

UNIVERSIDADE PAULISTA  
PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA  
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

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

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

**JOSÉ RENILDO DE CARVALHO**

**SÃO PAULO**  
**2017**

**UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP**  
**PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA**  
**AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

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

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Profª. Drª. Elizabeth Cristina Perez Hurtado.

**JOSÉ RENILDO DE CARVALHO**

**SÃO PAULO**  
**2017**

Carvalho, José Renildo de.

Identificação e caracterização das células do sistema imune presentes no microambiente tumoral do melanoma subconjuntival e cutâneo em modelo murino / José Renildo de Carvalho. – 2017.

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

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Biologia da Diferenciação e Transformação Celular.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Cristina Pérez Hurtado.

1. Microambiente tumoral. 2. Melanoma cutâneo. 3. Melanoma subconjuntival. 4. Células do sistema imune. 5. Meta-análises.  
I. Pérez Hurtado, Elizabeth Cristina (coorientadora). II. Título.

**JOSÉ RENILDO DE CARVALHO**

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

**BANCA EXAMINADORA:**

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Cristina Perez Hurtado, Universidade Paulista – UNIP  
(Orientadora) \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Prof. Dr. José Guilherme Xavier, Universidade Paulista – UNIP \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Anete Lallo, Universidade Paulista – UNIP \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Helena Pizarro De Lorenzo, Centro Universitário São Camilo \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anuska Marcelino Alvares Saraiva, Laboratório de Fisiopatologia  
Instituto Butantan \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

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 a base das minhas conquistas;

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

À minha namorada Ana Paula Martins Silva e 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;

À Professora Doutora Elizabeth Cristina Pérez Hurtado, pela dedicação em suas orientações prestadas na elaboração deste trabalho e por todo o aprendizado em imunologia;

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;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP), por fornecer a bolsa de doutorado e por todo o financiamento prestado;

À 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;

Aos meus amigos alunos da UNIP, muito obrigado por toda a força e incentivo;

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 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

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo, caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que dirigem o tumor à progressão. Dentre os tipos de cânceres, o de pele é o mais incidente na população brasileira. Entretanto, o melanoma que representa só 4% das neoplasias malignas deste órgão, é o que mais causa óbitos devido à sua alta capacidade metastática. Estudos recentes têm demonstrado que a agressividade da maioria dos tumores é devida às interações das células tumorais com os demais componentes do microambiente onde o tumor se desenvolve. Assim, com o intuito de avaliar a influência do microambiente tumoral no desenvolvimento do melanoma, este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar as células do sistema imune presentes no microambiente tumoral em dois modelos experimentais de melanoma murino: cutâneo e subconjuntival (Artigo 1). Resultados mostraram que animais com melanoma subconjuntival apresentaram crescimento tumoral significativamente menor que os animais com melanoma cutâneo, com presença de células tumorais no linfonodo cervical. Além disso, animais com melanoma subconjuntival apresentaram maior produção de IL-6 e maior porcentagem de células CD4+, CD8+, NKT e macrófagos ativadas no microambiente tumoral quando comparados com os animais com melanoma cutâneo. Além desses dados experimentais, o atual trabalho apresenta uma revisão sistemática sobre melanoma. Para esta revisão, um total de 300 artigos foram consultados (Artigo 2). Resultados obtidos nessa revisão mostram que o melanoma cutâneo é o mais citado (72,7%) dos trabalhos consultados. Estes trabalhos revelam também que Europa e América do Norte lideram tanto as pesquisas (37% e 32%) como as publicações (54% e 41%) respectivamente, em relação ao tema. A maioria desses trabalhos são estudos originais (88%) que descrevem ensaios realizados com seres humanos (77%), dos quais são principalmente ensaios clínicos e não experimentais (64,6% e 35,4%, respectivamente). Dentre os trabalhos originais 11% avaliam a participação do microambiente tumoral no desenvolvimento e progressão do melanoma.

**Palavras-Chave:** Microambiente tumoral, melanoma cutâneo, melanoma subconjuntival, células do sistema imune, IL-6, metanálise.

## ABSTRACT

The development of cancer is a complex process, characterized by the accumulation of genetic and epigenetic changes that direct the tumor to progression. Among the cancers, the skin is the most incident in the Brazilian population. Despite that melanoma represents only 4% of the malignant neoplasms of this organ, is the principle leading deaths due to its high metastatic capacity. Recent studies have shown that the aggressiveness of most tumors is due to the interactions of tumor cells with other components of the microenvironment where the tumor develops. Thus, in order to evaluate the influence of the tumor microenvironment on the melanoma development, the identification and characterization of the immune system cells were performed in two experimental models of murine melanoma: cutaneous and subconjunctival melanoma (Article 1). Results showed that animals with subconjunctival melanoma had significantly lower tumor growth than animals with cutaneous melanoma and presented tumor cells in the cervical lymph node. Furthermore, animals with subconjunctival melanoma had higher IL-6 production and a higher number of CD4+, CD8+, NKT and macrophages cells activated in the tumor microenvironment when compared to the animals with cutaneous melanoma. In parallel to experimental results, herein we presented a systematic review on melanoma that included 300 articles (Article 2). Results display in the review shown that cutaneous melanoma is the most cited (72.7%) of the works consulted. These studies shown also that Europe and North America lead both research (37% and 32%) and publications (54% and 41%), respectively, in relation to the topic. Most of these studies are original studies (88%) describing human trials (77%), which are mainly clinical and non-experimental trials (64.6% and 35.4%, respectively). Among the original studies only 11% evaluated the participation of the tumor microenvironment in the development and progression of melanoma.

**Keywords:** Tumor microenvironment, cutaneous melanoma, subconjunctival melanoma, immune system cells, IL-6, meta-analyzes.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	10
REFERÊNCIAS .....	12
<b>2. ARTIGOS .....</b>	13
<b>2.1. Identificação e caracterização das células do sistema imune presente no microambiente tumoral do melanoma subconjuntival e cutâneo em modelo murino .....</b>	13
<b>Introdução .....</b>	14
<b>Materiais e métodos .....</b>	17
Animais .....	17
Cultura de células de melanoma B16F10 .....	17
Ensaio de sobrevida .....	18
Inoculação com células tumorais .....	18
Crescimento Tumoral .....	18
Citometria de Fluxo.....	18
Análises de citocinas por citometria de fluxo (CBA – <i>cytometric beads array</i> ) .....	19
Histologia.....	20
Análise Estatística.....	20
<b>Resultados .....</b>	21
<b>Discussão.....</b>	34
<b>Conclusões .....</b>	39
<b>Referências .....</b>	39
<b>2.2. Melanoma na literatura científica: uma meta-análise .....</b>	43
<b>Resumo .....</b>	43
<b>Introdução .....</b>	44
<b>Material e métodos .....</b>	45
<b>Resultados .....</b>	46
<b>Discussão.....</b>	51
<b>Conclusões .....</b>	53
<b>Referências .....</b>	53
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	56
FIGURA SUPLEMENTAR.....	57
ANEXOS .....	58

## 1. INTRODUÇÃO

Na atualidade, o câncer é a segunda doença que mais causa óbitos no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (INCA, 2015). O desenvolvimento do câncer é um processo complexo, caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que dirigem o tumor à progressão. 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 (Varricchi *et al.*, 2016).

Dentre os cânceres, o de pele é o mais incidente na população brasileira (INCA, 2015). Entretanto, o melanoma, que representa só 4% das neoplasias malignas deste órgão, é o que mais vem causando óbitos devido a sua alta capacidade metastática (Gutiérrez García-Rodrigo *et al.*, 2017; Satheesha *et al.*, 2017).

Melanomas são neoplasias malignas que se desenvolvem a partir de melanócitos da crista neural, que são encontrados na pele, olhos, mucosas e epitélio da leptomeninge (Hurst *et al.*, 2003). Na progressão do melanoma, estão envolvidos múltiplos fatores como alterações genéticas no hospedeiro e interação com o microambiente onde o tumor se desenvolve (Brandner e Haass, 2013).

Nos últimos anos, grande parte dos avanços da pesquisa científica em câncer tem como foco o estudo das interações entre células tumorais e o seu microambiente. Entretanto, apesar do grande número de trabalhos utilizando como modelo de estudo o melanoma, ainda existem muitas questões a serem exploradas.

Assim, com o intuito de avaliar a influência do microambiente tumoral no desenvolvimento do melanoma, foi realizada a identificação e caracterização das células do sistema imune presentes no microambiente tumoral em dois modelos experimentais de melanoma murino: cutâneo e subconjuntival. Os resultados obtidos nesta pesquisa serão apresentados em formato de artigo para posterior submissão para a revista *Journal of Immunology Research*. Além desse trabalho, também apresentamos uma revisão sistemática sobre melanoma, na qual foram utilizados 300 artigos para a realização da pesquisa. O intuito da revisão sistemática, que será submetida ao periódico *Archives of Dermatological Research*, foi determinar a evolução das pesquisas sobre melanoma, mapeando o tipo de publicações e suas

investigações a fim de detectar assuntos negligenciados que possam ser alvo de novas pesquisas no campo do melanoma.

## REFERÊNCIAS

- BRANDNER, J. M.; HAASS, N. K. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. **Pathology**, v. 45, n. 5, p. 443-52, Aug 2013. ISSN 1465-3931. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23851614> >.
- GUTIÉRREZ GARCÍA-RODRIGO, C. et al. Staging and follow-up of cutaneous melanoma patients. **G Ital Dermatol Venereol**, v. 152, n. 3, p. 231-240, Jun 2017. ISSN 1827-1820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28195451> >.
- HURST, E. A.; HARBOUR, J. W.; CORNELIUS, L. A. Ocular melanoma: a review and the relationship to cutaneous melanoma. **Arch Dermatol**, v. 139, n. 8, p. 1067-73, Aug 2003. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925397> >.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; INCA; 2015. 122 p. ilus, tab.
- SATHEESHA, T. Y. et al. Melanoma Is Skin Deep: A 3D Reconstruction Technique for Computerized Dermoscopic Skin Lesion Classification. **IEEE J Transl Eng Health Med**, v. 5, p. 4300117, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28512610> >.
- VARRICCHI, G. et al. Controversial role of mast cells in skin cancers. **Exp Dermatol**, Jun 2016. ISSN 1600-0625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27305467> >.

## 2. ARTIGOS

### 2.1. Identificação e caracterização das células do sistema imune presente no microambiente tumoral do melanoma subconjuntival e cutâneo em modelo murino

José Renildo de Carvalho<sup>1</sup>, Maria Anete Lallo<sup>1</sup>, José Guilherme Xavier<sup>1</sup>, Fabiana Toshie de Camargo Konno<sup>1</sup>, Anuska Marcelino Alvares-Saraiva<sup>2,3</sup>, Thiago Albuquerque Viração<sup>1</sup>, Debora de Oliveira Mares Silvestro<sup>1</sup>, Diva Denelle Spadacci Morena<sup>2</sup>, Elizabeth Cristina Pérez Hurtado<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Instituto Butantan, Laboratório de Fisiopatologia. São Paulo, SP – Brasil.

<sup>3</sup>Instituto de ciências da atividade física e esporte, Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, SP – Brasil.

#### Resumo

Estudos recentes têm demonstrado que a agressividade da maioria dos tumores é devida às interações das células tumorais com os demais componentes do microambiente onde o tumor se desenvolve. Assim, considerando que interações das células tumorais com células do sistema imune presente nesse microambiente podem tanto favorecer como inibir o crescimento do tumor, o intuito deste trabalho foi investigar o comportamento das células de melanoma quando o tumor primário se desenvolve em sítios primários diferentes: cutâneo ou subconjuntival. Para isto, células de melanoma murino B16F10 foram injetadas na região subcutânea do dorso direito (melanoma cutâneo) ou na região subconjuntival do olho direito (melanoma subconjuntival) de camundongos da linhagem C57BL/6. Resultados mostraram que animais com melanoma subconjuntival apresentaram crescimento tumoral significativamente menor que os animais com melanoma no dorso e, com presença de células tumorais no linfonodo cervical. Além disso, animais com melanoma subconjuntival apresentaram maior produção de IL-6 e maior número de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NKT e macrófagos ativados no microambiente tumoral quando comparados ao grupo com melanoma cutâneo. Embora a ativação das células do sistema imune esteja associada com melhor resposta antitumoral, a presença de

células tumorais nos linfonodos em animais com melanoma subconjuntival sugere que interações com células do sistema imune estejam favorecendo o estabelecimento de metástases neste grupo. Em conjunto, os resultados aqui apresentados sugerem que tumores da mesma origem celular podem apresentar comportamentos diferentes na dependência do local onde o tumor primário se desenvolve. Portanto este estudo confirma o papel crucial do microambiente no desenvolvimento do melanoma e fornece informações importantes da participação de populações imunológicas como alvo de estudo para futuras pesquisas no tratamento de tumores agressivos como o melanoma.

**Palavras-chave:** Microambiente tumoral, melanoma cutâneo, melanoma subconjuntival, células do sistema imune, IL-6.

## Introdução

Melanomas são neoplasias malignas que se desenvolvem a partir de melanócitos encontrados na pele, olhos, mucosas e epitélio da leptomeninge. Entre os cânceres de pele, o melanoma tem baixa incidência na população (aproximadamente 4%), entretanto, é considerado o mais grave devido à sua alta capacidade para promover metástases (INCA, 2015), que são as responsáveis por aproximadamente 90% de todas as mortes relacionadas a este tipo de câncer (Nguyen e 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, invadir e colonizar órgãos ou tecidos diferentes do local de origem do tumor primário (Nguyen e Massagué, 2007; Spano e Zollo, 2012).

Entre os melanomas, o melanoma cutâneo é o de maior ocorrência na população mundial seguido pelo melanoma ocular (Grin *et al.*, 1998; Shields, 2000; Hurst *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2015; Fink e Haenssle, 2016). 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 e Kirkwood, 2007; Brandner e Haass, 2013; Varricchi *et al.*, 2016).

O microambiente tumoral é definido como o local de desenvolvimento do tumor formado não só por células neoplásicas, mas também por células do sistema imunológico e vários outros tipos de células. No microambiente tumoral também são encontrados outros elementos, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e nutrientes que podem, também, tanto favorecer como impedir o crescimento e progressão do tumor (Joyce e Pollard, 2009; Rogers e Holen, 2011; Quail e Joyce, 2013; Varricchi *et al.*, 2016).

As células do sistema imunológico presentes no microambiente tumoral geralmente são inflamatórias, como os macrófagos associados ao tumor (TAMs), mastócitos, neutrófilos, linfócitos T e B, células *natural killer* (NK) e linfócitos T invariantes (células NKT) (Murdoch *et al.*, 2008; Denardo *et al.*, 2010; Egeblad *et al.*, 2010; Gajewski *et al.*, 2013; Varricchi *et al.*, 2016).

Os TAMs, quando ativados pela via clássica (IFN- $\gamma$ ), 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 (RNS) (Allavena e Mantovani, 2012; Quail e Joyce, 2013). 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 as respostas do tipo Th1 (Allavena e Mantovani, 2012; Quail e Joyce, 2013). Entretanto, na tentativa do sistema imunológico de manter a homeostasia do organismo, 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 (Joyce e Pollard, 2009; Allavena e Mantovani, 2012). 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; Allavena e Mantovani, 2012; Spano e Zollo, 2012; Quail e Joyce, 2013; Varricchi *et al.*, 2016).

Outras células que podem tanto favorecer quanto inibir a progressão tumoral são os linfócitos B, subdivididos em células B-1 e B-2. As células B-1 diferenciam-se das células B-2 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- $\alpha$  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 (Nogueira-Martins e Mariano, 2010). 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 como 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 Th1, favorecendo respostas pró-tumorais (Allavena e Mantovani, 2012; Quail e Joyce, 2013).

Por sua vez as células T CD8 $^{+}$  e células NKT são recrutadas para o microambiente tumoral, onde exercem um papel importante nas respostas antitumorais, conforme já descritas em estudos *in vivo* (Wetzel *et al.*, 2007; Ugurel *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

Assim, nos últimos anos grande parte dos avanços da pesquisa científica em câncer tem como foco o estudo das interações entre células tumorais e o seu microambiente. Portanto, a identificação e caracterização desse microambiente em dois modelos experimentais de melanoma murino podem fornecer informações adicionais sobre a influência do microambiente tumoral no desenvolvimento e agressividade do melanoma, além de favorecer a descoberta de novos alvos terapêuticos para o tratamento de tumores potencialmente malignos.

## Material e métodos

### Animais

Foram utilizados 36 camundongos fêmeos C57BL/6 adultos SPF, 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 em microisoladores com água e ração autoclavadas, com temperatura controlada por meio de ar-condicionado ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e com ciclo de luz também controlado de 12 horas, em condições SPF, no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista.

Os animais foram divididos em 2 grupos:

Grupo melanoma cutâneo – animais injetados com células de melanoma B16F10 no subcutâneo do dorso direito, na região posterior do membro inferior;

Grupo melanoma subconjuntival – animais injetados com células de melanoma B16F10 na região subconjuntival do olho direito.

Cada grupo foi subdividido em 3 grupos de 6 animais, sendo o grupo 1 destinado ao ensaio de sobrevida e crescimento tumoral, grupo 2, análises por citometria e análises histológica e o grupo 3, análises de citocinas;

Todos os procedimentos realizados no presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Paulista (CEP/ICS/UNIP), protocolo nº318/15.

### Cultura de células de melanoma B16F10

As células B16F10 foram cultivadas em meio RPMI (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de ciprofloxacina (ambos da Cultilab, Campinas, SP, Brasil), mantidas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O descolamento das células para posteriores ensaios foi realizado por breve exposição ao PBS + EDTA 2 mM. O meio de cultura das células em cultivo foi trocado a cada dois dias.

### Inoculação com células tumorais

Os animais correspondentes ao grupo experimental foram injetados no subcutâneo do dorso direito, na região posterior do membro inferior ou na região subconjuntival do olho direito com  $1 \times 10^5$  células de melanoma murino B16F10, ressuspensas em 50  $\mu\text{L}$  de PBS.

### Ensaio de sobrevida

Animais foram acompanhados diariamente até a eutanásia do último animal realizada quando algum sinal de sofrimento ou desconforto do animal fosse notado (ferida e/ou dificuldade de locomoção).

### Crescimento Tumoral

O crescimento da massa tumoral foi medido diariamente com paquímetro (comprimento x largura) até o óbito do último camundongo de cada grupo (aproximadamente 30 dias).

Para o cálculo do volume tumoral foi utilizada a fórmula:

$$V (\text{mm}^3) = d^2 * (D/2)$$

Onde d é o valor menor e D o valor maior das medidas de comprimento e largura realizadas diariamente.

### Citometria de Fluxo

Após 14 dias do desafio com células tumorais, lavado peritoneal, linfonodo inguinal ou cervical, fragmentos do tumor foram coletados para análises por citometria de fluxo e histologia.

A caracterização das populações celulares presentes no microambiente tumoral, linfonodo e lavado peritoneal por citometria de fluxo foi realizada utilizando os marcadores CD3 (APC-Cy7-A), CD4(FITC-A), CD8(APC-A) para células T; CD19

(PerCP-Cy5-5-A), CD23 (FITC-A), CD11b (PE-A) para linfócitos B; F480 (APC-A) para macrófagos; NK1.1 (PE-A) para células NK e NKT; CD45 (Pacific Blue-A) para seleção da população de leucócitos; CD69 (PE-Cy7-A), CD44 (APC-Cy7-A) como marcadores de ativação e *live/dead* (AmCyan-A) para diferenciação de populações viáveis. Todos os anticorpos utilizados foram marca BD (Becton, Dickinson & Company, São Paulo, Brasil). Para cada amostra a ser analisada,  $1 \times 10^6$  células foram utilizadas. Antes da marcação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 e *live/dead* diluído em PBS por 30 min, no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas por 30 min. a 4°C com anticorpo primário de escolha já conjugado com o fluorocromo desejado, diluído em PBS/BSA 1%. Após incubação, as células marcadas foram lavadas e ressuspensas em 200  $\mu$ L de PBS para leitura em aparelho FACS Canto II (Becton Dickinson).

Os dados foram analisados usando os softwares de análises FlowJo (Becton, Dickinson & Company, Ashland, Oregon) e GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA). Para a caracterização das populações celulares, foram utilizadas as estratégias de *gate* descritas na Figura suplementar 1.

#### Análises de citocinas por citometria de fluxo (CBA – *cytometric beads array*)

As concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-2 e IFN (Th1); IL-4, IL-6, IL-10 (Th2) e IL-17A foram mensuradas em amostras de plasma e do macerado tumoral, pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA), usando o kit BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 (Becton, Dickinson & Company, São Paulo, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/ml. As concentrações de cada amostra foram calculadas com base na curva padrão realizada de acordo as informações do kit. Amostras com concentrações abaixo do limite de detecção determinado pelo Kit para cada citocina foram consideradas com o valor 0 pg/ml.

## Análises Histopatológicas

Linfonodo inguinal, linfonodo cervical e massa tumoral de cada um dos camundongos foram retirados cirurgicamente para análises histopatológicas pela coloração hematoxilina e eosina (HE), obedecendo aos seguintes processos:

- Preparo do material: O material coletado foi fixado em formol 10%. E posteriormente, feito a inclusão do material em blocos de parafina. 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.
- Montagem da lâmina: Os cortes obtidos por microtomia (4  $\mu\text{m}$ ) são então desparafinados, reidratados e corados com hematoxilina entre 5 e 15 minutos. Após, lavados com água corrente por 10 minutos e 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. Os cortes foram fotografados em microscópio digital LEICA DM 1000 com câmera LEICA DFC 420 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

Para caracterizar a atividade proliferativa, foram contados os números de mitoses a cada trezentas (300) células por campo, em cinco campos por amostra. Para caracterizar a densidade microvascular, foram contados os números de vasos por campos analisados, em cinco campos por amostra. Para determinação de metástases linfonodais em linfonodos ipsilateral da massa tumoral, foram consideradas colonizações no córtex e na paracôrte dos linfonodos, com aglomerado sólido e heterogêneo de células tumorais.

## Análise Estatística

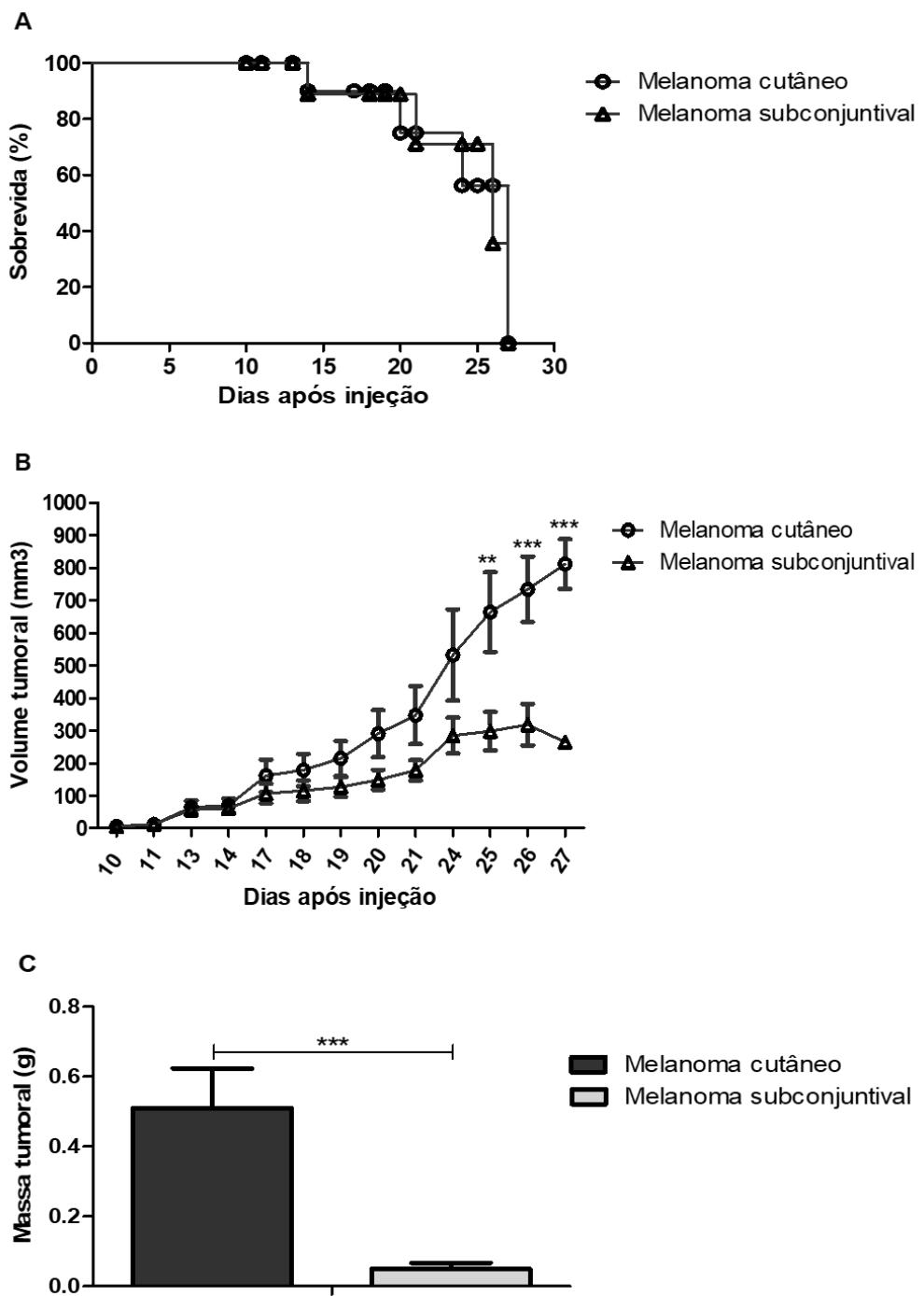
Primeiramente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* (BioEstat). Conforme os resultados do teste de normalidade, as amostras foram submetidas ao teste ANOVA de duas vias com o pós-teste

Bonferroni ou teste t, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA) para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. Diferenças com valor de  $p \leq 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## **Resultados**

### **Crescimento do melanoma cutâneo foi maior do que o melanoma subconjuntival**

Conforme mostrado na Figura 1A, não foram observadas diferenças significativas quanto à sobrevida dos animais quando comparados os grupos melanoma cutâneo versus melanoma subconjuntival. Entretanto, nas análises de crescimento e peso tumoral foi observado que os animais com melanoma subconjuntival apresentaram massa tumoral significativamente menor que os animais com melanoma cutâneo (Figura 1B e C).

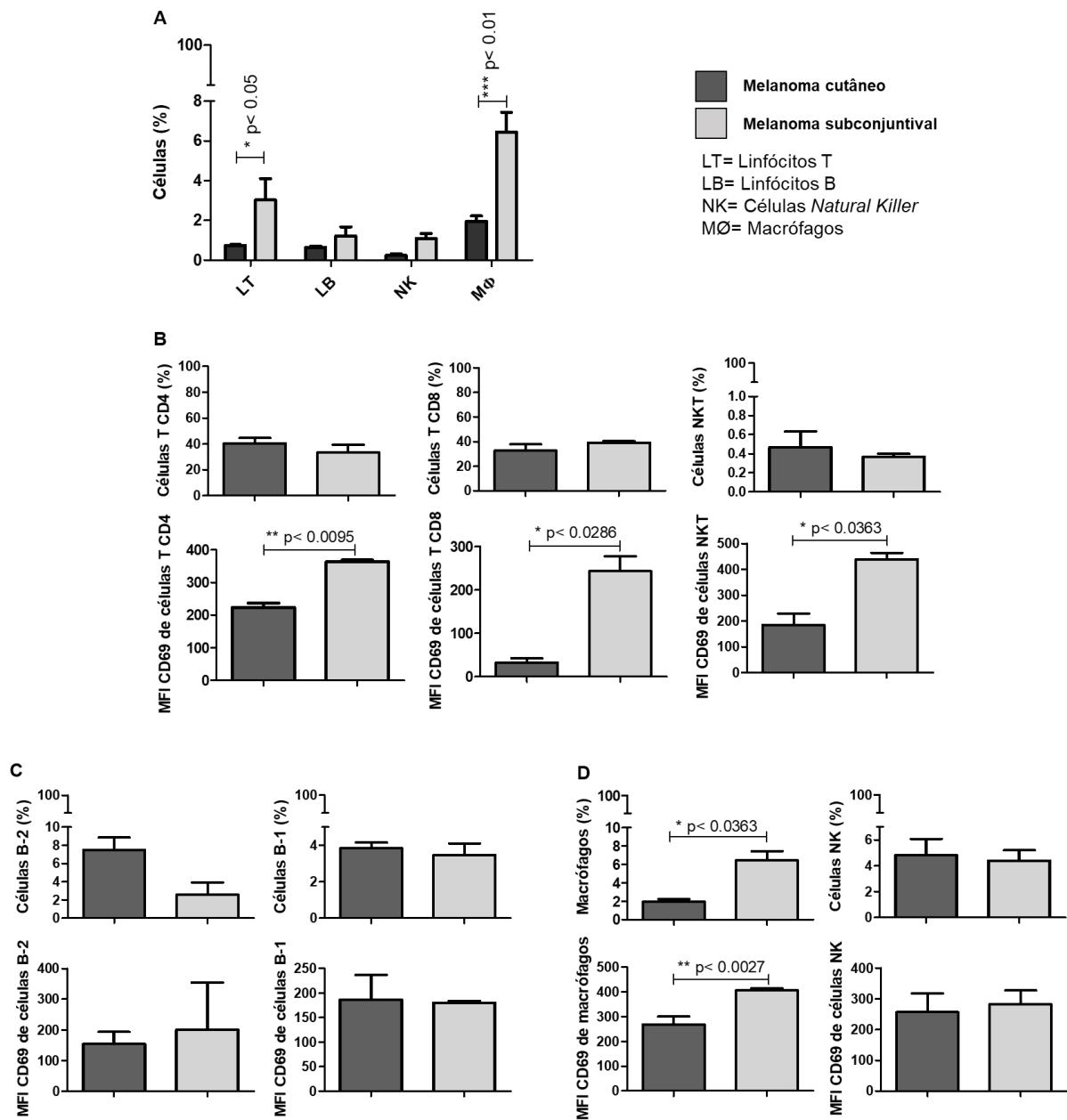


**Figura 1. Avaliação da sobrevida, crescimento e massa tumoral de animais inoculados com células de melanoma em locais diferentes.** A) Cálculo de sobrevida dos animais dos grupos melanoma cutâneo e melanoma ocular durante 30 dias. B) Pontos correspondem ao valor médio dos cálculos do volume tumoral dos animais dos grupos melanoma cutâneo e melanoma subconjuntival, medido em dias alternados durante 27 dias. C) Colunas representam a média do peso do tumor após 14 dias de injeção subcutânea (melanoma cutâneo) ou subconjuntival (melanoma subconjuntival) de células de melanoma. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Teste estatístico: ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni em B e teste t em C.

## **Linfócitos T e macrófagos apresentam maior perfil de ativação no microambiente do melanoma subconjuntival**

Nas análises estatísticas do percentual celular total, foram encontradas diferenças estatísticas no aumento de linfócitos T e macrófagos no grupo com melanoma subconjuntival quando comparado com o grupo com melanoma cutâneo. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas para as populações de linfócitos B e células NK (Figura 2A).

Nas análises individuais das populações leucocitárias do microambiente tumoral, houve aumento significativo do percentual de macrófagos no grupo com melanoma subconjuntival quando comparado com o grupo melanoma cutâneo (Figura 2D). Para as populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, linfócitos B-1 e B-2, células NK e NKT não foram encontradas diferenças estatísticas quanto ao percentual destas células no microambiente tumoral nos grupos avaliados (Figura 2B, C e D).



**Figura 2: Populações de linfócitos T e macrófagos exibem perfil ativado no melanoma subconjuntival.** A) Colunas representam a média do percentual de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup> e CD23<sup>+</sup>), células NK (CD3<sup>-</sup> e NK1.1<sup>+</sup>), e macrófagos (CD19<sup>-</sup>, CD23<sup>±</sup>, CD11b<sup>+</sup> e F4-80<sup>+</sup>) no local de inoculação de células de melanoma B16F10, na região do dorso (melanoma cutâneo) ou da região subconjuntival (melanoma subconjuntival). Percentuais de células totais e intensidade de ativação (*Median fluorescence intensity* ou MFI de CD69) em: B) linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), células NKT (CD3<sup>+</sup> e NK1.1<sup>+</sup>); C) Linfócitos B-2 (CD19<sup>+</sup> e CD23<sup>+</sup>), linfócitos B-1 (CD19<sup>+</sup> e CD23<sup>-</sup>); e; D) Macrófagos (CD19<sup>-</sup>, CD23<sup>±</sup>, CD11b<sup>+</sup> e F4-80<sup>+</sup>) e células NK (CD3<sup>-</sup> e NK1.1<sup>+</sup>) presentes no microambiente do tumor (grupo experimental) após 14 dias da injeção. Teste estatístico: ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni em A e teste t em B, C e D.

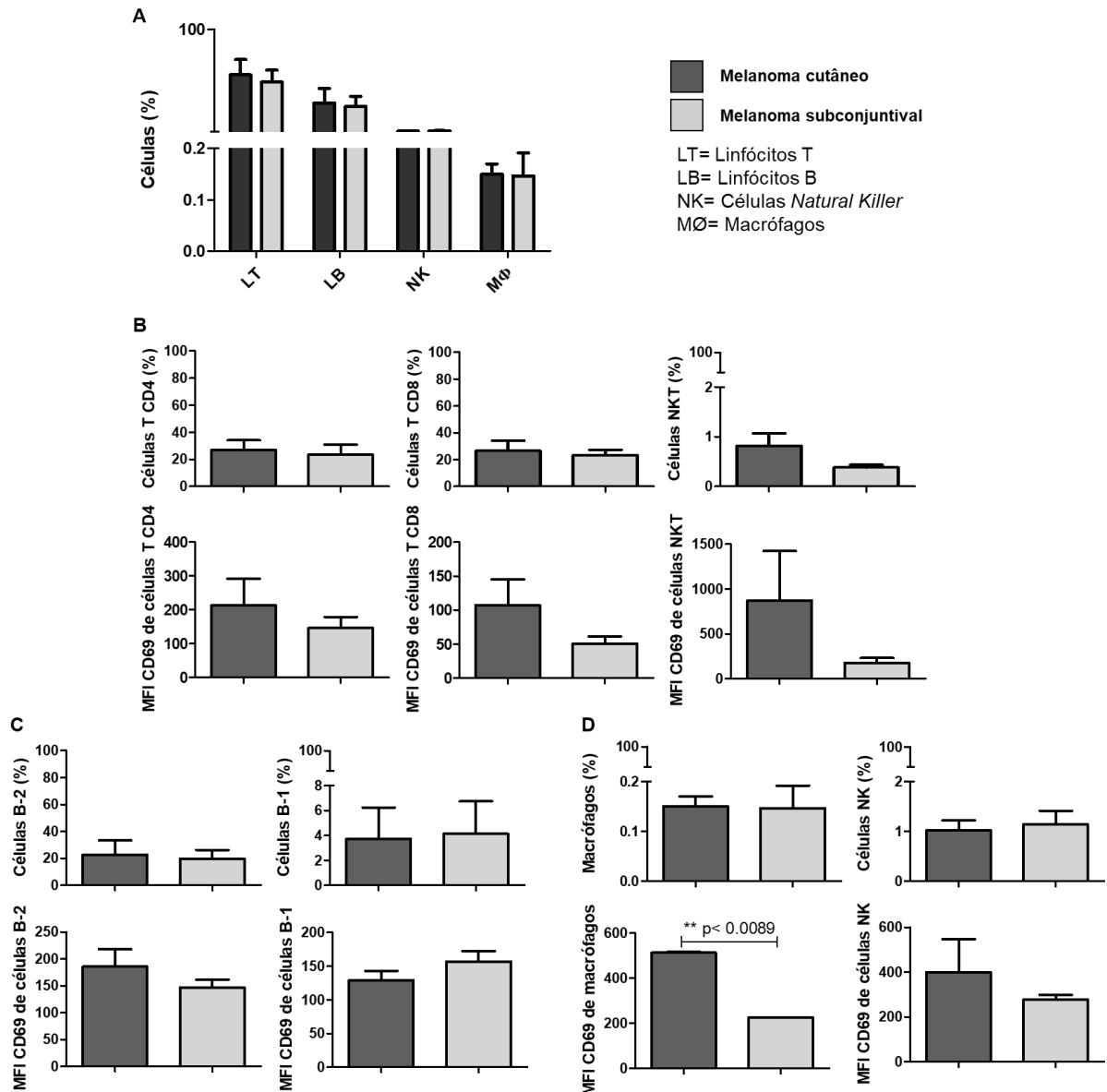
Populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, células NKT e macrófagos do microambiente do melanoma subconjuntival mostraram intensidade de ativação (MFI) estatisticamente maior quando comparados ao MFI dessas populações presentes no microambiente de melanoma cutâneo (Figura 2B e D). Já as populações de células NK e linfócitos B-1 e B-2 não apresentaram diferenças estatísticas quanto à intensidade de ativação destas células nos dois modelos (Figura 2C e D).

### **População de macrófagos nos linfonodos apresentam maior perfil de ativação em camundongos com melanoma cutâneo**

Para verificar possível migração leucocitária de órgãos linfoides para o microambiente tumoral, caracterização das populações leucocitárias foi realizada nos linfonodos proximais da região ocular (grupo melanoma subconjuntival) e dorso (grupo melanoma cutâneo).

Os resultados obtidos mostraram aumento significativo do percentual e intensidade de ativação de macrófagos no linfonodo inguinal de animais do grupo com melanoma cutâneo quando comparados com os resultados do linfonodo cervical dos camundongos do grupo com melanoma subconjuntival (Figura 3D). Já para as populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, linfócitos B-1 e B-2, células NK e NKT não foram encontradas diferenças estatísticas quanto ao percentual de ativação e intensidade de ativação destas células nos linfonodos dos animais de ambos os grupos (Figura 3B, C e D).

Nas análises do percentual de leucócitos totais no linfonodo de animais dos grupos experimental e controle, não houve diferenças estatísticas nas populações celulares analisadas quando comparado o grupo com melanoma cutâneo vs o grupo com melanoma subconjuntival (Figura 3A).

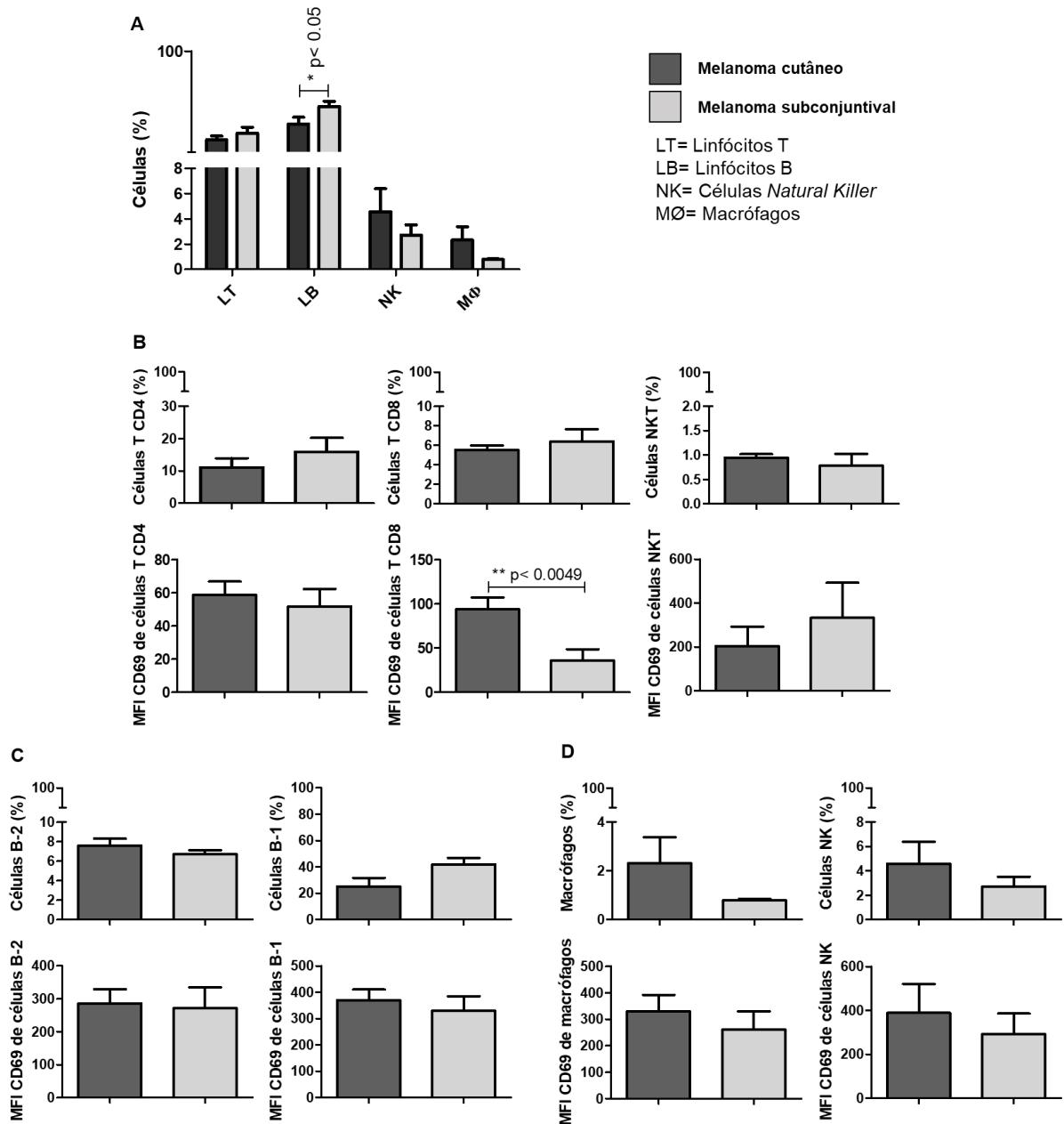


**Figura 3: Percentual de ativação e intensidade de ativação de macrófagos no linfonodo é maior no melanoma cutâneo quando comparado com melanoma subconjuntival.** A) Colunas representam a média do percentual de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup> e CD23<sup>+</sup>), células NK (CD3<sup>-</sup> e NK1.1<sup>+</sup>), e macrófagos (CD19<sup>-</sup>, CD23<sup>±</sup>, CD11b<sup>+</sup> e F4-80<sup>+</sup>) nos linfonodos após 14 dias da inoculação de células de melanoma B16F10 ou PBS, na região do dorso (melanoma cutâneo) ou do olho (melanoma subconjuntival). B) Percentuais de células totais e intensidade de ativação (*Median fluorescence intensity* ou MFI de CD69) de: B) linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), células NKT (CD3<sup>+</sup> e NK1.1<sup>+</sup>); C) Linfócitos B-2 (CD19<sup>+</sup> e CD23<sup>+</sup>), linfócitos B-1 (CD19<sup>+</sup> e CD23<sup>-</sup>); D) Macrófagos (CD19<sup>-</sup>, CD23<sup>±</sup>, CD11b<sup>+</sup> e F4-80<sup>+</sup>) e células NK (CD3<sup>-</sup> e NK1.1<sup>+</sup>) presentes no linfonodo inguinal próximo ao local de inoculação das células tumorais na região do dorso ou ocular (Melanoma cutâneo e melanoma subconjuntival, respectivamente). Teste estatístico: ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni em A e teste t em B, C e D.

### **Aumento da intensidade de ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> é observado no peritônio de camundongos com melanoma cutâneo**

Nas análises do percentual de linfócitos B totais foram encontradas diferenças entre o grupo melanoma cutâneo vs melanoma subconjuntival. Para as populações de linfócitos T, células NK e macrófagos não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos avaliados (Figura 4A).

Percentual de linfócitos T CD8 não mostrou diferenças significantes entre os grupos. Entretanto, análises da intensidade de ativação dessas células no grupo melanoma cutâneo mostrou aumento significativo quando comparado com o grupo com melanoma subconjuntival (Figura 4B). Para as populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos B-1 e B-2, células NK, NKT e macrófagos, não foram encontradas diferenças estatísticas quanto ao percentual de células totais ou intensidade de ativação destas células no peritônio dos animais de ambos os grupos (Figura 4B, C e D).



**Figura 4: Linfócitos T CD8 no peritônio apresentaram intensidade de ativação maior em camundongos com melanoma cutâneo quando comparado com melanoma subconjuntival.** A) Colunas representam a média do percentual de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup> e CD23<sup>+</sup>), células NK (CD3<sup>-</sup> e NK1.1<sup>+</sup>), e macrófagos (CD19<sup>-</sup>, CD23<sup>±</sup>, CD11b<sup>+</sup> e F4-80<sup>+</sup>) no peritônio após 14 dias da inoculação de células de melanoma B16F10, na região do dorso (melanoma cutâneo) ou do olho (melanoma subconjuntival). B) Percentuais de células totais e intensidade de ativação (*Median fluorescence intensity* ou MFI de CD69) de: B) linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), células NKT (CD3<sup>+</sup> e NK1.1<sup>+</sup>); C) Linfócitos B-2 (CD19<sup>+</sup> e CD23<sup>+</sup>), linfócitos B-1 (CD19<sup>+</sup> e CD23<sup>-</sup>) e; D) Macrófagos (CD19<sup>-</sup>, CD23<sup>±</sup>, CD11b<sup>+</sup> e F4-80<sup>+</sup>) e células NK (CD3<sup>-</sup> e NK1.1<sup>+</sup>) presentes no peritônio de animais inoculados com células tumorais na região do dorso ou ocular (Melanoma cutâneo e melanoma subconjuntival, respectivamente). Teste estatístico: ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni em A e teste t em B, C e D.

**Aumento da intensidade de ativação de macrófagos é linfócitos T CD8<sup>+</sup> no microambiente tumoral e sua diminuição no linfonodo e peritônio nos animais do grupo melanoma ocular sugere possível migração leucocitária**

Com o intuito de verificar possível migração de leucócitos foi realizada correlação de células leucocitárias no microambiente tumoral do melanoma subconjuntival e melanoma cutâneo com seus respectivos linfonodos e peritônio (Tabela 1). Conforme mostrado na Tabela 1, aumento da intensidade de ativação MFI de macrófagos e linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi observado no microambiente tumoral dos animais do grupo melanoma subconjuntival e diminuição da intensidade de ativação de macrófagos no peritônio e linfócitos T CD8<sup>+</sup> no linfonodo dos animais deste mesmo grupo.

**Tabela 1: Percentual (%) de células e intensidade de ativação (MFI) de leucócitos no microambiente tumoral, linfonodo e peritônio de animais do grupo melanoma ocular e melanoma cutâneo.** Após 14 dias células do tumor, linfonodo e peritônio foram coletadas para análises por citometria de fluxo para determinação dos percentuais de células e mediana da intensidade de fluorescência do marcador de ativação CD69 (MFI CD69) de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), células NKT, linfócitos B (B-1 e B-2), macrófagos (MØ) e células NK. Seta↑ indica aumento, seta↓ indica diminuição. \*p<0,05 e \*\*p<0,01.

%	Melanoma subconjuntival			Melanoma cutâneo		
	Microambiente tumoral	Linfonodo	Peritônio	Microambiente tumoral	Linfonodo	Peritônio
CD4 <sup>+</sup>	0,9	23,3	15,8	0,3	26,9	11
CD8 <sup>+</sup>	1,2	23,2	6,4	0,2	26,4	5,5
NKT	0,1	0,3	0,7	0,1	0,8	0,9
B-1	0,7	4,1	41,9	0,2	3,7	25,1
B-2	0,4	19,5	6,7	0,4	22,6	7,6
MØ	6,4** ↑	0,1	0,7	1,9	0,1	2,3
NK	1	1,1	2,7	0,2	1	4,5

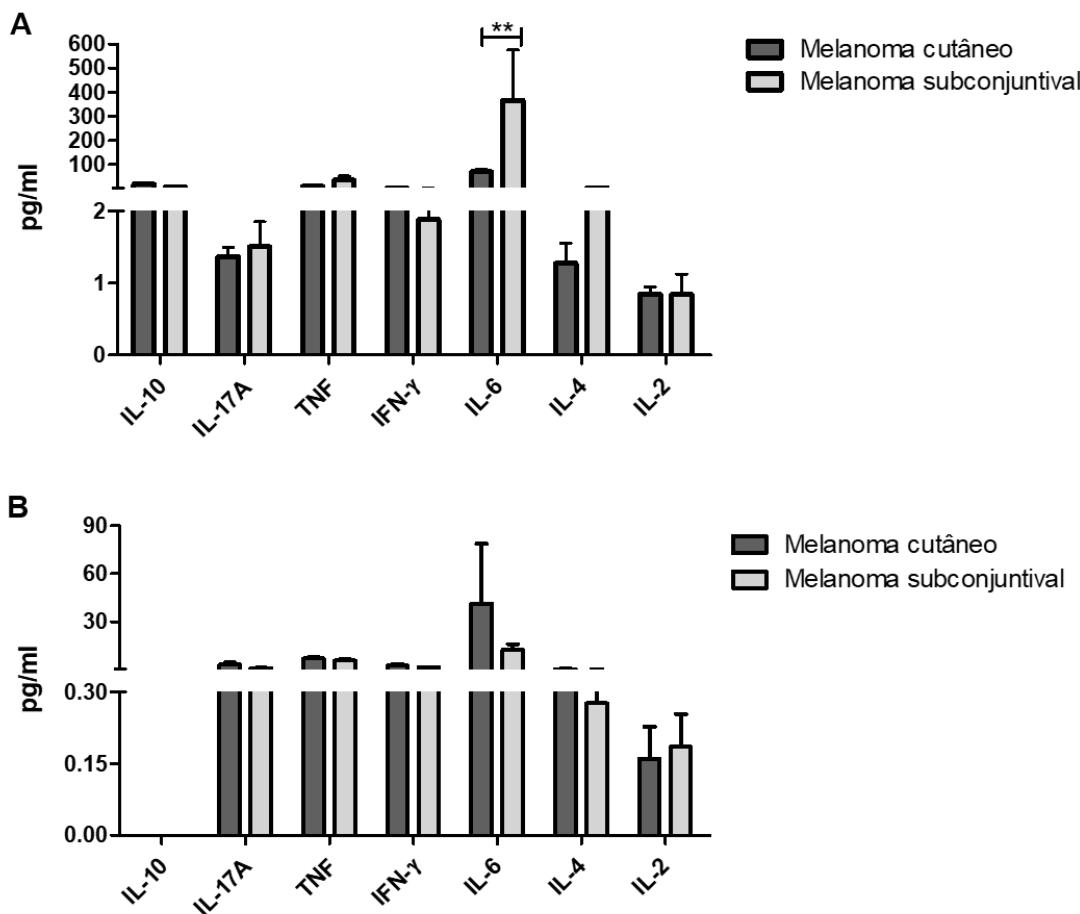
  

MFI CD69 <sup>+</sup>	Melanoma subconjuntival			Melanoma cutâneo		
	Microambiente tumoral	Linfonodo	Peritônio	Microambiente tumoral	Linfonodo	Peritônio
CD4 <sup>+</sup>	373** ↑	145,9	51,8	206	213	58,6
CD8 <sup>+</sup>	246,5** ↑	50,9	35,9* ↓	48,1	107,6	93,9
NKT	449* ↑	175	332,1	226,5	873,3	204
B-1	243	147,7	329,3	101,4	243	369,3
B-2	294,1	146,6	271,6	102,6	185,3	286
MØ	430,5* ↑	224** ↓	260,6	278	512,5	329,6
NK	288,3	276,6	292,3	266	399	388

### **Aumento de interleucina 6 (IL-6) foi observado no microambiente tumoral do melanoma subconjuntival**

A quantificação de citocinas dos perfis Th1, Th2, Th17 presentes no microambiente tumoral e no soro dos grupos estudados foi realizada pela técnica de *cytometric beads array* (CBA), a fim de verificar alterações no perfil da resposta imune mediada pelas citocinas IL-10, IL-17A, TNF, INF- $\gamma$ , IL-6, IL-4 e IL-2 (Figura 5A e B).

Resultados obtidos nas análises do CBA mostraram que animais do grupo melanoma subconjuntival apresentavam níveis elevados de IL-6 no microambiente tumoral quando comparados com os animais do grupo melanoma cutâneo. Níveis de IL-10, IL-17A, TNF, INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-2 foram também detectados no microambiente tumoral dos grupos melanoma cutâneo e melanoma subconjuntival, entretanto não foram observadas diferenças estatísticas ao comparar ambos os grupos (Figura 5A). Em relação aos níveis dessas citocinas no soro, IL-10, IL-17A, TNF, INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-2 foram detectadas em ambos os grupos, porém não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo melanoma cutâneo e o grupo melanoma subconjuntival (Figura 5B).



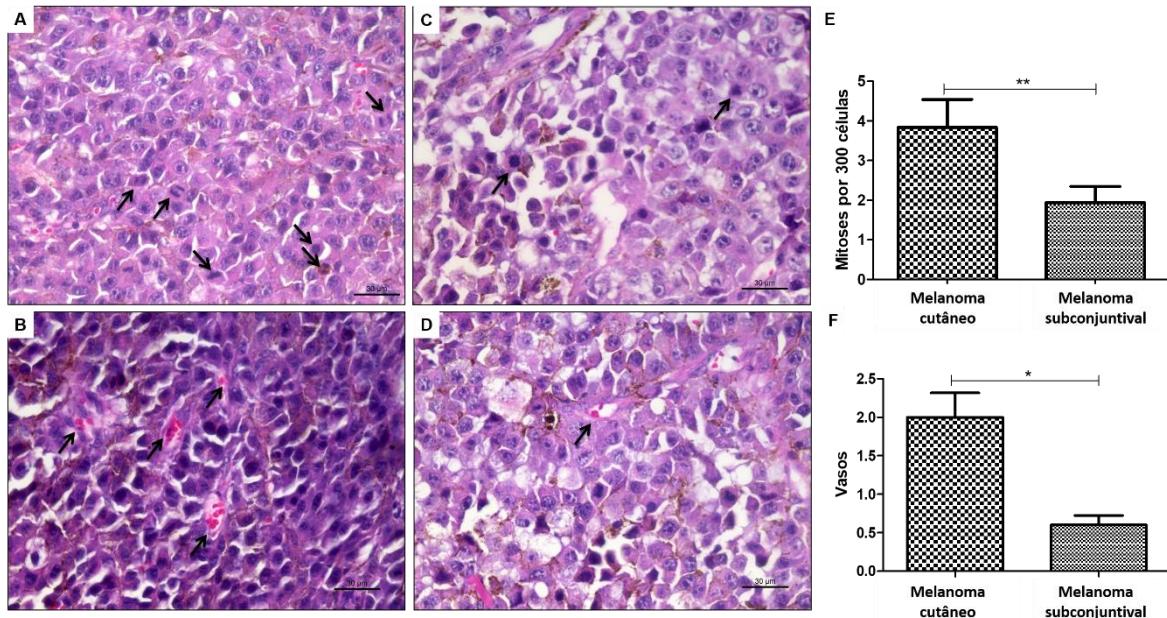
**Figura 5: Quantificação de citocinas dos perfis Th1, Th2, Th17 em animais com melanoma cutâneo e melanoma subconjuntival.** Colunas representam os níveis das citocinas IL-10, IL-17A, TNF, INF- $\gamma$ , IL-6, IL-4 e IL-2 quantificadas no sobrenadante do macerado da massa tumoral (A) e soro (B) de animais inoculados na região subcutânea do dorso direito (melanoma cutâneo) ou na região subconjuntival do olho direito (melanoma subconjuntival). Interleucina (IL), picograma (pg), \*\* p < 0,01. Teste estatístico: ANOVA de duas vias com pós teste Bonferroni em A e B.

#### Aumento de mitoses e de neoangiogênese foi maior no melanoma cutâneo

Para caracterizar o padrão de crescimento das células de melanoma B16F10, tanto no modelo cutâneo como subconjuntival, análises da arquitetura tecidual foram realizadas. De acordo com o observado na Figura 6, células de melanoma B16F10 comumente se ajustam umas às outras mantendo um padrão de crescimento epitelioide e preservando sua arquitetura nos dois modelos. Entretanto, mitoses atípicas foram observadas principalmente no modelo de melanoma subconjuntival (Figura 6A).

Por outro lado, levando em consideração o número de mitoses contadas a cada trezentas (300) células por campo, em cinco campos por amostra, o número de mitoses foi significativamente maior no melanoma cutâneo (Figura 6B e C) quando comparadas com o número de mitoses encontradas no melanoma subconjuntival (Figura 6A e C).

Outro achado importante foi a quantidade de vasos por campos analisados, que se mostraram abundantes nas análises do microambiente tumoral do melanoma cutâneo (Figura 6E e F) quando comparados aos achados nas análises do microambiente tumoral do melanoma subconjuntival (Figura 6D e F).



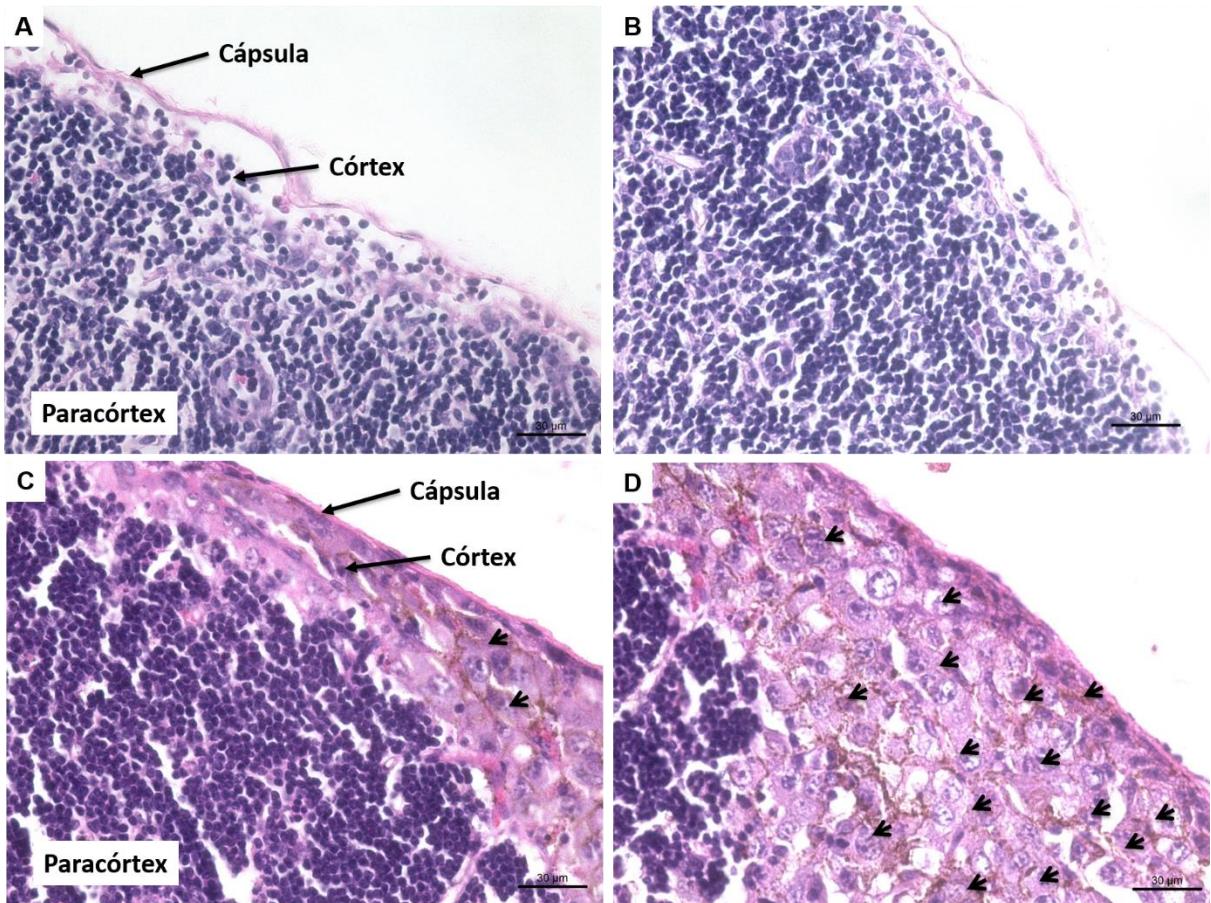
**Figura 6: Número maior de mitoses e neovascularização são predominantes no melanoma de origem cutâneo.** Fotomicrografia de luz de fragmentos de tumor de melanoma de origem cutâneo (A e B) ou subconjuntival (C e D) processados e corados com hematoxilina e eosina (HE). E) Colunas representam o número médio de mitoses avaliadas por campo (5 campos por amostra) em 300 células em 3 lâminas coradas com HE de melanoma cutâneo ou melanoma subconjuntival. F) Colunas representam o número médio de vasos por campo presentes em 3 lâminas coradas com HE de melanoma cutâneo ou melanoma subconjuntival. Barras representam o erro padrão. Setas apontam mitoses em A e C e vasos em B e D. \* p<0,05 e \*\* p<0,01.

#### Maior número de metástases foi observado nos animais com melanoma subconjuntival

As análises macroscópicas dos linfonodos cervicais mostraram tamanhos maiores e sugestiva presença de células tumorais nos animais inoculados na via subconjuntival (melanoma subconjuntival), sugerindo maior capacidade metastática deste tipo de melanoma (Dados não mostrados). Assim, para verificar possíveis alterações nos linfonodos próximos ao local de injeção das células tumorais, no décimo quarto dia após inoculação com células tumorais, os animais foram eutanasiados e os linfonodos foram removidos cirurgicamente para serem processados e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análises histológicas.

As análises histológicas dos linfonodos dos animais com melanoma subconjuntival evidenciam grande quantidade de células tumorais. Estas células

tumorais encontraram-se já colonizando o córtex e alguns locais da paracórtex, formando aglomerado sólido e heterogêneo de células tumorais, caracterizando metástases (Figura 7A). Em contraste, os linfonodos dos animais com melanoma cutâneo não foram encontrados indícios de metástases (Figura 7B).



**Figura 7: Presença marcada de células tumorais no linfonodo na região do córtex é predominante no melanoma ocular.** Fotomicrografia de luz de linfonodo de animais inoculados com células de (A e B) melanoma cutâneo ou (C e D), melanoma subconjuntival. Em B e D foto ampliada. Regiões da capsula, córtex e paracórtex são indicadas. Pontas de seta indicam presença de células tumorais. Imagens capturadas em microscópio digital LEICA DM 1000 com câmera LEICA DFC 420.

## Discussão

Segundo relatos da literatura, o microambiente tumoral é um ambiente complexo que influencia no fenótipo das células tumorais. Entretanto, são escassos os estudos mostrando diferenças no grau de malignidade de uma mesma linhagem

tumoral em diferentes focos primários (Murdoch *et al.*, 2008; Joyce e Pollard, 2009; Denardo *et al.*, 2010; Egeblad *et al.*, 2010; Gajewski *et al.*, 2013; Quail e Joyce, 2013). Por isto, no atual trabalho foi investigado o comportamento do melanoma quando o tumor primário se desenvolve em sítios primários diferentes: cutâneo e subconjuntival.

O presente trabalho mostrou que, apesar da análise de sobrevida não evidenciar diferenças estatísticas entre melanoma cutâneo e subconjuntival, notou-se tendência de morte prematura nos animais desafiados com melanoma subconjuntival. Por outro lado, animais com melanoma cutâneo apresentaram massa tumoral significativamente maior que os animais com melanoma subconjuntival. Além disso, é interessante mencionar que animais com melanoma cutâneo também demonstravam cansaço, letargia, fadiga e dificuldade na locomoção e, consequentemente, na alimentação em comparação com os camundongos com melanoma subconjuntival, que apresentavam mais dinamismo e mobilidade (Dados não mostrados).

Resultados obtidos nas análises por citometria de fluxo dos fragmentos tumorais mostraram aumento da população total de linfócitos T e macrófagos no microambiente do melanoma subconjuntival quando comparado com o melanoma cutâneo. Além disso, foi observado aumento no percentual e intensidade de ativação de macrófagos e, aumento da intensidade de ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e células NKT no microambiente tumoral em animais com melanoma subconjuntival quando comparado aos dados do microambiente tumoral dos animais com melanoma cutâneo. Em contraste, animais com melanoma cutâneo mostraram aumento significativo somente no percentual e intensidade de ativação (MFI da expressão de CD69) de macrófagos no linfonodo e aumento do percentual de ativação e intensidade de ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no peritônio.

Dentro deste contexto, a hipótese de que o aumento da ativação de macrófagos e de células T nos animais com melanoma na região subconjuntival poderia estar associado ao desenvolvimento de uma resposta imunológica eficaz contra as células tumorais devido a apresentarem tumores de menor tamanho. Isto justificado porque macrófagos são os maiores componentes do microambiente tumoral e são considerados importantes reguladores da tumorigênese por

desempenhar papéis efetores durante a resposta contra o desenvolvimento dos tumores (Carvalho *et al.*, 2015). Além disso, aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> pode estar associado às tentativas do sistema imune de controlar o aumento do tumor via resposta Th1 (Ramanathan *et al.*, 2014).

A resposta Th1 tem sido descrita como favorável à eliminação de tumores por promover a ativação de células citotóxicas NK, NKT, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e ativação dos macrófagos pela via clássica (IFN- $\gamma$ ) (Allavena e Mantovani, 2012; Haabeth *et al.*, 2014). Como a principal função das células T CD8<sup>+</sup> e células NKT ativadas, eliminar células alteradas, seja por vírus ou por outros fatores, a presença destas células citotóxicas no microambiente do tumor pode estar associada a uma resposta antitumoral eficiente. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células NK, quando ativados, produzem grande quantidade de citocinas, como IFN- $\gamma$  e outras moléculas efetoras, como perforinas e granzimas, favorecendo assim as funções citotóxicas (Carvalho *et al.*, 2015).

Embora os resultados das análises do microambiente tumoral, obtidas por citometria de fluxo, dos animais com melanoma subconjuntival tenham apresentado um perfil imunológico compatível com uma resposta antitumoral, na quantificação de mediadores dos perfis Th1, Th2, Th17 foi mostrado que os animais deste grupo apresentam níveis elevados de interleucina 6 (IL-6) no microambiente tumoral quando comparados com os animais do grupo melanoma cutâneo.

A IL-6 é uma citocina imunomoduladora pleiotrópica, produzida por vários tipos de células, como monócitos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e células tumorais, como exemplo, células de melanoma (Hoejberg, Bastholt e Schmidt, 2012). A IL-6 atua em células tumorais por ativação de vias de sinalização mediadoras de proliferação, sobrevida e disseminação metastática (Hoejberg, Bastholt e Schmidt, 2012; Linnskog *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Além disso, a IL-6 pode atuar em outras células dentro do microambiente tumoral, para sustentar um ambiente pró-tumoral, favorecendo a angiogênese e a evasão tumoral da vigilância imunológica. A IL-6 apresenta-se desregulada em muitos tipos de câncer, e o aumento da concentração sérica de IL-6 tem sido correlacionado com mau prognóstico em pacientes com melanoma (Hoejberg, Bastholt, Johansen, *et al.*, 2012; Hoejberg, Bastholt e Schmidt, 2012; Fisher *et al.*,

2014; Linnskog *et al.*, 2016). Em resumo, a IL-6 desempenha um papel crucial na patogenicidade e malignidade do câncer ao promover crescimento tumoral por inibição da apoptose, indução da angiogênese e formação de metástases (Hoejberg, Bastholt, Johansen, *et al.*, 2012; Linnskog *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Nas análises histológicas dos linfonodos ipsilateral destes animais, foi evidenciada presença de metástases, grande quantidade de células tumorais colonizando o córtex e em alguns casos o paracórtex dos linfonodos cervicais em animais com melanoma subconjuntival. Ao inverso, animais com melanoma cutâneo não apresentaram indícios da presença de células tumorais nos linfonodos próximos ao sítio de desenvolvimento do tumor. Isto sugere que melanomas subconjuntivais, mesmo apresentando um perfil imunológico antitumoral, pode possuir maior capacidade metastática do que os melanomas cutâneos, sendo os linfonodos cervicais os alvos de eleição para as metástases iniciais dos melanomas subconjuntivais. Outra possível explicação da presença de células tumorais nestes locais pode ser devido à localização anatômica privilegiada dos linfonodos cervicais em relação ao melanoma subconjuntival ou a outros tumores que acometem esta região. É bom ressaltar que o padrão de acometimento dos linfonodos regionais segue as vias naturais de drenagem, e que em alguns casos mesmo que por tempo limitado, os linfonodos regionais podem atuar como barreiras eficazes contra a disseminação posterior do tumor (Ferris *et al.*, 2012; Ji, 2016).

Por outro lado, segundo Amend e Pienta (2015), os fatores críticos que influenciam a formação de metástases são as pressões que o microambiente exerce sobre a célula tumoral. Esta pressão inclui outras células e elementos que compõem o microambiente tumoral e a reação individual das células tumorais às pressões exercidas pelo microambiente.

Outro fator que pode ter contribuído com a presença de células tumorais nos linfonodos cervicais, foi a grande quantidade de macrófagos no microambiente tumoral. Estudos mostram que estes macrófagos associados ao tumor (TAMs) cujo perfil é, em geral, imunossupressor (M2) podem favorecer progressão tumoral (Carvalho *et al.*, 2015).

Por outro lado, em relação a alterações histológicas, as células de melanoma são comumente atípicas em tamanho, com membrana nuclear irregular, cromatina hiperchromática e nucléolos proeminentes que tendem a ser irregulares em forma, tamanho e número. Essas células crescem como ninhos malformados em todos os níveis da epiderme e na derme. Esse padrão de crescimento foi observado tanto no modelo de melanoma ocular quanto no modelo de melanoma cutâneo.

Outro achado importante do atual trabalho foi a grande quantidade de mitoses atípicas no microambiente dos animais com melanoma ocular. Mitose é um processo contínuo de divisão celular que compreende quatro fases básicas, a prófase, a metáfase, a anáfase e a telófase. Alguns autores costumam citar uma quinta fase, a prometáfase, que é intermediária da prófase a metáfase. Já a citocinese corresponde ao final da mitose com a separação do citoplasma. Células de melanoma são células de crescimento acelerado, portanto, ao décimo quarto dia de inoculação das células tumorais é possível observar grande número de mitoses nos cortes histológicos. Entretanto, maior quantidade de mitose levando em consideração o número de mitoses típicas e atípicas, foi observada em animais com melanoma cutâneo.

Adicionalmente observamos nos cortes histológicos que os animais com melanoma cutâneo apresentaram maior quantidades de vasos por campo quando comparado com os animais com melanoma subconjuntival. Estes resultados são aceitáveis, levando em consideração que os animais com melanoma cutâneo tiveram uma massa tumoral significativamente superior aos animais com melanoma subconjuntival, espera- se que os animais com melanoma cutâneo tivessem um número de mitoses superior e consequentemente um maior número de vasos, ressaltando que nem sempre o número de mitoses e vasos alto seja indicativo de maior agressividade tumoral.

Ao todo, os resultados aqui mostrados revelam indícios que o melanoma subconjuntival apresenta maior agressividade quando comparado ao melanoma cutâneo. Portanto estes dados sugerem que o local de desenvolvimento do melanoma é também uma característica importante para determinar o grau de malignidade do tumor.

## Conclusões

Presença de metástases no melanoma subconjuntival foi provavelmente a altos níveis de IL6 no microambiente tumoral. Em conjunto, os dados aqui apresentados sugerem que o local primário de desenvolvimento do tumor influencia no fenótipo e padrão de comportamento das células tumorais.

## 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*, v. 167, n. 2, p. 195-205, Feb 2012. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22235995> >.
- AMEND, S. R.; PIENTA, K. J. Ecology meets cancer biology: the cancer swamp promotes the lethal cancer phenotype. *Oncotarget*, v. 6, n. 12, p. 9669-78, 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25895024> >.
- BRANDNER, J. M.; HAASS, N. K. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology*, v. 45, n. 5, p. 443-52, Aug 2013. ISSN 1465-3931. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23851614> >.
- CARVALHO, J. R. et al. Papel do microambiente tumoral no desenvolvimento do Melanoma. *Veterinária Notícias*, Uberlândia, v. 21, p. 39-49, 2015. ISSN 1983-0777.
- DE LORENZO, B. H. et al. Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. *Immunol Lett*, v. 114, n. 2, p. 110-8, Dec 2007. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18022249> >.
- DENARDO, 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. 309-16, Jun 2010. ISSN 1573-7233. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20405169> >.
- 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, Jan 2010. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20146707> >.
- EGEGLAD, 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, Jun 2010. ISSN 1878-1551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627072> >.
- FERRIS, R. L. et al. Lymphatics, lymph nodes and the immune system: barriers and gateways for cancer spread. *Clin Exp Metastasis*, v. 29, n. 7, p. 729-36, Oct 2012. ISSN 1573-7276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22851005> >.

FINK, C.; HAENSSLE, H. A. Non-invasive tools for the diagnosis of cutaneous melanoma. **Skin Res Technol**, Nov 2016. ISSN 1600-0846. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27878858> >.

FISHER, D. T.; APPENHEIMER, M. M.; EVANS, S. S. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. **Semin Immunol**, v. 26, n. 1, p. 38-47, Feb 2014. ISSN 1096-3618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24602448> >.

GAJEWSKI, T. F.; SCHREIBER, H.; FU, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 1014-22, Oct 2013. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048123> >.

GRIN, J. M. et al. Ocular melanomas and melanocytic lesions of the eye. **J Am Acad Dermatol**, v. 38, n. 5 Pt 1, p. 716-30, May 1998. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9591817> >.

HAABETH, O. A. et al. 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. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782871> >.

HAASS, N. K. et al. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res**, v. 18, n. 3, p. 150-9, Jun 2005. ISSN 0893-5785. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15892711> >.

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. 450-6, Apr 1986. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3084283> >.

HAYAKAWA, K. et al. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 8, p. 2494-8, Apr 1984. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6609363> >.

\_\_\_\_\_. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice. **J Exp Med**, v. 157, n. 1, p. 202-18, Jan 1983. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6600267> >.

HOEJBERG, L. et al. Serum interleukin-6 as a prognostic biomarker in patients with metastatic melanoma. **Melanoma Res**, v. 22, n. 4, p. 287-93, Aug 2012. ISSN 1473-5636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22617301> >.

HOEJBERG, L.; BASTHOLT, L.; SCHMIDT, H. Interleukin-6 and melanoma. **Melanoma Res**, v. 22, n. 5, p. 327-33, Oct 2012. ISSN 1473-5636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22713796> >.

HURST, E. A.; HARBOUR, J. W.; CORNELIUS, L. A. Ocular melanoma: a review and the relationship to cutaneous melanoma. **Arch Dermatol**, v. 139, n. 8, p. 1067-73, Aug 2003. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925397> >.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; INCA; 2015. 122 p. ilus, tab.

JI, R. C. Lymph Nodes and Cancer Metastasis: New Perspectives on the Role of Intranodal Lymphatic Sinuses. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 1, Dec 2016. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28036019> >.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239-52, Apr 2009. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279573> >.

LENGAGNE, R. 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**, v. 6, n. 5, p. e20235, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633700> >.

LINNSKOG, R. et al. Demonstration of a WNT5A-IL-6 positive feedback loop in melanoma cells: Dual interference of this loop more effectively impairs melanoma cell invasion. **Oncotarget**, v. 7, n. 25, p. 37790-37802, Jun 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27191257> >.

MURDOCH, C. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 8, p. 618-31, Aug 2008. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633355> >.

NGUYEN, D. X.; MASSAGUÉ, J. Genetic determinants of cancer metastasis. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 5, p. 341-52, May 2007. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17440531> >.

NGUYEN, N. et al. Understanding melanoma stem cells. **Melanoma Manag**, v. 2, n. 2, p. 179-188, 2015 2015. ISSN 2045-0885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26594315> >.

NOGUEIRA-MARTINS, M. F.; MARIANO, M. B-1 cell participation in T-cell-mediated alloimmune response. **Immunobiology**, v. 215, n. 4, p. 264-74, Apr 2010. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19581018> >.

O'GARRA, A. et al. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 3, p. 711-7, Mar 1992. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1547817> >.

OLIVEIRA, H. C. et al. B-1 cells modulate the kinetics of wound-healing process in mice. **Immunobiology**, v. 215, n. 3, p. 215-22, Mar 2010. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19457571> >.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1423-37, Nov 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24202395> >.

RAMANATHAN, P. et al. 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**, v. 75, n. 12, p. 1216-24, Dec 2014. ISSN 1879-1166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25315748> >.

ROGERS, T. L.; HOLEN, I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. **J Transl Med**, v. 9, p. 177, 2011. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22005011> >.

SHIELDS, C. L. Conjunctival melanoma: risk factors for recurrence, exenteration, metastasis, and death in 150 consecutive patients. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v. 98, p. 471-92, 2000. ISSN 0065-9533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11190037> >.

SPANO, D.; ZOLLO, M. Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. **Clin Exp Metastasis**, v. 29, n. 4, p. 381-95, Apr 2012. ISSN 1573-7276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22322279> >.

TAWBI, H. A.; KIRKWOOD, J. M. Management of metastatic melanoma. **Semin Oncol**, v. 34, n. 6, p. 532-45, Dec 2007. ISSN 0093-7754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083377> >.

UGUREL, S. et al. Impact of the CCR5 gene polymorphism on the survival of metastatic melanoma patients receiving immunotherapy. **Cancer Immunol Immunother**, v. 57, n. 5, p. 685-91, May 2008. ISSN 0340-7004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17909797> >.

VARRICCHI, G. et al. Controversial role of mast cells in skin cancers. **Exp Dermatol**, Jun 2016. ISSN 1600-0625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27305467> >.

VIGNA, A. F. et al. 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. 61-6, Aug 2002. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12057856> >.

WETZEL, K. et al. 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. 120, n. 6, p. 1364-71, Mar 2007. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17154174> >.

ZHANG, C. et al. CD5 Binds to Interleukin-6 and Induces a Feed-Forward Loop with the Transcription Factor STAT3 in B Cells to Promote Cancer. **Immunity**, v. 44, n. 4, p. 913-923, Apr 2016. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27096320> >.

\_\_\_\_\_. Transforming growth factor-beta2 is a molecular determinant for site-specific melanoma metastasis in the brain. **Cancer Res**, v. 69, n. 3, p. 828-35, Feb 2009. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19141644> >.

## 2.2. Melanoma na literatura científica: uma meta-análise

José Renildo de Carvalho<sup>1</sup>, Vanessa Xavier<sup>1</sup>, Thiago Albuquerque Viração<sup>1</sup>, Débora Mares Silvestro<sup>1</sup>, Maria Anete Lallo<sup>1</sup>, Elizabeth Cristina Pérez Hurtado<sup>1</sup>

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

### Resumo

Melanomas são neoplasias malignas que se desenvolvem a partir de melanócitos encontrados na pele, olhos, mucosas e epitélio da leptomeninge. Embora o melanoma cutâneo seja o mais frequente na população mundial, outros melanomas como, o ocular e o de mucosas também têm aumentado sua incidência nos últimos anos. Com tudo, apesar do grande número de trabalhos utilizando como modelo de estudo o melanoma, ainda existem muitas questões em relação ao tema. Assim, com o intuito de determinar assuntos negligenciados sobre este câncer, a presente meta-análise tem como objetivo avaliar a evolução das pesquisas em relação ao melanoma, tomando como referência 300 trabalhos publicados no mês de maio de 2017. Resultados apresentados aqui mostram que o melanoma cutâneo é o mais citado (72,7%) dos trabalhos consultados. Estes trabalhos mostraram que Europa e América do Norte lideram tanto as pesquisas (37% e 32%) como as publicações (54% e 41%) respectivamente, em relação ao tema. A maioria desses trabalhos são estudos originais (88%) que descrevem ensaios realizados com seres humanos (77%), dos quais são principalmente ensaios clínicos e não experimentais (64,6% e 35,4%, respectivamente). Dentre os trabalhos originais 11% avaliam a participação do microambiente tumoral no desenvolvimento e progressão do melanoma. Este achado revela que apesar do crescimento exponencial de publicações em relação ao melanoma, novas pesquisas abordando o tema do microambiente tumoral são necessárias para contribuir na compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão desta neoplasia que tantas mortes causa a cada ano.

**Palavras-chave:** Melanoma cutâneo, melanoma ocular, melanoma de mucosas, meta-análises, microambiente tumoral.

## Introdução

O câncer de pele é o tumor mais incidente na população brasileira, com estimativas aproximadas de 81.000 e 95.000 em homens e em mulheres, respectivamente (INCA 2015). Entre os tumores de pele, o carcinoma basocelular e o carcinoma de células escamosas, englobados no termo câncer de pele não melanoma, são os mais comuns entre as populações de pele clara. Estes tumores apresentam baixas taxas de mortalidade e, em geral, são facilmente tratados com cirurgia e/ou terapias fotodinâmicas ou imunomoduladoras, que oferecem excelentes percentuais de cura (Di Stefani *et al.*, 2017).

Em contraste, o câncer de pele tipo melanoma, apesar de pouco comum e com estimativas de 5.670 casos novos/ano no Brasil (INCA 2015), possui taxa alta de mortalidade devido à sua capacidade metastática e resistência à maioria dos tratamentos convencionais (Gutiérrez García-Rodrigo *et al.*, 2017; Satheesha *et al.*, 2017). Melanomas são neoplasias malignas que se desenvolvem a partir de melanócitos encontrados na pele, olhos, mucosas e epitélio da leptomeninge. Apesar de o melanoma cutâneo ser o mais frequente na população mundial, outros melanomas como o ocular e o de mucosas têm aumentado sua incidência nos últimos anos (Nguyen *et al.*, 2015; Fink e Haenssle, 2016).

O melanoma cutâneo é um câncer de pele (Haass *et al.*, 2005), predominante em adultos brancos que representa cerca de 4% de todas as neoplasias malignas deste órgão (Maire *et al.*, 2014). Já o melanoma ocular compreende menos de 5% de todos os melanomas. É considerado o câncer de olho mais comum em adultos, cuja origem pode ser no trato uveal intraocular (melanoma uveal) ou conjuntiva extraocular (melanoma conjuntival) (Bosch e Heindl, 2017; Mahendaraj *et al.*, 2017). O melanoma uveal é o subtipo mais comum de melanoma ocular, enquanto o melanoma conjuntival é raro (Mahendaraj *et al.*, 2017; Vora *et al.*, 2017). Embora o tumor primário no melanoma ocular possa ser tratado com eficácia, o prognóstico dos pacientes com metástase permanece incerto (Bosch e Heindl, 2017; Mahendaraj *et al.*, 2017).

O melanoma de mucosas é um tipo raro e agressivo que representa apenas 1,2% dos casos de melanoma. Os locais primários de desenvolvimento incluem vulva, reto/ânus, cavidade nasal e vagina. Os melanomas de mucosa são

singularmente diferentes do melanoma cutâneo com relação à epidemiologia, etiologia, patogênese e prognóstico (Kirchoff *et al.*, 2016; Spencer e Mehnert, 2016).

Em geral, o melanoma é um tumor maligno agressivo com incidência crescente na maioria dos países. Isto devido a sua alta capacidade de formar metástases as quais são consideradas, na maioria dos casos, de mau prognóstico ou de evolução incerta (Bosch e Heindl, 2017; Mahendaraj *et al.*, 2017). Diversos fatores intrínsecos e ambientais influenciam o risco individual de desenvolver melanoma. Fatores intrínsecos cruciais são os fatores relacionados com a genética, como o grau de pigmentação da pele (cor da pele) ou, menos frequentemente, mutações em genes supressores de tumores como: CDKN2A, CDK4 (Pho *et al.*, 2006; Motokawa *et al.*, 2007). Entre os fatores de risco ambiental, a exposição aos raios ultravioleta (UV) continua sendo o mais importante (Guan, 2015; Affolter e Hess, 2016; Sun *et al.*, 2016; Ombra *et al.*, 2017).

Além destes fatores, interações das células neoplásicas com células não tumorais presentes no microambiente onde o tumor se desenvolve são também determinantes para o crescimento e progressão do melanoma (Haass *et al.*, 2005; Tawbi e Kirkwood, 2007; Brandner e Haass, 2013; Carvalho *et al.*, 2015). Entretanto apesar da sua importância, na literatura atual são poucos os trabalhos abordando este assunto.

Assim, o intuito da presente meta-análise foi determinar a evolução das pesquisas em relação ao melanoma, mapeando o tipo de publicações e suas abordagens a fim de detectar assuntos negligenciados que possam ser alvo de novas pesquisas neste campo de estudo.

## **Material e métodos**

O trabalho comprehende artigos publicados até 24 de novembro de 2017 e artigos publicados nos últimos 10 anos (2008 a 2017), referenciando particularmente 300 artigos publicados no mês de maio de 2017 (25/04/2017 a 30/05/2017) na base de dados PubMed (*Publisher Medline, Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Como palavras-chave foram utilizados os termos melanoma, melanoma ocular e melanoma cutâneo.

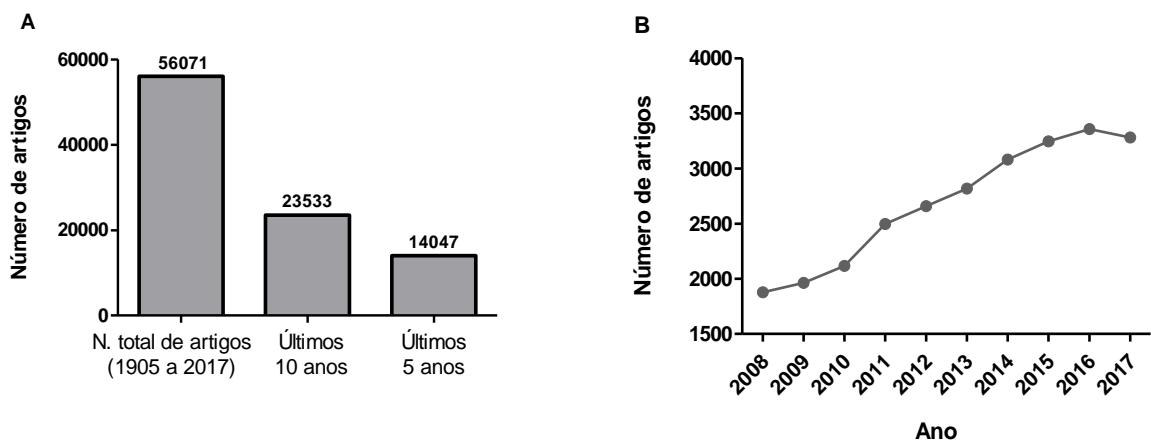
Como critérios de exclusão foram considerados os artigos que possuírem no título a palavra no-melanoma e artigos em geral sem acesso ao seu resumo.

Todos os artigos selecionados foram analisados e classificados quanto ao tipo de melanoma: pele, olho ou mucosa; continente em que o estudo foi realizado; local da publicação; modelo utilizado no estudo: humano ou animal; tipo de estudo: clínico, *in vivo* ou *in vitro*; espécie de animal utilizada; tipo de publicação: artigo original, revisão ou meta-análises e tema abordado nos estudos originais.

## Resultados

### Publicações com melanoma crescem a cada ano

Nos últimos dez anos pesquisas em melanoma vêm aumentando a cada ano (Figura 1A e B). Para 2017 espera-se que as publicações com o melanoma ultrapassem as do ano 2016, uma vez que o número de publicações está bem próximo ao total de publicadas em 2016 (Figura 1B)



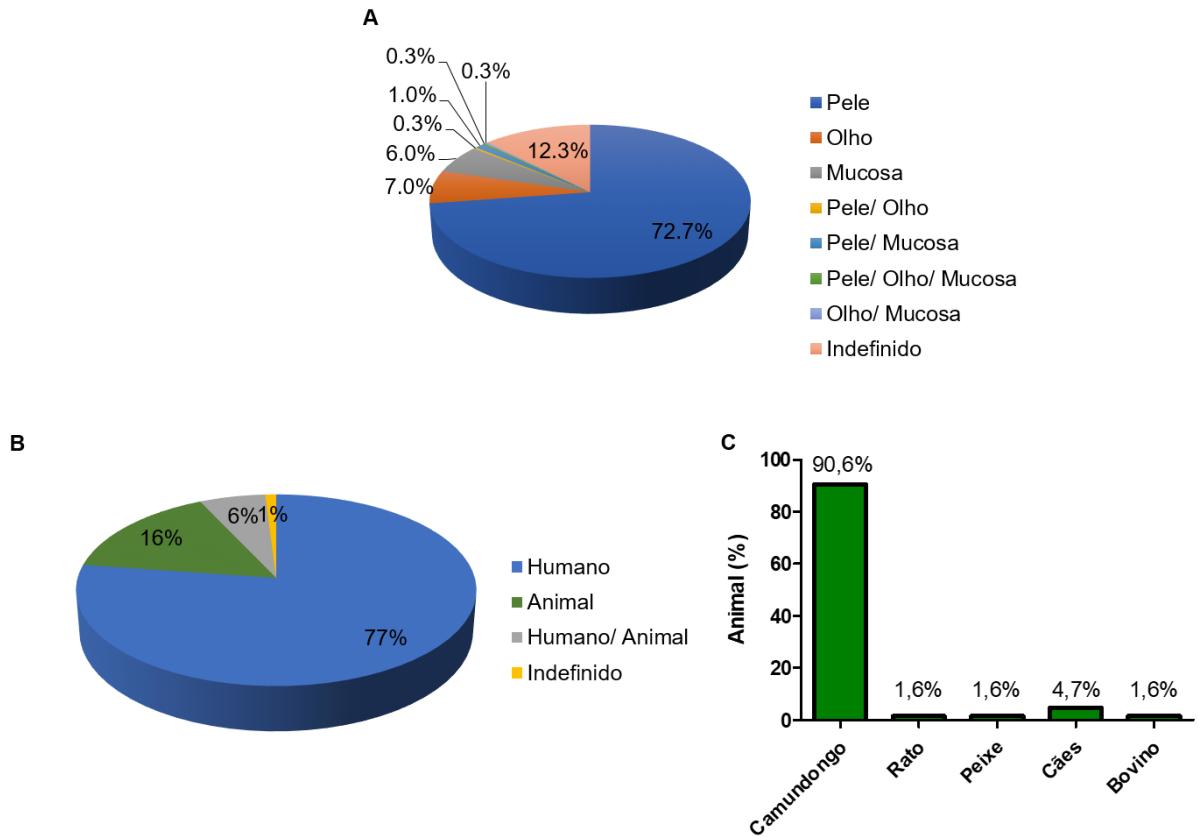
**Figura 1. Evolução das publicações com melanoma nos últimos 10 anos.** Considerando a palavra-chave melanoma na base de dados PubMed, publicações obtidas da busca foram agrupadas de acordo com: A) número total de artigos e nos últimos 10 e 5 anos e, B) a cada ano nos últimos 10 anos (janeiro de 2008 a novembro de 2017).

Para determinar os temas abordados e detectar assuntos negligenciados em relação ao melanoma, foram escolhidos 300 artigos publicados no ano de 2017. Estes artigos foram publicados em sua totalidade entre 25/04/2017 a 30/05/2017.

### **Melanoma cutâneo foi o mais frequentemente abordado nos estudos**

Das 300 publicações avaliadas a grande maioria corresponde a melanoma de pele (72,7%), seguido de melanoma ocular (7%) e melanoma de mucosa (6%). 12,3% dos artigos não foi possível classificar em nenhum grupo por serem em geral revisões e/ou meta-análise e retratarem 2 ou os 3 tipos de melanomas. Em contraste, 1,9% das publicações combinavam múltiplos tipos de melanoma (Figura 2A).

77% das publicações consultadas mostram resultados obtidos em modelos de melanoma em humanos: estudos clínicos, relato de casos, levantamento de dados a partir de prontuários, estudo populacional e estudos com linhagens celulares de origem humana. Pesquisas utilizando animais de experimentação ou células de origem animal corresponderam a 16% dos artigos consultados. Já em 6% dos trabalhos foram utilizados os dois modelos: humano e animal; em 1% dos trabalhos não foi possível caracterizar o modelo de estudo utilizado (Figura 2B). Em relação aos trabalhos que utilizaram modelo animal (16%), 90,6% foram desenvolvidos em camundongos, 4,7% em cães, 1,6% em peixes, 1,6% em bovinos e, 1,6% em ratos (Figura 2C).



**Figura 2: Origem do modelo de estudo.** Considerando 300 artigos publicados no período de 25/04/2017 a 30/05/2017 na base de dados PubMed foram classificados de acordo com: A) o local de desenvolvimento do tumor primário: pele, olho, mucosa, pele/olho, pele/olho/mucosas, olho/mucosa, indefinido, B) a origem do modelo estudo: humano, animal, ambos ou indefinido, e C) tipo de espécie animal utilizada nos estudos; camundongo, rato, peixe, cães, bovino.

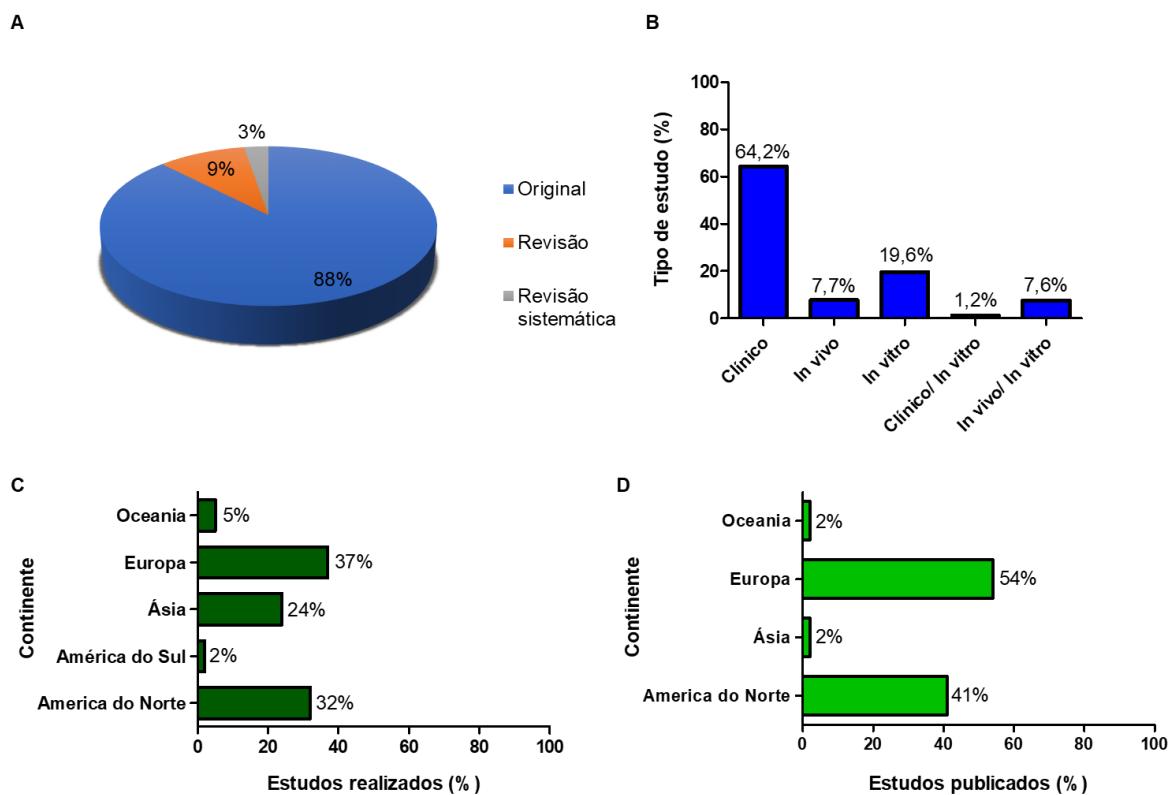
### **Pesquisas com melanoma são em geral estudos clínicos realizados em instituições localizadas no continente Europeu**

Com base no tipo de estudo realizado, das 300 publicações do melanoma 88% correspondem a artigos originais seja: pesquisa experimental, estudo clínico, relato de caso, levantamento de dados a partir de prontuários ou estudo populacional. Revisões bibliográficas correspondem a 9% dos estudos e 3% são revisões sistemáticas (Figura 3A).

Considerando só os artigos originais, 64,2% foram estudos clínicos que avaliam principalmente novos protocolos terapêuticos, também incluem relato de casos ou levantamento de dados de prontuários. A utilização de animais em

modelos *in vivo* correspondeu a 7,7% das publicações; 19,6% utilizaram técnicas *in vitro*, nas quais o principal material utilizado foram células de linhagem humana ou animal. Estudos combinando estudos clínicos e ensaios *in vitro* correspondem a 1,2% e 7,3% combinaram técnicas *in vivo* com animais e *in vitro* com células de origens diferentes (Figura 3B).

Com o intuito de verificar quais locais de pesquisa se concentrava a maioria dos estudos, o país de filiação do 1º autor de cada estudo foi determinado. Dos 300 artigos 37,1% foram realizados no continente Europeu, 31,8% América do Norte, 24,1% Ásia, 5% Oceania e 2% América do Sul (Figura 3C). Consequentemente, estes artigos foram publicados na grande maioria em periódicos de origem europeia (54,4%), 41,3% em periódicos da América do Norte, 2,3% em Ásia e 2% em Oceania (Figura 3D).



**Figura 3: Tipo de estudo e continente de origem das publicações.** Publicações no período de 25/04/2017 a 30/05/2017 na base de dados PubMed referentes ao melanoma classificadas por: A) Tipo de publicação: artigo original, revisão, revisão sistematizada ou meta-análise; B) tipo de estudo:

clínico, *in vivo*, *in vitro*, clínico/*in vitro*, *in vivo/in vitro*; C) continente da filiação do primeiro autor do trabalho e; D) continente de publicação.

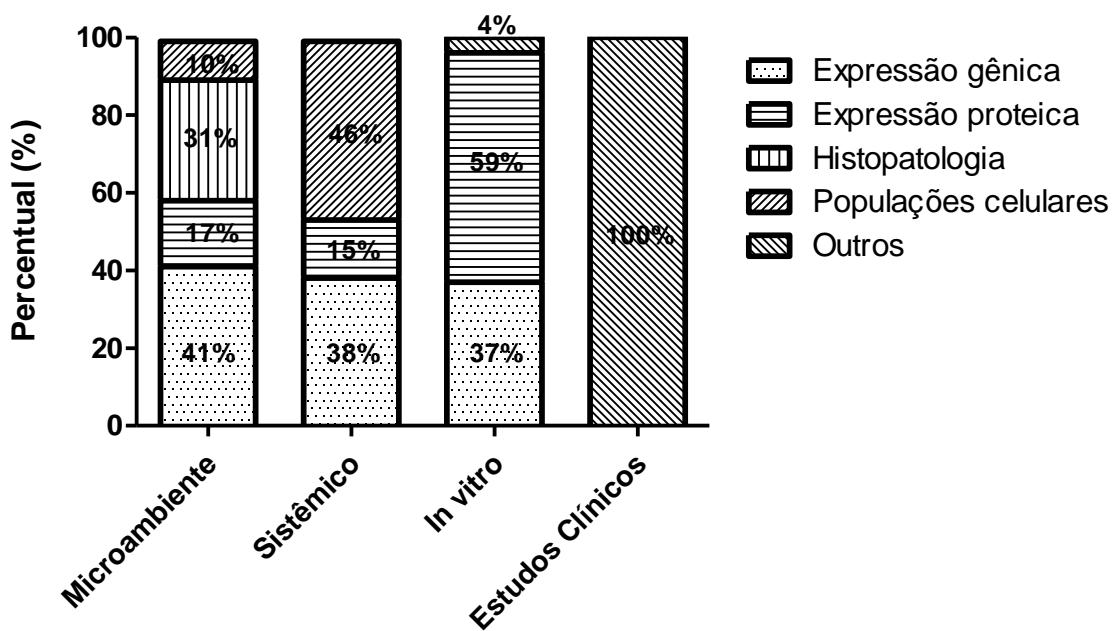
### **O microambiente tumoral foi ainda pouco abordado nas publicações com melanoma**

A fim de determinar os assuntos mais comumente abordados na literatura referente ao melanoma, os 300 artigos selecionados publicados no período de 25/04/2017 a 30/05/2017 foram classificadas de acordo com o tema de estudo. Uma percentagem de 64,6% dos estudos originais (88% das 300 publicações avaliadas) corresponde basicamente a estudos clínicos que incluem avaliações com diagnóstico por imagem, fatores de riscos para o desenvolvimento do melanoma, avaliação de técnicas alternativas para o tratamento, avaliação de imunoterapia, testes de novos medicamentos ou técnicas no tratamento do melanoma (Figura 4).

Em contraste, somente 11% dos trabalhos originais avaliaram microambiente tumoral, destes 4,6% avaliaram a expressão gênica, 1,9% expressão proteica (proteômica), 3,4% histopatológico (principalmente imuno-histoquímica) das células tumorais e só 1,1% estudaram as populações leucocitárias presentes no microambiente (Figura 4).

Por outro lado, 4,9% dos trabalhos avaliaram alterações a nível sistêmico ao estudar fluidos biológicos como sangue e urina. Destas alterações 1,9% foram avaliadas com ensaios de expressão gênica, 0,8% expressão proteica e 2,3% avaliaram as populações celulares presentes nestes locais fora do microambiente onde o tumor se desenvolve (Figura 4).

Em paralelo, os estudos *in vitro* representaram 19,4% dos trabalhos originais. Estes estudos correspondem a 7,2% expressão gênica, 11,4% expressão proteica e 0,8% outras avaliações.



**Figura 4: Assuntos abordados nas publicações de melanoma.** Porcentagem dos temas de estudo abordados nos artigos originais: avaliação de alterações dentro do microambiente tumoral, a nível sistêmico, ensaios *in vitro* ou estudos clínicos. Subdivisões nas colunas correspondem as técnicas utilizadas para determinar as alterações em cada assunto; expressão gênica, proteômica, análises histopatológicas, determinação de populações celulares, outros.

## Discussão

O primeiro estudo em melanoma publicado na base de dados PubMed data de 1905. Trata-se de um estudo de caso de melanoma ocular, realizado por De Schweinitz e Shumway feito e publicado nos Estados Unidos da América no periódico *Transactions of the American Ophthalmological Society* (De Schweinitz e Shumway, 1905).

Até a data de 24 de novembro de 2017 foram quantificados 56071 estudos com melanomas publicados na base de dados Pubmed. Destes estudos, 41,9% ( $\pm 23535$ ) foram publicados nos últimos 10 anos, e destes artigos 59,7% ( $\pm 14047$ ) foram publicados apenas nos últimos 5 anos, o que mostra que os estudos em melanoma têm aumentado progressivamente,  $\pm 7,6\%$  ao ano. Esse aumento nos estudos pode estar relacionado diretamente ao aumento do número de casos de melanoma na população mundial os quais aumentaram cerca de 9,5% ao ano nos últimos 10 anos (Higgins *et al.*, 2015; Cohen, 2017).

Apesar do crescente número de trabalhos utilizando como modelo de estudo o melanoma, ainda existem muitas questões em relação ao tema. Para determinar a evolução das pesquisas, detectar assuntos negligenciados que possam ser alvo de novas pesquisas. Dos artigos selecionados, o melanoma cutâneo ou de pele foi relatado em 72,7% das publicações, o ocular em 7% e o de mucosas em 6%. Estes achados corroboram com os dados de prevalência do melanoma na população mundial, onde o melanoma cutâneo é o mais frequente seguido pelo melanoma da região ocular e melanoma de mucosas (Maire *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2015; Fink e Haenssle, 2016; Kirchoff *et al.*, 2016; Bosch e Heindl, 2017; Mahendaraj *et al.*, 2017).

A maioria dos estudos em melanoma, 77% foi realizado com humanos, sendo a grande maioria estudos clínicos (Tratamento e relato de caso), o que pode estar associado com o aumento de novos casos a cada ano. Por outro lado, estudos utilizando modelos animais representam apenas 16% dos artigos. É interessante notar que dos estudos com animais, 96% utilizaram camundongos como modelo experimental. Este achado sugere que estudos em camundongos são os modelos de eleição devido principalmente ao fácil manejo, biologia e genoma conhecidos e, manutenção de baixo custo em relação a outros animais de experimentação. Isto somado à similaridade das respostas desta espécie aquelas apresentadas em humanos, o que faz desta espécie um bom modelo animal para a experimentação.

Outro fator interessante neste estudo é relativo ao continente onde são realizadas ou publicadas as pesquisas na área de melanoma. Este estudo mostra que das 300 publicações selecionadas, a maioria são pesquisas realizadas em instituições europeias (37,1%), seguidas muito de perto pelas instituições americanas (31,8%). De forma semelhante, a origem das revistas que mais publicam artigos com melanoma é na ordem, o continente europeu e americano (54,4 e 41,3%, respectivamente). Estes dados podem estar refletindo o alto investimento em pesquisas nesses continentes que correlaciona com maior número de publicações em periódicos com melhor avaliação.

Levando em consideração o tipo de modelo utilizado nas pesquisas, dos 300 artigos selecionados publicados no PubMed, 88% dos trabalhos são estudos originais, 9% revisões de literatura e 3% revisões sistemáticas. Já considerando o

assunto abordado nestes trabalhos, apenas 11% destes estudos se baseiam no microambiente tumoral. O tema do microambiente tumoral é de alta relevância e muitos estudos baseados no microambiente têm apresentado dados promissores e de alto valor na prevenção, tratamento e diagnóstico de diversas neoplasias inclusive melanoma (Russo *et al.*, 2017). Portanto, trabalhos considerando o microambiente tumoral, particularmente o estudo com populações celulares podem contribuir na compreensão dos mecanismos de ação nas interações entre células tumorais e não tumorais, com o intuito de descobrir novos alvos para prevenção ou tratamento do melanoma e/ ou, controle da formação de metástases.

## Conclusões

Embora as pesquisas em melanoma tenham se mostrado crescentes nos últimos 10 anos, pouco tem sido explorado com modelos experimentais ou clínicos que avaliem a participação dos componentes celulares presentes no microambiente onde o tumor se desenvolve.

Assim, em conjunto os dados aqui apresentados mostram que pesquisas em relação ao melanoma continuam em ascensão ano após ano, entretanto, ainda existem temas de interesse que são poucos explorados na maioria dos grupos de pesquisa em câncer e que podem proporcionar dados de alto valor para o desenvolvimento de medicamentos ou técnicas para prevenção e /ou diagnóstico de tumores altamente malignos como o melanoma.

## Referências

- AFFOLTER, A.; HESS, J. [Preclinical models in head and neck tumors : Evaluation of cellular and molecular resistance mechanisms in the tumor microenvironment]. **HNO**, Nov 2016. ISSN 1433-0458. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27837212> >.
- BOSCH, J. J.; HEINDL, L. M. [Novel Adjuvant Therapy for Ocular Melanoma]. **Klin Monbl Augenheilkd**, v. 234, n. 5, p. 670-673, May 2017. ISSN 1439-3999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28505674> >.
- BRANDNER, J. M.; HAASS, N. K. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. **Pathology**, v. 45, n. 5, p. 443-52, Aug 2013. ISSN 1465-3931. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23851614> >.

CARVALHO, J. R. et al. **PAPEL DO MICROAMBIENTE TUMORAL NO DESENVOLVIMENTO DO MELANOMA.** *Veterinária Notícias*. Uberlândia. 21: 34-49 p. 2015.

COHEN, P. R. Linear Malignant Melanoma In Situ: Reports and Review of Cutaneous Malignancies Presenting as Linear Skin Cancer. **Cureus**, v. 9, n. 9, p. e1696, Sep 2017. ISSN 2168-8184. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29159004> >.

DE SCHWEINITZ, G. E.; SHUMWAY, E. A. Concerning melanoma of the choroid with report of one case of this character and of another exhibiting a pigmented sarcoma of the choroid early in its development. **Trans Am Ophthalmol Soc**, v. 10, n. Pt 3, p. 439-51, 1905. ISSN 0065-9533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16692044> >.

DI STEFANI, A. et al. Practical indications for the management of non-melanoma skin cancer patients. **G Ital Dermatol Venereol**, v. 152, n. 3, p. 286-294, Jun 2017. ISSN 1827-1820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28195452> >.

FINK, C.; HAENSSLE, H. A. Non-invasive tools for the diagnosis of cutaneous melanoma. **Skin Res Technol**, Nov 2016. ISSN 1600-0846. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27878858> >.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharm Sin B**, v. 5, n. 5, p. 402-18, Sep 2015. ISSN 2211-3835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26579471> >.

GUTIÉRREZ GARCÍA-RODRIGO, C. et al. Staging and follow-up of cutaneous melanoma patients. **G Ital Dermatol Venereol**, v. 152, n. 3, p. 231-240, Jun 2017. ISSN 1827-1820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28195451> >.

HAASS, N. K. et al. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res**, v. 18, n. 3, p. 150-9, Jun 2005. ISSN 0893-5785. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15892711> >.

HIGGINS, H. W. et al. Melanoma in situ: Part I. Epidemiology, screening, and clinical features. **J Am Acad Dermatol**, v. 73, n. 2, p. 181-90, quiz 191-2, Aug 2015. ISSN 1097-6787. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26183967> >.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; INCA; 2015. 122 p. ilus, tab.

KIRCHOFF, D. D. et al. Evolving Therapeutic Strategies in Mucosal Melanoma Have Not Improved Survival Over Five Decades. **Am Surg**, v. 82, n. 1, p. 1-5, Jan 2016. ISSN 1555-9823. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26802836> >.

MAHENDRARAJ, K. et al. Ocular melanoma-when you have seen one, you have not seen them all: a clinical outcome study from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) database (1973-2012). **Clin Ophthalmol**, v. 11, p. 153-160, 2017. ISSN 1177-5467. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28115829> >.

MAIRE, C.; VERCAMBRE-DARRAS, S.; DESMEDT, E. [Diagnosis of melanoma]. **Rev Prat**, v. 64, n. 1, p. 61-8, Jan 2014. ISSN 0035-2640. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649548> >.

MOTOKAWA, T. et al. Effect of Val92Met and Arg163Gln variants of the MC1R gene on freckles and solar lentigines in Japanese. **Pigment Cell Res**, v. 20, n. 2, p. 140-3, Apr 2007. ISSN 0893-5785. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17371441> >.

NGUYEN, N. et al. Understanding melanoma stem cells. **Melanoma Manag**, v. 2, n. 2, p. 179-188, 2015 2015. ISSN 2045-0885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26594315> >.

OMBRA, M. N. et al. Vitamin D status and risk for malignant cutaneous melanoma: recent advances. **Eur J Cancer Prev**, Jan 2017. ISSN 1473-5709. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28125434> >.

PHO, L.; GROSSMAN, D.; LEACHMAN, S. A. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. **Curr Opin Oncol**, v. 18, n. 2, p. 173-9, Mar 2006. ISSN 1040-8746. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16462187> >.

RUSSO, I. et al. A comparative study of the cutaneous side effects between BRAF monotherapy and BRAF/MEK inhibitor combination therapy in patients with advanced melanoma: a single-centre experience. **Eur J Dermatol**, v. 27, n. 5, p. 482-486, Oct 2017. ISSN 1952-4013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29084636> >.

SATHEESHA, T. Y. et al. Melanoma Is Skin Deep: A 3D Reconstruction Technique for Computerized Dermoscopic Skin Lesion Classification. **IEEE J Transl Eng Health Med**, v. 5, p. 4300117, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28512610> >.

SPENCER, K. R.; MEHNERT, J. M. Mucosal Melanoma: Epidemiology, Biology and Treatment. **Cancer Treat Res**, v. 167, p. 295-320, 2016. ISSN 0927-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26601869> >.

SUN, L. et al. Resveratrol inhibits lung cancer growth by suppressing M2-like polarization of tumor associated macrophages. **Cell Immunol**, Nov 2016. ISSN 1090-2163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27825563> >.

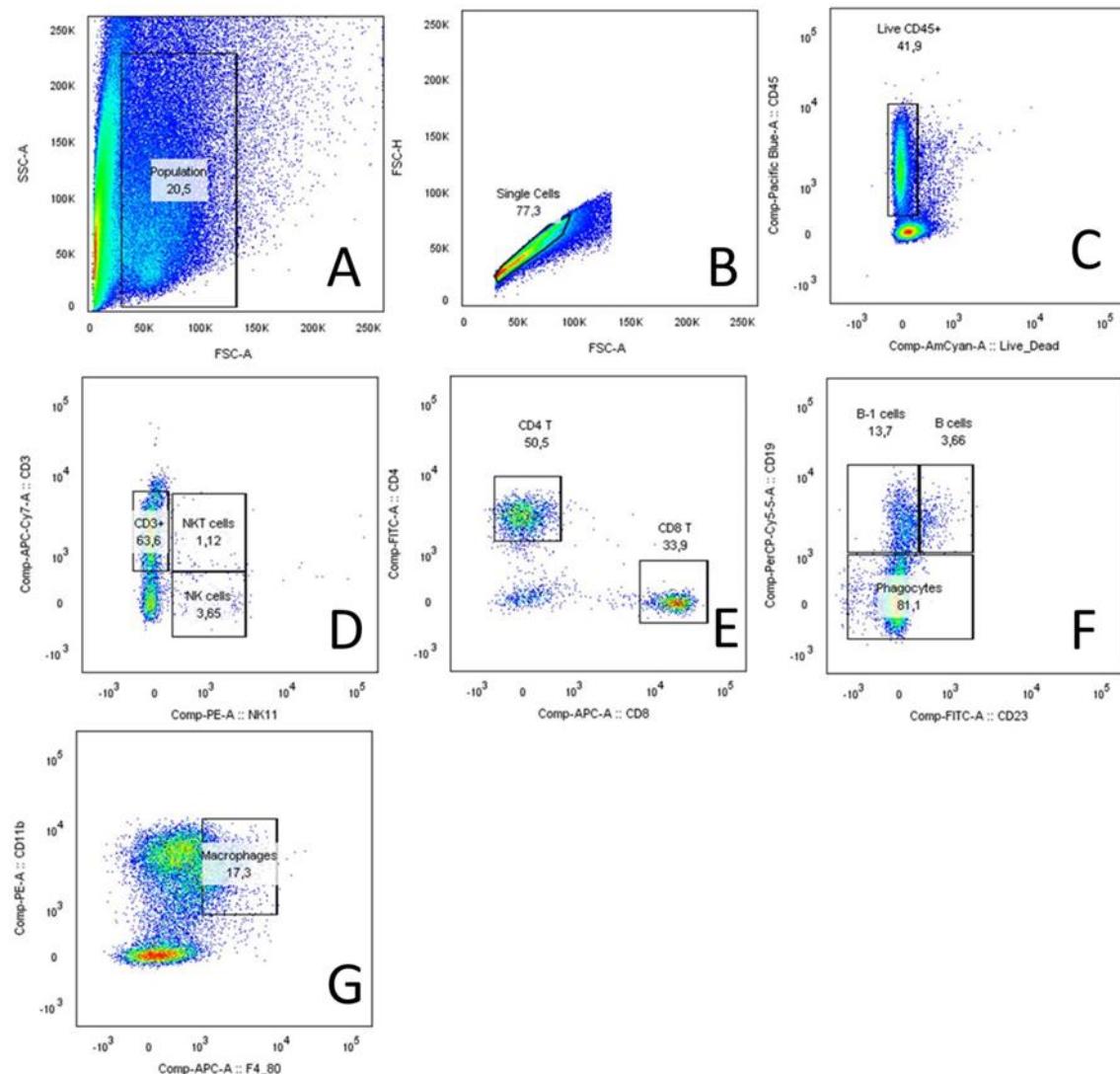
TAWBI, H. A.; KIRKWOOD, J. M. Management of metastatic melanoma. **Semin Oncol**, v. 34, n. 6, p. 532-45, Dec 2007. ISSN 0093-7754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083377> >.

VORA, G. K. et al. Advances in the management of conjunctival melanoma. **Surv Ophthalmol**, v. 62, n. 1, p. 26-42, 2017 Jan - Feb 2017. ISSN 1879-3304. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27321895> >.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Embora as pesquisas em melanoma tenham se mostrado crescentes nos últimos 10 anos, poucas têm avaliado a participação e influência dos componentes celulares presentes no microambiente tumoral no desenvolvimento do melanoma. Nossos resultados demonstram que o local primário de desenvolvimento do tumor influencia no fenótipo e padrão de comportamento das células tumorais, fortalecendo a hipótese de que o microambiente tumoral precisa ser melhor investigados para a compreensão da patogenicidade do melanoma.

## FIGURA SUPLEMENTAR



**Figura 1: Estratégia de gate usada para as análises dos dados obtidos por citometria de fluxo.**  
 A, Gate de seleção da população de interesse para análises. B, exclusão de doublets para análises somente de células individuais (single cells). C, seleção da população de leucócitos viáveis (CD45+ x Live/Dead-). D, seleção das populações de linfócitos T, NK e NKT. F, seleção das populações de linfócitos B e fagócitos e G, seleção da população de macrófagos.

## ANEXOS



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

---

## C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 318/15 CEP/ICS/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Estudo da influência do microambiente tumoral no desenvolvimento do melanoma ocular e cutâneo em modelo murino "JOSÉ RENILDO DE CARVALHO, NATALIA CARDOSO MARCONDES, CAROLINA DE FARIA LEITÃO, PAMELA FERREIRA DE OLIVEIRA, GIOVANNA DANIELE RIBEIRO JACCANI e LUCIANA NOGUEIRIRA", 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 12 dias do mês de agosto de 2015.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Hailey Barros F. Gonçalves'.

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



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

---

## C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA DO MICROAMBIENTETUMORAL NO DESENVOLVIMENTO DO MELANOMA OCULAR E CUTÂNEO EM MODELO MURINO", registrada com o nº 318/15, sob-responsabilidade ELIZABETH CRISTINA PEREZ HURTADO e JOSÉ RENILDO DE CARVALHO" que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal ( CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais (CEUA) da UNIP, em reunião de 12/08/2015.

Juliana Guizi

Secretaria da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Universidade Paulista – UNIP