos. As células NK destroem principalmente as células tumorais que tem expressão de MHC I diminuída e que conseguiram se evadir da destruição por linfócitos. A sua capacidade tumoricida também é aumentada por citocinas. O papel dos macrófagos e sua ativação pelas células tumorais é fato ainda não totalmente elucidado, porém sabe-se que possíveis mecanismos incluem: o reconhecimento direto de alguns抗ígenos de superfície de células tumorais, e a ativação por interferon-gama produzidos pelas células T específicas para o tumor (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

Existem diversas formas pelo qual a célula tumoral pode evadir-se da resposta imune do hospedeiro. A primeira delas, é que tumores podem perder a expressão de抗ígenos, levando a uma diminuição no reconhecimento de linfócitos T citotóxicos o que resulta em um maior crescimento tumoral e potencial metastático. A segunda forma é quando os tumores não expressarem co-estimuladores ou moléculas de MHC II, o que faz com que não haja o reconhecimento do tumor pela célula T. A terceira é quando as células tumorais produzem proteínas imunossupressoras inibindo a proliferação e a ação efetora dos linfócitos e macrófagos. E por último, alguns抗ígenos tumorais podem induzir uma tolerância imunológica específica. Isso acontece quando os抗ígenos são próprios ou quando

as células tumorais apresentam seus抗ígenos de forma tolerogênica para linfócitos (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

Sob esse aspecto MAHONEY & LEIGHTON (1962) revolucionaram a área de estudo da oncologia experimental, demonstrando que o tecido neoplásico se inflamava muito menos que tecidos normais. Conseguiram, muito engenhosamente, evidenciar pela passagem de um fio de algodão pela massa tumoral, *in vivo*, que o tecido neoplásico, ao ser comparado com o processo inflamatório, provocado no subcutâneo do mesmo animal, utilizando-se a mesma metodologia, era significantemente menos intenso. Foi a partir do trabalho desses autores, que se iniciou uma nova linha de pesquisa na oncologia experimental: a das relações entre tumor, resposta inflamatória e mecanismos imunológicos de controle do crescimento neoplásico (GUERRA, 1983).

Quando o transplante de órgãos se tornou um procedimento comum e disseminado, como resultado do desenvolvimento de agentes imunossupressores potentes, os pacientes com sobrevivência de transplante prolongada eram muitas vezes mais predispostos a desenvolver neoplasias quando comparado com indivíduos não transplantados. Também se observou que os pacientes com síndromes de imunodeficiência congênita ou adquirida demonstram aumento da incidência de tumores malignos. Dessa maneira, também foi sugerido que o sistema imune seja responsável pela prevenção de neoplasias. Foi dessa sugestão que se desenvolveu o conceito de função fiscalizadora do sistema imunomediado por células (TIZARD, 2002).

A resistência natural dos camundongos desnudos e de todos os animais normais aos tumores depende provavelmente das células NK (natural killer ou extermadoras naturais). Camundongos deficientes de células NK (camundongos bege) têm aumento da susceptibilidade aos tumores espontâneos (TIZARD, 2002).

Estudos histopatológicos mostram que os tumores são circundados por infiltrados de células mononucleares compostos de linfócitos T, células NK e macrófagos, e linfócitos e macrófagos ativados encontram-se presentes nos linfonodos, drenando os sítios de crescimento tumoral. A presença de infiltrados linfocíticos em alguns tipos de melanomas e cânceres de mama indica melhor prognóstico (ABBAS & LICHTMAN, 2007; TIZARD, 2002).

São diversos os mecanismos pelos quais a imunidade antitumoral não é eficiente no sentido de erradicar as células transformadas. Primeiro, as células

tumorais derivam de células do hospedeiro e, portanto, se parecem com estas células em muitos aspectos. Em outras palavras, a maioria dos tumores expressa apenas alguns抗ígenos que podem ser reconhecidos como não-próprios, e assim a maior parte dos tumores tende a ser pouco imunogênica. Tumores que provocam respostas imunes fortes incluem aqueles induzidos por vírus oncogênicos, nos quais as proteínas virais são抗ígenos estranhos. Muitos tumores espontâneos provocam resposta fraca ou mesmo não detectável, e estudos desses tumores levaram a um considerável ceticismo quanto ao conceito de vigilância imunológica. De fato, como afirmamos anteriormente, a importância da vigilância imunológica e da imunidade tumoral é variável. Segundo, o rápido crescimento e disseminação do tumor podem superar a capacidade do sistema imune de erradicar as células tumorais. Terceiro muitos tumores têm mecanismos especializados para escapar das respostas imunes do hospedeiro (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

Existem dois meios de seleção por meio dos quais as células tumorais podem escapar da resposta imune do hospedeiro e potencializar sua própria sobrevivência. Um consiste em inibir a resposta imune até que tenha atingido um tamanho que não possa ser controlado pelo hospedeiro. Consequentemente, nos tumores experimentais, um pequeno número de células tumorais pode crescer após a inoculação subcutânea, enquanto um grande número delas não pode fazê-lo. Pode ocorrer que as células tumorais não alcancem os linfonodos e disparem uma resposta imune até que a carga tumoral seja demasiadamente grande para ser controlada. Até um tumor muito pequeno pode conter um elevado número de células. Por exemplo, um tumor de 10 mm^3 contém cerca de 10^9 células. No outro, as células tumorais antigenicamente diferentes do hospedeiro induzirão uma forte resposta imune e serão eliminadas sem induzir uma doença. Essas células devem ser selecionadas quanto à sua falta de antigenicidade e sua incapacidade de estimular o sistema imune do hospedeiro (TIZARD, 2002).

2.4 Células B

As células B são encontradas no córtex dos linfonodos, na zona marginal do baço, na medula óssea e nas placas de Peyer. Só um pequeno número delas circula no sangue. Semelhante às células T, cada célula B possui um grande número de

receptores antigênicos idênticos. Cada célula B pode somente se ligar e responder a um antígeno simples (TIZARD, 2002).

Quando um antígeno entra no organismo, poderá estimular uma célula B por meio de receptores específicos. As células B possuem um receptor na sua superfície chamado BCR (receptor de célula B) capaz de reconhecer um único epitopo. Em animais recém-nascidos, existe um número razoavelmente pequeno de diferentes tipos destas células, aumentando à medida que o animal amadurece. Em um animal adulto, o número de células B varia como resultado da exposição a抗ígenos diferentes por toda vida do animal. À medida que o animal amadurece, no entanto, as células B mais utilizadas são expandidas (TIZARD, 2002).

Células B tem origem em precursores presentes na medula óssea de animais adultos a partir da ativação de rede de fatores de transcrição específicos para linfócitos. A principal característica imunofisiológica dessas células é a produção de anticorpos dirigidos a抗ígenos específicos (POPI *et al.*, 2005).

2.5 Subpopulações de células B

Em roedores, as células B são divididas em duas subpopulações: células B-1 e células B-2: as células B-2 (linfócitos B-2) são células que produzem anticorpos, são assim denominadas, por que foi descoberto que nos pássaros o seu desenvolvimento ocorre na Bursa de Fabricius. Nos mamíferos não existe um órgão equivalente anatômico da Bursa, e os estágios iniciais do desenvolvimento das células B ocorre na medula óssea. Assim as células B se referem aos linfócitos derivados da Bursa ou da Medula Óssea (ABBAS & LICHTMAN, 2007); as células B-1 são ainda subdivididas em B-1a CD5+ e as células B-1b CD5-. O CD5 é um receptor cujo ligante é o CD72. Células B-1 também diferem das células B-2 convencionais por serem encontradas nas cavidades peritoneal e pleural e apresentam potencial de autorrenovação. É possível que as células B-1a sejam uma linhagem distinta das células B originária provavelmente de precursores do fígado fetal ou omento e pouco provável da medula óssea (TIZARD, 2002).

Células B-1 foram classificadas como subtipo de linfócitos B por sua capacidade de rearranjar o gene de imunoglobina e sintetizar IgM e IgD. Além disso, células B-1 dividem algumas características fenotípicas e há hipóteses sobre a

relação da origem dessas células com progenitor de linfócitos B convencionais (POPI *et al.*, 2005).

Duas hipóteses são consideradas para explicar a ontogenia das células B-1. HAUGHTON *et al.* (1993) consideram que a célula pró B, em fase anterior ao rearranjo gênico para porção variável de imunoglobulinas, possa originar os dois subtipos de células B. A ativação de células B por antígenos T independentes como $\alpha(1-3)$ dextran, LPS e fosforilcolina poderiam induzir à diferenciação dessas células para o subtipo B-1. Por outro lado, HERZENBERG & KANTOR (1993) defendem a ideia que as diferentes linhagens de célula B, B-1 e B-2 são descendentes de precursores distintos, ativos em diferentes fases de desenvolvimento do sistema imune (POPI *et al.*, 2005).

Células B-1 são proeminentes na cavidade peritoneal, mas raras no baço e linfonodos de camundongos adultos. Durante a vida adulta, os progenitores da célula B-1a na medula óssea são raros ou não funcionais, não sendo capazes de reconstituir essa população em animais irradiados. Em contraste, existem precursores inativos de células B-1b na medula óssea adulta de camundongos normais. Esses precursores são capazes de promover a reconstituição em animais irradiados ou sob condições em que regulação por *feedback* está suspensa como, por exemplo, em animais com população de B-1b depletada pelo tratamento com anticorpo anti-IgM (POPI *et al.*, 2005).

As células B-1 apresentam características peculiares em sua morfologia ultraestrutural que permitem distingui-las das demais. O núcleo das células B-1 apresenta irregularidades na distribuição de heterocromatina. Usualmente, são observadas lâminas de cromatina unindo os lóbulos do núcleo, que é entremeado por citoplasma (ABRAHÃO *et al.*, 2003).

Apesar das considerações feitas sobre a célula B-1 como outro tipo de linfócito e ainda, as especulações quanto à sua origem relacionada à célula B convencional, as células B-1 possuem características semelhantes a macrófagos. Além de marcadores de superfície para linfócito B (IgM, IgD, B220), células B-1 também expressam marcadores para macrófago (Mac-1) e linfócito T(CD5), no caso das células B-1a (POPI *et al.*, 2005). ALMEIDA *et al.* (2001) demonstraram que as células B-1 se transformam em fagócitos mononucleares indistinguíveis morfológicamente de macrófagos derivados de monócitos.

STAQUICINI *et al.* (2004) demonstraram que células B-1 exercem influência positiva no crescimento primário e na produção de metástases de melanoma B16F10. O contato *in vitro* de células B-1 com células de baixa malignidade induzem transformação maligna nessas últimas.

Evidências da participação de linfócitos B-1 no crescimento e progressão do melanoma B16F10 experimental foram obtidas quando animais submetidos à irradiação seletiva (cavidades peritoneal e pleural) e, isto é depletados de linfócitos B-1, foi capaz de retardar o crescimento de tumores primários e diminuir a incidência de metástases pulmonares após injeção intravenosa de células de melanoma. A reposição da população de linfócitos B-1 em animais irradiados promoveu aumento no número de metástases experimentais de células de melanoma (STAQUICINI *et al.*, 2004).

Almeida *et al.*, (2001) demonstraram que as células B-1 estão presentes no sobrenadante de culturas de células peritoneais aderentes de camundongo. Essas células são radioresistentes e a irradiação dos animais (900 cGy) depleta as células B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. O recultivo dessas células induz a expressão de características fenotípicas e fisiológicas de fagócitos mononucleares (ALMEIDA *et al.*, 2001, POPI *et al.*, 2004).

2.6 Imunohistoquímica

O surgimento das pesquisas na área de imunopatologia utilizando-se o método de imunohistoquímica iniciaram na década de 1940, porém esse método eficaz de diagnóstico apenas foi aceito na rotina de patologia em 1974, quando foi possível demonstrar alguns抗ígenos presentes no tecido pela técnica de imunoperoxidase em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (BODEY,B., 2002, LEONG, A. S-Y.; WRIGHT, J., 1987).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais, que propiciaram uma enorme fonte de reagentes específicos para a demonstração de vários抗ígenos tissulares ou celulares, e o advento da recuperação antigênica foram fatos marcantes na evolução da imunohistoquímica, caracterizando um avanço relevante na aplicação da imunohistoquímica na patologia (LEONG, A. S-Y.; WRIGHT, J., 1987; BODEY,B., 2002).

Em 2005, Maruyama, K. *et al* utilizaram a marcação de macrófagos CD11-b positivos para a caracterização da inflamação induzida em linfangiogênese na córnea. LLOYD, C.M. *et al*, em 2008, realizaram a marcação de macrófagos CD11-b positivos na inflamação induzida pela esteatose hepática em camundongos e constataram que macrófagos positivos para F4/80 foram encontrados nas células do parênquima hepático e F4/80 marca a maioria dos macrófagos residentes no tecido do fígado e do baço de camundongos, embora populações F4/80 negativo, são positivas para CD68, CD11b ou CD11c.

2.7 Macrófago

O macrófago constitui uma importante célula na inflamação. Derivam dos monócitos do sangue periférico que foram induzidos por quimiocinas a migrar para o endotélio. O monócito uma vez no tecido extravascular transforma-se numa célula fagocítica maior (macrófago) (ROBBINS, S.L. *et al*, 2001).

Os macrófagos são figuras centrais na inflamação crônica por apresentarem a capacidade de fagocitose, quando ativados por citocinas (ex. interferon gama), e por secretarem um maior número de produtos biologicamente ativos (proteases, fatores de coagulação, óxido nítrico, citocinas fibrogênicas, colesterol, fatores de angiogênese, fatores de crescimento) induzindo uma lesão tecidual característica de inflamação crônica (ROBBINS, S.L. *et al*, 2001).

TORROELLA-KOURI *et. al*, em 2009, em um estudo com camundongos portadores de tumores mamários relataram que esse tumor possui uma menor expressão de marcadores para macrófagos como F4/80, CD68, CD115 e CD11b, enquanto o GR-1 está mais expresso, demonstrando um perfil anti-inflamatório.

Segundo CASO *et. al*, em 2010, macrófagos peritonias de camundongos inoculados com tumor de mama D1-DMBA3 apresentam sua função inflamatória prejudicada e são menos diferenciados do que em camundongos sem tumor. Foram avaliados monócitos do sangue periférico de camundongos que possuíam esse tumor, e constatou-se que essas mesmas células já possuíam o seu perfil de ativação alterado antes de se tornarem macrófagos. Esses monócitos apresentam uma diminuição de moléculas de superfície como CD115, F4/80, CD68, CD11b, MHC II e CD62L. E o marcador Tie-2 e as moléculas Gr-1 e Ly6C estavam

presentes. Resultados dessa pesquisa demonstraram que os monócitos circulantes desses animais expressam atividade anti-inflamatória e pró inflamatória.

3. OBJETIVO

Estudar a influência das células B-1a e B-1b no crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para realização do presente estudo foram utilizados 90 camundongos fêmeos da linhagem BALB/c, pesando de 20g a 25g fornecidos pelo CEDEME – Universidade Federal de São Paulo (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais).

Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP) da UNIFESP, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*.

4.2 Cultura das células do Tumor de Ehrlich

O tumor foi cedido pelo Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e sua manutenção foi realizada no Laboratório do DMIP da UNIFESP, por meio de transplantes intraperitoneais das células neoplásicas.

As células do tumor de Ehrlich (10^5 células) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma[®]), contendo 2mM de bicarbonato de sódio (Sigma[®]), 40 μ g/mL de sulfato de gentamicina (Schering[®]), 5,96g hepes (Bio basics[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab[®]), em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Foram utilizadas 10^5 células em 1 mL.

4.3 Cultura das células B-1a

A cultura de células B-1a foi obtida a partir de lavagens sucessivas da cavidade abdominal de cinco camundongos, utilizando-se aproximadamente 10mL de RPMI-1640. A suspensão celular foi incubada em garrafas de cultura com RPMI acrescido de 10% de SFB, em estufa contendo 5% de CO₂ a 37 °C por 40 minutos

para ocorrer a aderência celular. Posteriormente, após quarenta minutos, o sobrenadante foi centrifugado a 1500rpm na temperatura de 5-10°C. O *pellet* foi ressuspensos e colocados em cultura novamente em 12mL de RPMI acrescido de 10% de SFB e a garrafa foi mantida em estufa por 3 dias.

4.4 Cultura das células B-1b

A cultura de células B-1b foi obtida a partir de lavagens sucessivas da cavidade abdominal de cinco camundongos, utilizando-se aproximadamente 10mL de RPMI-1640. A suspensão celular foi incubada em garrafas de cultura de 10mL, em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C por 40 minutos para ocorrer a aderência celular, como descrito anteriormente, logo após, o sobrenadante foi centrifugado e o *pellet* foi ressuspensos com RPMI acrescido de 10% de SFB e a garrafa foi mantida em estufa por 5 dias.

4.5 Inoculação das células do tumor de Ehrlich

Para realizar a inoculação foram retirados 3mL de líquido ascítico da cavidade peritoneal de um camundongo com sete dias de crescimento tumoral. Esse líquido foi acrescido de PBS e centrifugado a 1000rpm por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido três vezes, e na terceira vez foram acrescentados 3mL de Tampão Hemolítico (tampão fosfato de potássio monobásico 10 mM com NaCl 0,9%). A solução foi centrifugada mais uma vez. O sobrenadante foi desprezado, restando em média 1mL de *pellet* contendo células tumorais. Foi feita uma diluição de 200X em PBS para contagem de células.

4.6 Inoculação das células B-1a e B-1b de cultura

Para realizar a inoculação foram recolhidas as células provenientes das culturas já descritas acima e foram inoculadas 1X10⁵ células de B-1a ou B-1b no

volume de 0,02mL juntamente com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich no volume de 0,03mL.

4.7 Citometria de fluxo das culturas B-1a e B-1b

As culturas foram submetidas à citometria de fluxo após cinco dias de estufa e a análise de dados foi feita em FACScalibur/Becton-Dickinson e programa CELLQUEST.

A citometria de fluxo consiste em uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas ou células microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente. Por meio de um aparelho de detecção óptico eletrônico são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula. Um feixe de luz (laser) de um único comprimento de onda (cor) é direcionado a um meio líquido em fluxo. Um número de detectores são apontados ao local onde o fluxo passa por meio do feixe de luz; na linha do feixe de luz (*Forward Scatter* ou FSC) e vários perpendiculares a este (*Side Scatter* ou SSC) além de um ou mais detectores fluorescentes. Cada partícula suspensa passando por meio do feixe dispersa a luz de uma forma, e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou juntos à partícula podem ser excitados emitindo luz de menor frequência do que a fonte de luz. O FSC correlaciona-se com o volume celular e o SSC depende da complexidade interna da partícula (granulosidade) (SANTOS, 2010).

4.8 Obtenção de células B-2 e citometria de fluxo

Para obtenção de células B-2, foram utilizados dois animais BALB/c. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus respectivos baços retirados e colocados em placas de Petri contendo PBS. Os baços foram macerados e filtrados. Essas células foram purificadas em FacsAria II programa Diva v. 6.1.3.

4.9 Modelos Experimentais

4.9.1 Obtenção das formas sólida e ascítica do tumor

Camundongos portadores do tumor na sua forma ascítica com oito dias de evolução foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. Após assepsia da parede abdominal com álcool, esta foi excisionada com tesoura cirúrgica de ponta fina para introdução de seringa de plástico de 3mL com agulha de 25x7, a fim de retirar-se o fluido ascítico. Esse fluido, contendo células tumorais, foi colocado em tubos de 15mL e mantido em gelo. As células foram processadas como já descrito anteriormente.

Para se obter o tumor na sua forma sólida, as células tumorais, nas concentrações desejadas, foram inoculadas no tecido celular subcutâneo do coxim plantar de um dos membros posteriores, em um volume de 0,05mL.

Para manutenção da forma ascítica do tumor, aproximadamente 10^6 células tumorais, em volume de 0,2mL foram inoculadas intraperitonealmente em camundongos receptores, repetindo-se essa operação semanalmente.

4.9.2 Contagem de células do fluido ascítico

O fluido ascítico foi diluído a 1:200 em Azul de Tripan, para avaliação da viabilidade celular. As células foram contadas na câmara de Neubauer e o número de células/mL, obtido de acordo com a fórmula descrita abaixo.

N° de células da suspensão = n° células contadas X fator final

Sendo que: Fator final = $\frac{\text{fator de profundidade} \times \text{fator de diluição}}{\text{Área contada}}$

Onde:

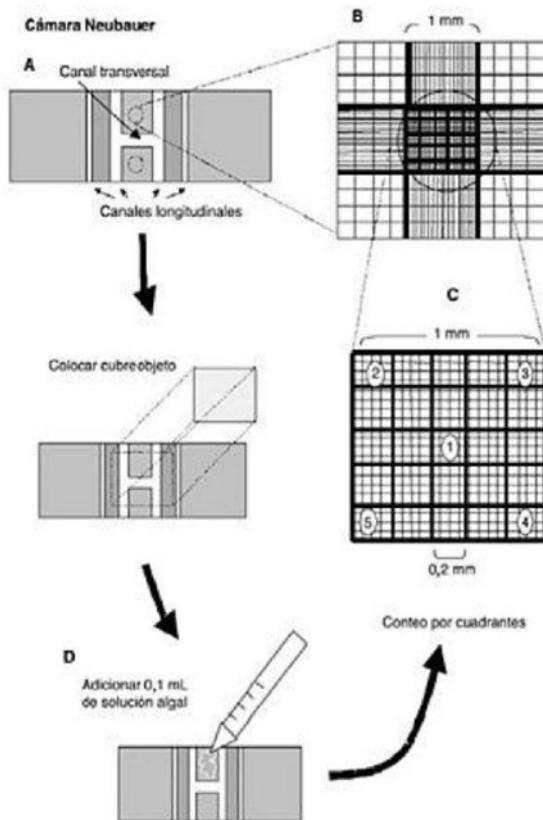
Fator de profundidade = 1/10mm

Fator de diluição = 1: 200

Área contada = 4mm²

mm³ para ml = $\times 10^3$

Fator final = 5×10^5



Fonte: FAILACE R., Hemograma, Manual de Interpretação; Artmed; 4a.ed.

Figura 1 - Ilustração da Câmara de NeuBauer

Foi padronizado um total de 5×10^6 células por mL de suspensão, com no mínimo 90% de viabilidade.

4.10 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos, cada grupo contendo seis animais, conforme descrito abaixo:

Grupo	Quantidade de Células de TE inoculadas	Quantidade de Células B-1a inoculadas	Quantidade de Células B-1b inoculadas	Quantidade de Células B-2 inoculadas
BALB/c controle	5×10^6 células em 0,03mL			
BALB/c - B1a	5×10^6 células em 0,03mL	1×10^5 células em 0,02mL		
BALB/c - B1b	5×10^6 células em 0,03mL		1×10^5 células em 0,02mL	
BALB/c - B2	5×10^6 células em 0,03mL			1×10^5 células em 0,02mL

A espessura do coxim plantar de cada animal foi avaliada a cada 24 horas durante 7 dias, utilizando paquímetro Eletronic Digital Vernier Caliper UTUSTOOLS®. Nos quatro grupos, todos os procedimentos de tratamento e aferição das medidas foram feitos em triplicata, de forma estéril e apirogênica em cabinas de fluxo laminar.

4.11 Imunohistoquímica das patas

Os animais foram sacrificados no oitavo dia por deslocamento de cervical e suas patas foram retiradas e mantidas em formol tamponado a 12%. O corte histológico foi processado e realizado marcação para macrófago com anticorpo F4/80.

4.12 Análise dos resultados

Para as curvas de crescimento do tumor inoculado no coxim plantar, os valores absolutos das medidas de lesão podal de cada indivíduo foram subtraídos da espessura basal respectiva. A essa variação deu-se o nome de delta (Δ). Foi

efetuada, então, a média dos Δ , de maneira que cada ponto no gráfico representasse esta média e as barras, seu erro padrão correspondente.

Para a análise das medidas das patas aplicou-se a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste de Bonferroni.

Para a análise de imunohistoquímica foi utilizado o programa MetaVue de marcação de campo corado e captura das imagens. Após, foi realizado análise de variância *T-Tests*.

5. RESULTADOS

5.1 Curva de crescimento da forma sólida do tumor de Ehrlich em camundongos

Em um grupo com 6 animais foi inoculado com 5×10^6 células do tumor de Ehrlich no volume de 0,05mL. (Gráfico1).

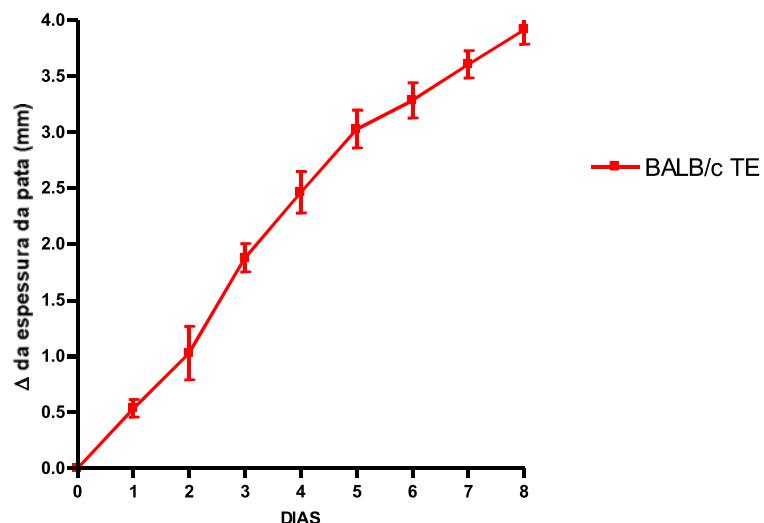


Gráfico 1- Curva de crescimento do tumor de Ehrlich. Análise do Δ da espessura da pata em mm, medida diariamente ao longo de sete dias, dos animais inoculados com volume de 0,05 mL contendo 5×10^6 células do tumor de Ehrlich no coxim plantar do membro posterior esquerdo.

O crescimento do tumor de Ehrlich repete resultados obtidos anteriormente. A lesão torna-se macroscopicamente visível a partir do 3º dia após a inoculação e desenvolve-se progressivamente nos dias subsequentes.

5.2 Curva de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c inoculados com células B-2 purificadas com FACS

Grupo controle B-2: animais inoculados com 5×10^6 células tumorais em um volume de 0,03mL e 1×10^5 células B-2, no volume de 0,02mL, totalizando um volume de 0,05mL inoculados no subcutâneo do coxim plantar do membro posterior esquerdo (**Gráfico 2**).

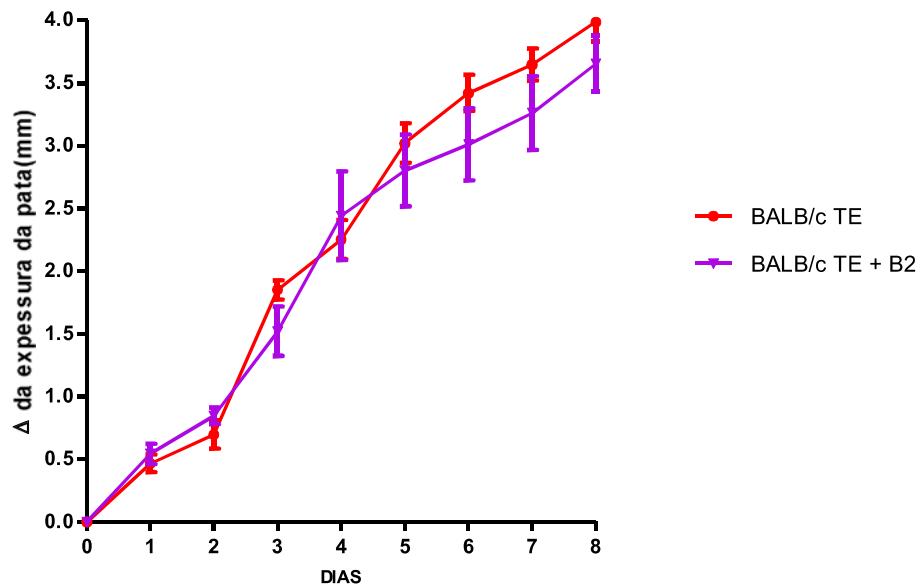


Gráfico 2 - Curva de crescimento do tumor de Ehrlich. Análise do Δ da espessura da pata em mm, medida diariamente ao longo de sete dias, dos animais inoculados com volume de 0,03mL contendo 5×10^6 células do tumor de Ehrlich no coxim plantar do membro posterior esquerdo juntamente com 1×10^5 células B2 no volume de 0,02mL.

Conforme o **gráfico 2**, o crescimento do TE inoculado juntamente com a célula B-2 não apresentou diferença estatística quando comparado à inoculação do TE somente.

5.3 Curva de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c inoculados com cultura de B-1a.

Grupo de animais inoculados com 5×10^6 células tumorais em um volume de 0,03mL e 1×10^5 células B-1a, no volume de 0,02mL totalizando um volume de 0,05mL inoculados no subcutâneo do coxim plantar do membro posterior esquerdo e grupo controle B-2 de animais que receberam 1×10^5 células B-2 juntamente com a mesma concentração células do TE no mesmo volume (Gráfico 3).

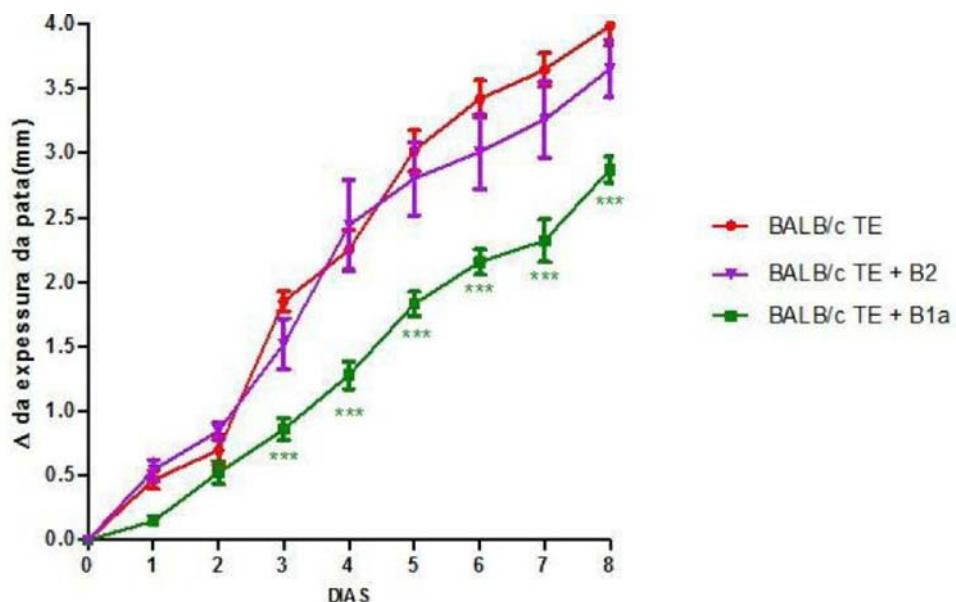


Gráfico 3- Curva de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c. Análise do Δ da espessura da pata em mm, medida diariamente ao longo de sete dias, dos animais inoculados com volume de 0,03mL contendo 5×10^6 células do tumor de Ehrlich no coxim plantar do membro posterior esquerdo. (**P < 0,001).

Conforme os resultados obtidos, a inoculação da célula B-1a reduziu o crescimento do TE, e ao se inocular a células B-2 o mesmo não ocorre.

5.4 Curva de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c inoculados a partir de cultura de B-1b.

Grupo de animais inoculados com 5×10^6 células tumorais em um volume de 0,03mL e 1×10^5 células B-1b, no volume de 0,02mL, totalizando um volume de 0,05mL inoculados no subcutâneo do coxim plantar do membro posterior esquerdo e grupo controle B-2 (**Gráfico 4**).

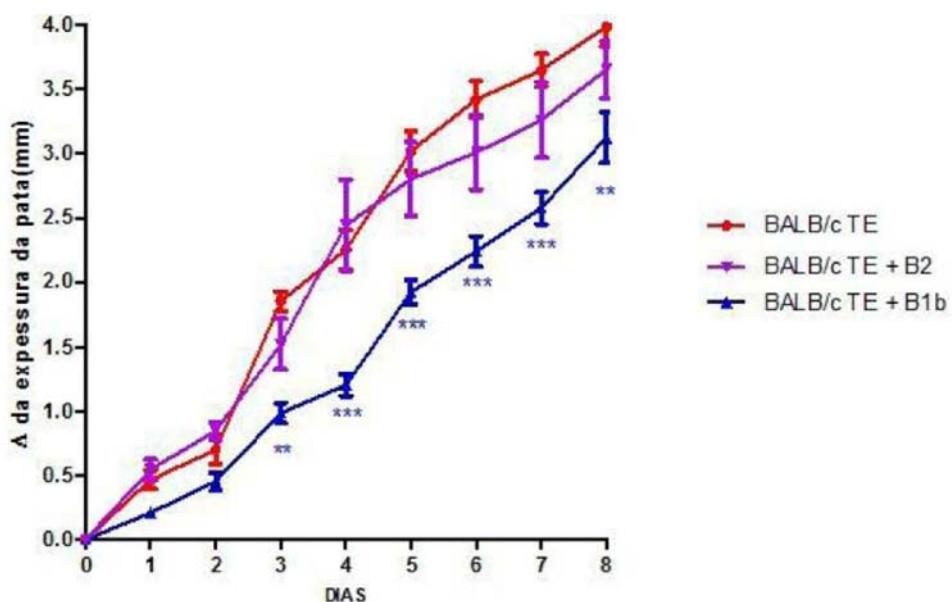


Gráfico 4- Curva de crescimento do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c. Análise do Δ da espessura da pata em mm, medida diariamente ao longo de sete dias, dos animais inoculados com volume de 0,03mL contendo 5×10^6 células do tumor de Ehrlich no coxim plantar do membro posterior esquerdo. (**P<0,01, ***P<0,001).

Conforme os resultados obtidos, a inoculação da célula B-1b reduziu o crescimento do TE, e ao se inocular a células B-2 o mesmo não ocorre.

5.5 Citometria de Fluxo da cultura de células B-2

Para uma averiguação mais precisa da pureza das células utilizadas como controle B-2, foram utilizadas células de baço purificadas por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita no FACSaria II com o programa Diva v.6.1.3, obtendo-se pureza de 99.3% (**Figura 2**).

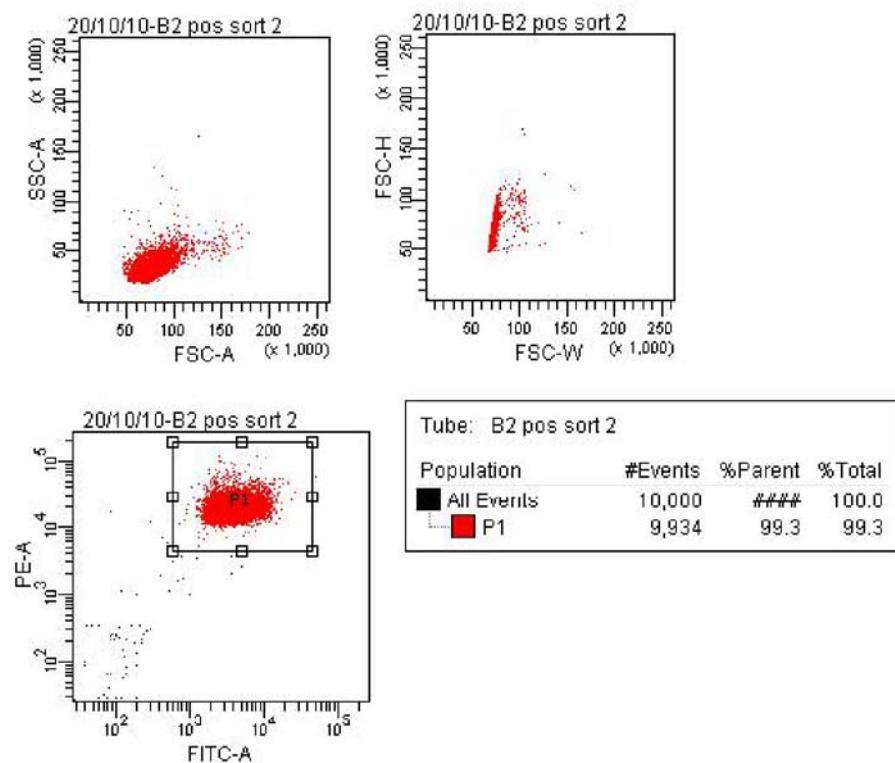


Figura 2 - Citometria de fluxo para purificação de células B-2. Células provenientes de baço de camundongos BALB/c purificadas por FACSaria II, apresentando pureza de 99,3%. Marcação CD23 (FITC-A) e CD19 (PE-A).

5.6 Citometria de Fluxo da cultura de células B-1a e B-1b

Para uma averiguação mais precisa do conteúdo das culturas, essas células foram submetidas à análise por citometria de fluxo, a análise dos dados foi feita no FACScalibur/Becton-Dickinson e programa CELLQUEST (**figura 3, 4, 5 e 6**)

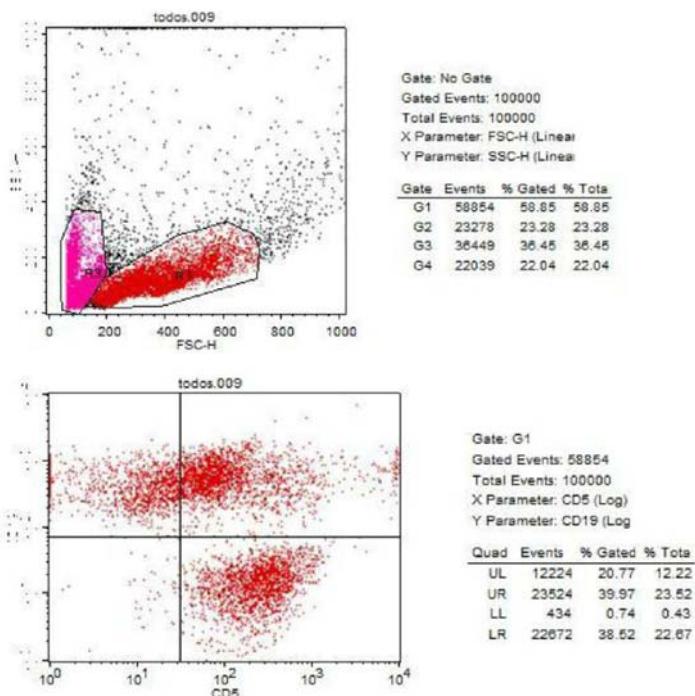


Figura 3 - Citometria de fluxo de cultura de células B-1a. Células provenientes de cultura de camundongos BALB/c

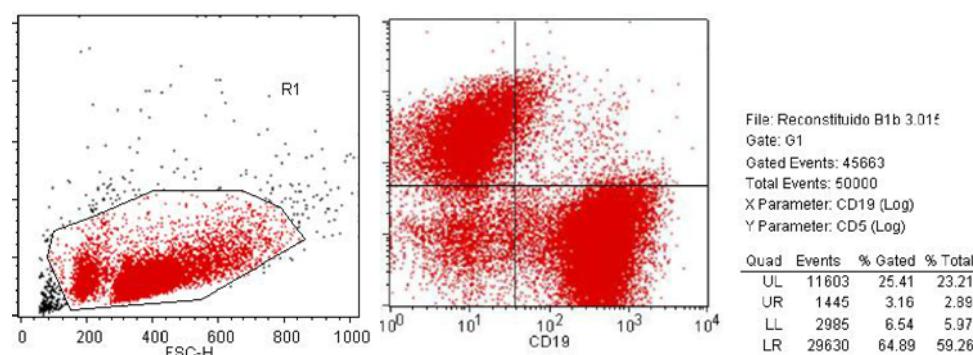


Figura 4 - Citometria de fluxo de cultura de células B-1b. Células provenientes de cultura de camundongos BALB/c

6. IMUNOHISTOQUÍMICA

6.1 Imunohistoquímica de patas

As patas excisionadas após o oitavo dia de crescimento tumoral foram mantidas em formol tamponado a 12%. O corte histológico foi processado e realizada a marcação para molécula de superfície F4/80 - presentes em macrófagos (Serotec cat # MCA497G, Raleigh, NC, EUA).

6.1.1 Imunohistoquímica de patas marcadas para macrófago

Foram realizadas análises em três lâminas distintas com marcação de superfície para a molécula F4/80. Estas lâminas apresentam campos corados em castanho como pode ser observada na **figura 5**

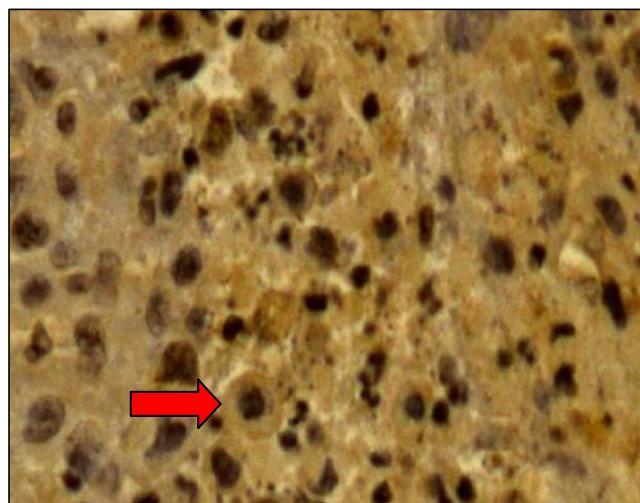


Figura 5 - Célula apresentando coloração castanha. Aumento de 400X (Arquivo Pessoal).

Diferentes campos foram capturados e analisados no programa MetaVue v.6.3r7 e os dados foram avaliados pelo GraphPad Prism 4, utilizado-se o método T teste (**Gráfico 5**).

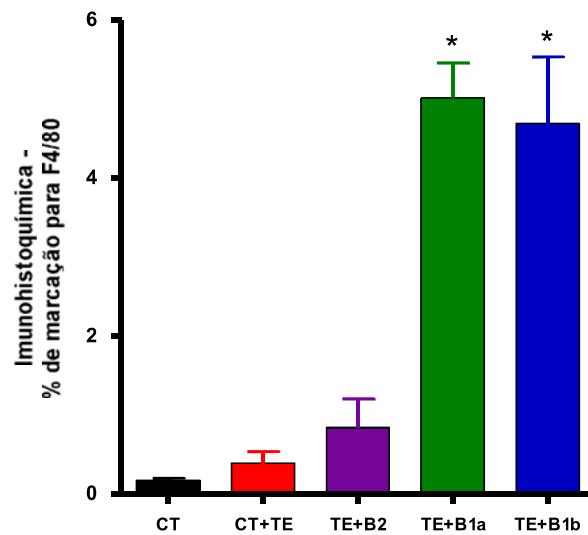


Gráfico 5- Gráfico representando a porcentagem de marcação obtida nas lâminas: foram utilizados 3 lâminas de cada grupo (Controle, Controle + TE, TE + B2, TE + B-1a e TE + B-1b) marcadas para F4/80 (* P < 0,05).

7. DISCUSSÃO

Os experimentos realizados e os resultados descritos neste trabalho, seguindo os protocolos estabelecidos, foram compatíveis com os resultados obtidos por GUERRA (1983), DAGLI (1989) e AZEVEDO (2007). O tumor possui curva de crescimento característica que se repete de maneira uniforme em todos os experimentos.

No que se refere à biologia do tumor de Ehrlich, os resultados mostram que o crescimento é contínuo, apresentando escape em 3 dias após o implante no tecido celular subcutâneo, e esse crescimento é dependente da concentração celular (GUERRA, 1983).

Foi avaliado a curva de crescimento do TE utilizando o número de 5×10^5 células de TE em um volume de 0,03 ou 0,05mL. Nos dois experimentos a curva de crescimento do TE apresentou um padrão semelhante de crescimento, demonstrando que o volume utilizado não altera o crescimento do TE (dados não mostrados).

Neste estudo foi utilizada a quantidade de 1×10^5 células B-1 para os grupos de animais que receberam juntamente o TE, uma vez já provado que em outras concentrações, como 5×10^5 não há diferença no crescimento tumoral, então optou-se por utilizar a quantidade de 1×10^5 células (FANTINI, 2009). A curva de crescimento tumoral dos animais inoculados com células B-1 difere da curva de crescimento tumoral dos animais do grupo controle (que receberam apenas TE) e dos animais do grupo controle B-2 (que receberam células B-2) corroborando com a ideia de que a presença da célula B-1 é fator importante na determinação da evolução tumoral nesse modelo experimental.

Sabendo-se que as culturas de células B-1 usadas para inoculação não são puras, outras células presentes no sobrenadante dessas culturas (macrófagos e/ou fibroblastos) podem também participar no crescimento tumoral, apesar de ser ainda fato não totalmente elucidado. As culturas de B-1a e B-1b foram submetidas à análise de citometria de fluxo. Foram utilizados anticorpos de superfície para caracterizar as células B-1a e B-1b. A cultura de B-1a apresentou 23,52% de marcação CD19+ e CD5+, a cultura de B-1b apresentou 59,26% de marcação CD19+ e CD5-.

HUSSEIN e HASSAN, em 2006, encontraram um aumento significativo do número de células inflamatórias mononucleares infiltrantes no tecido tumoral em

neoplasia mamária e esse infiltrado foi encontrado no tecido de transição entre o tecido neoplásico e o tecido normal, demonstrando a resposta imune contra células neoplásicas e está relacionado a um melhor prognóstico.

A interação de células B-1 com células de melanoma B16F10 já foi descrita e essa interação promove o aumento do crescimento tumoral primário e do potencial metastático de célula de melanoma B16F10. O íntimo contato entre células B-1 e células do melanoma foi observado por microscopia eletrônica (STAQUICINI *et al.*, 2004).

Foram utilizadas diferentes concentrações de células do TE inoculadas juntamente com células B-1 e avaliou-se o crescimento tumoral nos diferentes grupos. Foram observadas diferenças estatísticas no delta do crescimento do coxim plantar dos animais inoculados demonstrando a provável interação entre células B-1 e células do TE.

Não foram observadas diferenças estatísticas no crescimento tumoral quando utilizadas células do TE juntamente com células B-2. Nesse caso, a curva de crescimento tumoral dos animais que receberam o TE juntamente com as células B-2 se manteve semelhante à curva de crescimento dos animais que receberam somente o TE.

Ao inocular as células do TE juntamente com as células B-1a ou B-1b no coxim plantar de camundongos, houve uma curva de crescimento menor em relação à curva de crescimento dos animais que receberam somente o TE ou dos que receberam o TE + células B-2, o que sugere que a co-injeção de células B-1 é um fator determinante para um menor crescimento tumoral nesse modelo experimental.

A marcação por imunohistoquímica para o anticorpo F4/80, uma proteína de membrana que é conhecida por marcar macrófagos maduros e monócitos sanguíneos, foi utilizada com intuito de avaliar possíveis diferenças na reação inflamatória entre os grupos tratados e controle apresentados neste trabalho.

As células mononucleares (macrófagos) são importantes no processo de inflamação e neste estudo, desempenham um papel relevante na progressão do TE. Com a realização da imunohistoquímica os tecidos tumorais que receberam a co-injeção de TE e B-1 obtiveram uma marcação mais evidente para anticorpo F4/80, sugerindo que as células B-1 possam ter se diferenciado em fagócitos mononucleares apresentando marcação para F4/80 neste modelo experimental.

Em tumores mamários, CASO. R. *et al.*, 2010 e TORROELLA-KOURI M., em 2009, demonstraram que essa mesma célula ajuda na proliferação tumoral, possuindo uma característica anti-inflamatória e como consequência, maior crescimento tumoral.

Segundo CASO e colaboradores (2010) os monócitos circulantes provenientes de camundongos portadores de tumor de mama expressam diversas citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias, mostrando que os macrófagos podem agir tanto como inflamatórios quanto supressivos, dependendo do microambiente que se encontram. Os macrófagos, quando polarizados, são classificados em dois grupos: M1 e M2, enquanto macrófagos M1 possuem atividade bactericida e inflamatória, os M2 são imunomodulatórios, dessa forma, os macrófagos possuem atividade pró e anti-inflamatória (FILARDI *et. al* 2011).

BORRELLO e PHIPPS (1995) realizaram estudos sobre células B-1 *in vitro* e observaram que quando eram feitas co-culturas de células B-1 com fibroblastos, essas mesmas células B-1 se diferenciavam em fagócitos. E POPI. *et al*, em 2009, ao utilizar o modelo de *Coxiella burnetii* *in vitro*, observou que células B-1 derivadas de fagócyto mononuclear, fagocitam um número maior dessa bactéria em comparação aos macrófagos oriundos da medula óssea.

As células que apresentam marcação para F4/80 aparentam ter um fenótipo pró-inflamatório, uma vez que, nos grupos onde foi realizada a co-injeção de TE + B-1 houve uma maior marcação para F4/80 e um menor crescimento tumoral. Mais uma vez é possível sugerir que as próprias células incouladas B-1a e B-1b possam ter seu perfil alterado tornando-se células mononucleares fagocíticas que expressam receptores semelhantes aos encontrados em macrófagos (anticorpo F4/80) .

8. CONCLUSÃO

Neste modelo experimental pode-se concluir que as células B-1a e B-1b quando inoculadas em co-injeção com TE desempenham um papel importante no desenvolvimento do TE, promovendo a diminuição do crescimento do tumor *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H.; **Celular and Molecular Immunology**. 6^a edição, Sounders, 2007.

ABRAHÃO, T. B. FREYMULLER, E.; MORTARA, R. A.; LOPES, J. D. ; MARIANO, M. Morphological characterization of mouse B-1 cells. **Immunobiology**, vol. 208, p. 401-411, São Paulo, 2003.

ALMEIDA, S. R.; AROEIRA, L. S.; FREYMULLER, 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. **International Immunology**, vol. 13, p. 1193-1201. 2001.

AZEVEDO, M.C. Avaliação da participação das células B-1 no crescimento do carcinoma de Ehlich. São Paulo, 2007. 49p.-Tese (**Mestrado em Medicina Veterinária**, área de concentração Imunopatologia Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Paulista.

BODEY, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 2, n. 4, p. 371-93, 2002

BORRELLO, M. A.; PHIPPS, R.P. Fibroblasts support outgrowth of splenocytes simultaneously expressing B lymphocyte and macrophage characteristics. **J Immunology** v.155. p.4155 - 4161, 1995.

CASO, R., SILVERA, R., CARRIO, R., IRAGAVARAPU-CHARYULU V., GONZALEZ-PEREZ, R.R., TORROELLA-KOURI, M. Blood monocytes from mammary tumor-bearing mice: early targets of tumor-induced immune suppression? **International Journal of Oncology**, v.37, n.4, p. 891-900, 2010.

CHEVILLE, N. F; **Introdução à Patologia Veterinária**. 1^a edição, Manole, São Paulo, 1994.

DAGLI, M. L. Z; Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental. São Paulo, 1989. 148p. - Tese (**Doutorado em Patologia Experimental e Comparada**) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

DARZYNKIEWICZ, Z., GALKOWSKI, D., ZHAO, H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. **Methods**, v. 44. n.3. p. 250 - 254. 2008.

FANTINI, M. F. N.M. Participação de células B-1 na rejeição de aloenxertos no camundongo. São Paulo, 2009. 60p. -Tese (**Doutorado em Ciências**) Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

FILARDI, E. S., CRUGER, A. P., BLANCO, F.J., NIETO, C., BRAGADO, R., PALOMERO, M. I., BERNABÉU, C., VEGA, M.A., CORBI, A. L. Activin A skews macrophage polarization by promoting a pro-inflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. **Blood**, (Epub ahead of print), 2011.

GUERRA, J. L; Aspectos do Processo Inflamatório em Camundongos Portadores do Tumor de Ehrlich. São Paulo, 1983. 79p.-Tese (**Doutorado em Patologia Experimental e Comparada**) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

GUO, W., LASKY, J.L., WU, H. Cancer Stem Cells. **Pediatric Research**, v. 59, p. 59 -64R, 2006.

HERZENBERG, L. A.; KANTOR, A. B. B-cell lineages exist in the mouse. **Immunology Today**, vol.14; p. 79 - 83, 1993.

HOUAISS, A., VILAR, M. S., FRANCO, F. M. M.. **Dicionário Houaiss**, Rio de Janeiro, 2001

HUSSEIN, M. R., HASSAN, H. I. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. **Journal of Clinical Pathology.** v. 59, n.9, p. 972-977, 2006.

LEONG, A. S-Y.; WRIGHT, J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. **Histopathology**, v. 11, n. 12, p. 1295-1305, 1987

LLOYD, C.M., PHILLIPS, A.R.J., COOPER, G.J.S., DUNBAR, P.R., Three-colour fluorescence immunohistochemistry reveals the diversity of cells staining for macrophage markers in murine spleen and liver. **Journal of Immunological Methods**, v. 334, n. 1-2, p. 70-8.

LOPES, J. D.; MARIANO, M., B-1 cell: the precursor of a novel mononuclear phagocyte with immuno-regulatory properties. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 3, Sept. 2009.

MAHONEY, M. J.; LEIGHTON, J. The inflammatory response to a foreign body within transplantable tumors. **Cancer Research**. vol. 22, p.334-338, 1962.

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**, vol.113, n. 3, p. 257-265; 2004.

POPI, A. F.; Diferenciação de Células B-1: Características Morfológicas, Funcionais, e Moleculares. São Paulo, 2005. 72p. -Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

POPI, A.F.; ZAMBONI, D.S.; MORTARA, RA.; MARIANO, M. Microbicidal property of B1 cell derived mononuclear phagocyte. **Immunobiology**, v.214, p. 664-673; 2009.

SANTOS, P.C., Citometria de Fluxo - Aplicações práticas. Disponível em www.labimuno.org.br, 2010

ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional. 6a. edição, Guanabara Koogan. Rio de Janeiro 2001.

TORROELLA-KOURI M., SILVERA, R., RODRIGUEZ, D., CASO, R., SHATRY, A., OPIELA, S., ILKOVITCH, D., SCHWENDENER, R. A., IRAGAVARAPU-CHARYULU, V., CARDENTEY, Y., STRBO, N., LOPEZ, D. M. Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated. **Cancer Research**, v. 69, n. 11, p. 4800 - 4809; 2009.

SILVA, A. E; SANTOS, F. G. A; CASSALI, G. D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. Arquivo **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.58, n.4, p.658-661; 2006.

STAQUICINI, F. I; Participação de Linfócitos B-1 no Desenvolvimento do Melanoma Murino Experimental. São Paulo, 2004. 67p. - Tese (**Doutorado em Ciências**) Universidade de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

TIZARD, I. R.; Imunologia veterinária: uma introdução. 6^a edição, Roca, São Paulo 2002.