Janio da Silva Mororó

**Análise da função vascular de tumores gerados com
linhagem de melanoma humano *BRAF^{V600E}* em
camundongos expostos a atividade física voluntária**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto
Buchpiguel

**(Versão corrigida Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original
está disponível na Biblioteca da FMUSP)**

São Paulo

2018

Janio da Silva Mororó

Análise da função vascular de tumores gerados com linhagem de melanoma humano *BRAF*^{V600E} em camundongos expostos a atividade física voluntária

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mororó, Janio da Silva

Análise da função vascular de tumores gerados com
linhagem de melanoma humano BRAFV600E em
camundongos expostos a atividade física voluntária /
Janio da Silva Mororó. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Coorientador: Carlos Alberto Buchpiguel.

Descritores: 1.Exercício 2.Normalização vascular
3.Resistência a drogas 4.Melanoma humano BRAFV600E
5.Camundongo imunodeprimido 6.Análise por Fluidgm

USP/FM/DBD-502/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico essa tese aos meus pais, Angélica Mororó e José Alves Mororó, por todo ensinamento, carinho, força e motivação, que mesmo sem saber, me foram dadas através de repreensões ou incentivos.

AGRADECIMENTOS

Se por um lado temos que agradecer as pessoas e instituições que nos auxiliaram no decorrer deste trabalho, eu agradeço à Deus, que acima de tudo e de todos foi importante em todos os momentos, pois pela manhã, tarde e noite eu sempre me via pedindo forças para prosseguir.

Em especial, ao professor Roger Chammass, por ter aberto as portas do laboratório de Oncologia Experimental localizado no Centro Translacional de Oncologia (CTO), e também pela disposição, empenho, tranquilidade e paciência que dedicou à minha formação nos últimos anos.

Ao professor Buchpiguel, tanto pela co-orientação, como pelos resultados iniciais que conduziram o projeto da proteína CD20, na qual Luciana e Camila tiveram os resultados utilizando radiofármacos no aparelho micro-PET/SPECT/CT.

À pessoa que muito me ajudou nos experimentos demonstrados nesta tese, Luciana Nogueira de Sousa Andrade, que desde o primeiro encontro nos laboratórios do CTO, me apresentando a estrutura e as pessoas que ali estavam, passando ao longo dos anos por suportes na montagem de aulas, explicação de conceitos, revisão de conteúdos escritos (relatórios, qualificação e Tese) até no incentivo para refazer os experimentos, me ajudou grandiosamente para finalizar o doutorado.

Ao grupo do Projeto exercício, no qual Aninha e a Cris foram super importantes no auxílio e suporte nesta reta final, com um novo projeto.

Ao Tharcisio, grande amigo e parceiro, na qual eu me identifiquei muito e pode me auxiliar com uma colaboração, que muito me ajudou.

À Fátima Pasini e ao Pedro Sérico que me ajudaram tanto nas análises dos dados do Fluidigm como também nas análises de bioinformática realizadas neste trabalho, além do tempo de amizade no ICESP. Também ao médico Patologista Renato, que me ajudou na análise das lâminas de imunoistoquímica.

A todo o pessoal do laboratório de Oncologia Experimental (antigo GACC), incluindo a Renata Saito, Renata Ottes, Ana Carolina, Mauro Cafundó, Tatiane Furuya (Tuty), Silvina Bustos, Andreia Otake e Rosemeire Aparecida pelo companheirismo e por me receberem.

A todos que passaram por este laboratório como amigos de bancada, tanto os internos, como Adalberto, Mayara Jacomassi, Karina Mie, Mari Ikoma, Silvia Guedes, Luciana Kovacs, Carol Rosalvo, Angélica Patino, Lizeth Córdoba, Mayara Klimuk, Alexandre Sarmento, como os externos, Renata Cavalcanti, Clévia dos Santos, Giovani, dentre outros, pelas grandes amizades e pelo maravilhoso relacionamento profissional.

À Professora Luiza Lina Villa por todos os auxílios metodológicos, seja no seu laboratório ou através de conversas científicas, e também por auxílios no departamento da Pós Graduação de Oncologia.

Aos grande amigos do Laboratório de Vetores Viarais (Ruan, Samir, Paulo, Igor, Otto, ...) e também aqueles que fizeram parte do IV Curso em Onco Molecular do ICESP (Aline, Tauana, Dani, Amanda, Gissele, Maíra, Matheus, ...), da qual foi um prazer trabalhar com todos vocês.

Aos funcionários e ex-funcionários do CTO, Laura (pesquisadora), João, Lara, Fayola, Renan, Claudia (bibliotecária), Gabi (assistente administrativa), Rossana, Willame, Cristiane Landim, Mayara (assistente administrativa), Michele Tomitao, Raquel e Débora (suporte na secretaria da pós), Rosângela (responsável pela Patologia), Flávia Mangone, Carol, Myiuki, Mazé, Lili, Diogo, Luiz (almoxarifado), Alane e Renato.

Ao pessoal do Centro de Medicina Nuclear (CMN), incluindo professor Fábio, professor Buchpiguel, Camila Machado, Larissa, Daniele de Paula, Aline, Ariel, Júnior, André, Cida, Sibebe, Mara, Evelyn, Carol, e aos funcionários. Também ao pessoal que faz parte do terceiro andar, laboratório da professora Luiza Villa, incluindo a própria professora Luiza, Ricardo, Lanre, Rafaela, e todos os demais.

Ao pessoal do Uruguai, incluindo Maria Fernanada, Marcos e Ximena Camacho que me acolheram muito bem em Montevideo, e muito me ensinaram sobre radioconjugação e biomoléculas.

À banca examinadora, tanto da qualificação como da defesa de Tese, pelo empenho, tempo e dedicação que dispuseram para colaborar com este material.

A USP, em especial a Faculdade de Medicina de São Paulo, assim como ao SAS, pelo suporte de assistência aos alunos (bandejão e moradia - CRUSP), com a qual muitos não poderiam continuar o sonho da pós graduação e de se engajarem como cientistas.

Ao ICESP, por toda a estrutura fornecida e destinada à pesquisa, e pelo trabalho importante realizada com os pacientes da cidade e do estado de São Paulo.

As agências de fomento FAPESP (2014/27188-2), CNPq e Capes que foram importantíssimas no suporte financeiro da minha pesquisa.

Aos animais de laboratório que de certa forma doam suas vidas para o desenvolvimento da ciência.

A todos os amigos do ambiente profissional que neste momento não me lembro, mas que assim como as pessoas acima citadas vão ficar no meu coração, guardados, para que em momentos futuros sejam fontes de risos e alegrias.

Com relação aos familiares e amigos, que contribuíram fora do instituto:

Aos meus pais, Angélica Maria e José Alves, na qual um foi fonte de expiração de “Fé em Deus e no impossível” e o outro foi expiração de trabalho e ética.

Ao meu irmão James da Silva, que embora em grande parte do desenvolvimento deste trabalho esteve longe, mas de maneira indireta contribuiu para eu saber a importância da ciência e das áreas médicas.

A Mirra Carpe, que pelo companheirismo, paciência, carinho e amizade, foi um pessoa fundamental para dar força para o término deste trabalho.

Aos meus parentes, que em especial o meu tio/padrinho Vicente Mororó, sempre foi uma pessoa que tentou estar presente e me dar todo o apoio em São Paulo, tanto no Mestrado como no Doutorado.

A Dianne, Tio Gildo e Tia Rose, que de longas datas são amigos que sempre me dão forças para continuar.

Aos meus grandes amigos e irmãos, com quase 20 anos de amizades, Rodrigo (cabeça) e Vinícios (vinete).

Aos meninos do CRUSP, Florêncio, Flaubert, Phablo Sávio e Erivaldo, da qual houveram momentos maravilhosos que eu não pretendo esquecer.

Meu Muito Obrigado.

*“NÃO É NO SILÊNCIO QUE OS HOMENS SE FAZEM,
MAS NA PALAVRA, NO TRABALHO, NA AÇÃO-
REFLEXÃO.”*

– Paulo Freire.

Normatização Utilizada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

INTRODUÇÃO DA TESE	1
Capítulo 1.....	3
Capítulo 2.....	4
CAPÍTULO 1	5
Resumo	6
Summary	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Processo de “normalização vascular”	10
1.2. Exercício físico como “normalizador vascular”.....	12
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVO	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos Específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Manutenção da linhagem celular UACC-62 contendo <i>BRAF</i> mutado (<i>BRAF^{V600E}</i>).....	19
4.2. Padronização do exercício espontâneo em animais enxertados com tumores gerados com a linhagem UACC-62.....	19
4.3. Avaliação da hipóxia nos tumores utilizando o reagente pimonidazol.....	21
4.4. Preparo da caixa de exercícios e quantificação do exercício físico voluntário.....	21
4.5. Análise de expressão gênica.....	23
4.6. Histologia e Imunoistoquímica.....	26
4.7. Análise Estatística.....	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Formação do tumor com implante sub cutâneo da célula UACC-62 e distância percorrida pelos animais.....	29
5.2. Análise da Polarização de Macrófagos M1 e M2 por Real-Time PCR.....	32
5.3. Análise da expressão gênica utilizando a plataforma Fluidigm.....	34
5.4. Histologia e Imunoistoquímica.....	37
5.4.1. Coloração por hematoxilina & eosina (HE)	37
5.4.2. Imunoistoquímica.....	37
6. DISCUSSÃO	40
6.1. Padronização experimental e condução do estudo preliminar.....	41
6.2. Exercício e a inibição do tumor.....	44
6.3. Análise da expressão gênica pela plataforma fluidigm.....	47
7. CONCLUSÃO	48
 CAPÍTULO 2	 49
Resumo	51
Summary	52
1. INTRODUÇÃO	53
1.1. Melanoma e tratamento.....	53

1.2. Células Tronco Cancerígenas.....	54
1.3. Métodos de detecção de melanoma por imagem.....	56
2. JUSTIFICATIVA.....	58
3. OBJETIVO.....	59
3.1. Objetivo Geral.....	59
3.2. Objetivos Específicos.....	59
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
4.1. Manutenção das linhagens celulares em cultura e aquisição de anticorpos anti-CD20.....	61
4.2. Conjugação do rituximabe com FITC (RTX-FITC), Cy3 (RTX-Cy3) ou Cy7 (RTX-Cy7)	61
4.3. Citometria de Fluxo.....	63
4.4. Padronização e análise das células CD20-positivas em amostras de tumor (in vivo).....	66
4.4.1. Imagem óptica <i>in vivo</i> (IVIS)	66
4.4.2. Imunofluorescência.....	66
4.4.3. Imunocitoquímica de células em condição de hipóxia.....	67
4.4.4. Imunoistoquímica.....	68
4.4.5. Real Time PCR.....	68
4.5. Análise <i>in silico</i>	69
4.6. Amostras de Pacientes.....	70
5. RESULTADOS.....	71
5.1. Conjugação do rituximabe com FITC, Cy3 e Cy7.....	71
5.2. Padronização e detecção de células CD20-positivas por Citometria de Fluxo.....	71
5.2.1. Padronização da técnica de marcação de células CD20-positivas.....	71
5.2.2. Padronização da análise de células CD20-positivas em citômetro Attune NxT Flow Cytometer.....	74
5.2.3. Resultado da análise de células CD20-positivas.....	74
5.3. Imagem óptica <i>in vivo</i> (IVIS).....	78
5.4. Análise de células CD20-positivas por imunofluorescência.....	79
5.5. Imunocitoquímica de células de melanoma em condição de hipóxia.....	81
5.6. Análise de Histologia e Imunoistoquímica do tumor.....	83
5.6.1. Análise Histológica.....	83
5.6.2. Padronização e Análise Imunoistoquímica de células CD20-positivas.....	84
5.7. Análise da expressão gênica de CD20 em células e tumores de melanoma.....	86
5.8. Análise <i>in silico</i>	88
6. DISCUSSÃO.....	92
6.1. Detecção de CTCs - limitações técnicas e controles de qualidade experimentais.....	93
6.2. Linfócitos B e Órgãos linfoides terciários.....	98
6.3. Tumorigênese do melanoma dependente ou não de CTCs.....	99
7. CONCLUSÃO.....	101
DISCUSSÃO DA TESE.....	102
CONCLUSÃO DA TESE.....	103
ANEXOS.....	104
REFERÊNCIAS.....	113
APÊNDICES	

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

<	Menor
>	Maior
μM	Micromolar
2D	Espaço bidimensional
2 ^{-ΔΔC_T}	Expressão relativa gênica
ABCB1	<i>ATP binding cassette subfamily B1</i>
ABCB5	<i>ATP binding cassette subfamily B5</i>
ABCC3	<i>ATP binding subfamily C3 cassette</i>
ABCG2	<i>ATP-binding cassette super-family G member 2</i>
ALDH1A1	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family member A1</i>
ALDH3A1	<i>aldehyde dehydrogenase 3 family member A1</i>
B2M	<i>Beta-2-microglobulin</i>
Balb/c NUDE	Linhagem de camundongo de animal imunodeprimido
BCR	Receptor de célula B
B-RAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
CD133	<i>Clusters of differentiation 133</i>
CD14	<i>Clusters of differentiation 14</i>
CD16	<i>Clusters of differentiation 16</i>
CD19	<i>Clusters of differentiation 19</i>
CD20	<i>Clusters of differentiation 20</i>
CD271	<i>Clusters of differentiation 271</i>
CD31	<i>Clusters of differentiation 31</i>
CD34	<i>Clusters of differentiation 34</i>
CTCs	Células tronco ccancerígenas
CX	Caixa
CDDP	Quimioterápico cisplatina
d	Dimensão menor
D	Dimensão maior
DEPC	Dicarbonato de dietila
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
IFN γ	<i>Interferon gamma</i>
IL-10	<i>Interleukin 10</i>
IL-12	<i>Interleukin 12</i>
IL17	<i>Interleukin 17</i>
LOX	<i>Lisil Oxidase</i>
mm	Milímetro
MMP12	<i>Matrix metalloproteinase 12</i>
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
MS4A1	<i>Membrane-spanning 4-domains subfamily A member 1</i>
NOD/SCID	Linhagem de camundongo de animal imunodeprimido
NOS	<i>Nitric oxide synthases</i>
NOTCH4	<i>Neurogenic locus notch homolog 4</i>
°C	Graus
OCT4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>

PBS	Tampão salina de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PNM	Palpável não mensurável
RPLP0	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>
SFB	Soro fetal bovino
TBS	Tampão salina tris tamponada
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta (TGF-β)</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
V600E	Mutação na posição 600 do gene, alterando de valina para ácido glutâmico

Lista de Figuras

Figura 1 - Ilustração demonstrando a estrutura vascular e o processo de “normalização vascular” no tecido normal e tumor, a partir do balanço de proteínas anti e pró angiogênicas, utilizando terapia anti-angiogênica: **(A)**Desenho esquemático demonstrando a dinâmica vascular das mudanças estruturais; **(B)**Imagem 2D da musculatura esquelética em vasos sanguíneos de camundongos com tumor de cólon humano; **(C)**Diagrama demonstrando a mudança concomitante nos pericitos (vermelho) e na membrana basal (azul); **(D)**Fatores pró- e anti-angiogênicos no tecido que interferem nas mudanças fenotípicas da vasculatura. Modificada de Rakesh,2005.....11

Figura 2 - Desenho esquemático demonstrando o cronograma do experimento do exercício espontâneo realizado com os animais Balb/c NUDE.....20

Figura 3 - Sistema de roda para exercício espontâneo e marcador digital de velocidade e distância percorrida **(A)**. Microisolador montado com grade de fornecimento de alimento e água, e roda de exercícios acoplado a marcador digital de velocidade e distância percorrida **(B)**.22

Figura 4 - Demonstração do ímã preso na roda de exercícios (círculo vermelho). Utilizado para auxiliar o marcador digital de bicicleta a contabilizar o caminho percorrido.....23

Figura 5 - Tumor hemorrágico demonstrado no dorso do camundongo Balb/c NUDE gerado pela linhagem de melanoma humano UACC-62 **(A)**, e tumor após excisão cirúrgica lavado com solução salina de PBS, demonstrando a melanização no tecido **(B)**.....29

Figura 6 - Expressão de genes resultante da análise da plataforma do Fluidigm, demonstrado em gráfico de barras **(A)** e pelo dendograma de clusterização associado ao *heat map* **(B)**. Sendo demonstrado 8 genes com aumento da expressão diferencial comparando o Grupo dos animais exercitados < 4km (CX12, CX10 e CX13) com o Grupo dos animais sedentários (CX3, CX2, CX4, CX1 e CX6).....35

Figura 7 - Corte histológico demonstrativo do tumor do animal da CX 13, com coloração por HE. Sendo demonstrado no aumento de 40X **(A)** e no aumento de 200X **(B)**. A estrutura demonstrada em ambos os cortes é uma área com região necrose, sendo ressaltado pela coloração rósea (seta branca), e pelos núcleos picnóticos (seta vermelha). Imagem procedida utilizando o aparelho EVOS® FL Auto.....37

Figura 8 - Corte histológico representativo do tumor do animal da CX 12, demonstrando a reação de imunoistoquímica anti-pimonidazol. Sendo demonstrado pelo método SCAN do aparelho EVOS, com agrupamento de várias imagens **(A)** e no aumento de 40X **(B)**. A estrutura marcada em ambos os cortes é uma região de hipóxia circundando uma região de necrose. Imagem feita utilizando o aparelho EVOS® FL Auto.....38

Figura 9 - Corte histológico dos tumores dos animais das CX3 e CX5, demonstrando a reação de imunoistoquímica anti-CD31. As imagens apresentam aumento de 100X em

ambas. Está sendo demonstrado um vaso colabado (**A, seta vermelha**) e um vaso não colabado com lúmen contendo vestígios de hemácias (**B, seta vermelha**).....39

Figura 10 - Imagem óptica *in vivo* de camundongos NOD/SCID com tumores de células de melanoma SK-Mel-147, com a Região de Interesse (ROI) demarcando a área de *uptake* do tumor, tendo o conjugado RTX-Cy7 sido injetado nos tempos de 2 (**A**), 4 (**B**), 6 (**C**) e 24 (**D**) horas antes da aquisição da imagem. Foi utilizado como camundongo controle, o animal com tumor e sem conjugado RTX-Cy7, ao lado de cada animal com tumor e conjugado78

Figura 11 - Imagem óptica *in vivo* do camundongo NOD/SCID com tumor de célula de melanoma SK-Mel-147, com a Região de Interesse (ROI) demarcando a área de *uptake* do tumor, no tempo de 96 horas (**A**). Neste mesmo tempo foi feita análise *ex vivo* deste tumor, com ROI demarcado em comparação a um tumor de um animal que não recebeu o conjugado RTX-Cy7 (**B**).....79

Figura 12 - Padronização da metodologia de imunofluorescência por marcação indireta em linfonodo humano, utilizando anticorpo policlonal anti-CD20 feito em rabbit (ThermoScientific) na diluição de 1:100 seguido por anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com Alexa 633 (Figura 9A). Em seguida foi procedida marcação em tumor gerado de células de melanoma humano SK-Mel-147 (Figura 9B, seta amarela). Ambos analisados pelo microscópio Confocal LSM 510 Meta Zeiss.....80

Figura 13 – Análise de Imunocitoquímica de células CD20-positivas, utilizando a linhagem Toledo (controle positivo). Na figura também são demonstrados os controles de marcação da técnica: controle Isotípico (imunoglobulina de coelho) e controle Secundário (somente o anticorpo secundário). Detecções utilizando o filtro de luz do DAPI e FITC, e a junção das duas imagens (Merge), com detalhamento da marcação de membrana (seta branca).....82

Figura 14 - Análise por Imunocitoquímica de células CD20-positivas em linhagem de melanoma humano UACC-62, em condição de hipóxia e normóxia por 24 horas. Foi diminuída a exposição em relação ao controle Isotípico. Linhagem celular de melanoma UACC-62 com marcação por Hoechst (Filtro DAPI) e Alexa 488 (Filtro FITC).....83

Figura 15 - Histologia procedida com marcação por HE em cortes de tumores gerados pelas linhagens celulares de melanoma humano CHL-1, SK-Mel-147 e UACC-62 (**A**), e Imunoistoquímica procedida com anticorpo de coelho anti-CD20 da empresa ThermoScientific em tumores gerados pelas linhagens SK-Mel-147 e UACC-62 (**B**). Foi utilizado como controle positivo de marcação anti-CD20 o tecido de tonsila humana, tendo sido detectadas maiores marcações membranares anti-CD20 nos centros germinativos (CG). Nas figuras estão sendo demonstrados cortes no aumento de 40X e 400X.....85

Figura 16 - Análise *in silico* dos *clinical database* demonstrando: porcentagem de mutação somática do gene MS4A1 (**A**); processos biológicos associados com proteína CD20 apresentado pelo Diagrama de Venn (**B**); e Curva de sobrevida por Kaplan Mayer, analisando sobrevida livre de doença e índice de sobrevida global) (**C**).....90

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Análise do crescimento dos tumores mediante o exercício espontâneo. Curva de sobrevivência por Kaplan-Meier (%) (**A**), e Dia de Eutanásia do Animal quando o tumor alcançou entre 450-700 mm³ (**B**), dos grupos sedentário, exercício voluntário < 4km e exercício voluntário 18-20km. A data 0 no gráfico representa o dia em que foi adicionado a roda de exercícios.....31

Gráfico 2 - Análise da expressão gênica de marcadores de polarização de macrófagos M1 (iNOS e IL-10) e M2 (IL-12, Arginase e MRC1) extraídos dos tumores dos camundongos dos grupos sedentário, grupo < 4km e grupo 18-20km. Sendo demonstrado por animal de cada grupo, e como uma média dos grupos. Expressão gênica dos grupos dos animais exercitados pelos animais sedentários..... 33

Gráfico 3 - Padronização da massa de RTX-FITC utilizado *overnight* na marcação de células CD20-positivas por citometria de fluxo, tanto na linhagem celular Toledo (controle positivo) como na linhagem celular H1299 (controle negativo), utilizando 3% de bloqueio com BSA. Neste experimento foram utilizados 2 µg e 4 µg de RTX-FITC ou Isotipo-FITC. Porcentagem das células CD20-positivas com desvio Padrão dos experimentos.....72

Gráfico 4 - Eventos das linhagens celulares SK-Mel-29 (**A**), SK-Mel-147 (**B**) e Toledo (**C e D**) posicionados de acordo com o Tamanho (FSC-A) e a Granulosidade (SSC-A) por citometria de fluxo. **A e B** – Apresentando tamanho e granulosidade dispersa (PROCEDIMENTO I); **C** – apresentando dupla população (PROCEDIMENTO I); e **D** – apresentando população com maior homogeneidade (PROCEDIMENTO II).....73

Gráfico 5 - Análise da porcentagem de células CD20-positivas nas linhagens celulares SK-Mel-147 e SK-Mel-29 por citometria de fluxo, utilizando 2µg de RTX-FITC, e os experimentos sendo feitos com células mantidas em condições de cultivo celular recomendada pelo ATCC.....75

Gráfico 6 - Determinação do percentual de células com DNA fragmentado (população sub-G₁), como indicativo de morte celular, utilizando Iodeto de Propídeo. Tratamentos da linhagem SK-Mel-147 nas concentrações de 10, 25 e 50 µM de CDDP por 24 horas e procedida a análise em citômetro de fluxo. Os eventos são demonstrados por (**A**) gráfico do tipo histograma, contendo o parâmetro de Contagem linear por Contagem exponencial em BL3-A (fluoróforo), e por (**B**) gráfico de barras, contendo no eixo vertical DNA Fragmentado e no eixo horizontal concentração de CDDP.....76

Gráfico 7 - Análise da porcentagem de células CD20-positivas na linhagem celular SK-Mel-147 em condições de estresse de cultivo celular com CDDP (10 µM) por citometria de fluxo, comparado com condições de cultivo celular recomendado pelo ATCC (Controle), utilizando 2 µg de RTX-FITC por condição.....76

Gráfico 8 - Gráficos da Amplificação da expressão gênica do CD20/MS4A1 e GAPDH (controle endógeno), contendo diluição seriada do cDNA (50; 25; 12,5; 6,35 ng) da linhagem Toledo para análise da Curva de Eficiência do *primer* CD20/MS4A1 (**A**); e

com análise das amostras das linhagens celulares (SK-Mel-147, SK-Mel-29, SK-Mel-37, SK-Mel-05, UACC-62 e CHL-1) e de tumores (formados pelas linhagens SK-Mel-147 e UACC-62) **(B)**. Controle positivo (Toledo) e controle negativo (H1299). As chaves demonstradas são todas as amostras contendo o gene GAPDH e as amostras de linhagens celulares, tumores e controle negativo H1299 no caso gene MS4A1, demonstrando amplificação tardia.....87

Gráfico 9 - Análise da expressão relativa do gene MS4A1 das amostras de linhagens celulares (SK-Mel-147, SK-Mel-29, SK-Mel-37, SK-Mel-05, UACC-62 e CHL-1) e de tumores (formados pelas linhagens SK-Mel-147 e UACC-62). Desvio padrão de três experimentos.....88

Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Sequência dos pares de *primers* utilizados para identificação da mutação no gene B-RAF (*BRAF*^{V600E}) na linhagem de melanoma humano UACC-62, e do controle endógeno GAPDH, utilizando a metodologia Real-Time PCR.....19
- Tabela 2** - Sequência dos primers utilizados para identificação da polarização de macrófagos M1 e M2 nos tumores dos animais, por Real Time PCR.....24
- Tabela 3** - Descrição dos volumes dos tumores (mm³) e da Distância percorrida no total do experimento (km) pelos 13 animais utilizados neste projeto. Foram dispostos 6 animais em gaiola sem roda e 7 animais em gaiola com roda. Medidas feitas no dia em que os animais foram eutanasiados.....30
- Tabela 4** - Sigla, Nomeclatura e Função dos 8 genes diferencialmente expressos quando comparando o grupo dos animais exercitados < 4km pelo grupo dos animais sedentários, utilizando a plataforma Fluidigm.....36
- Tabela 5** - Quantificação de Necrose (%), Hipóxia e Vasos por mm² dos tumores dos camundongos dos grupos sedentário, animais exercitados < 4km e animais exercitado 18-20km.....39
- Tabela 6** - Distância percorrida (km/dia) de animais de laboratório (roedores) procedendo exercício voluntário em experimentos de tumorigênese.....43
- Tabela 7** - Sequências dos pares de *primers* do gene da proteína CD20 (MS4A1) e do controle endógeno GAPDH utilizados nos experimentos de Real Time PCR.....69
- Tabela 8.** Análise da porcentagem de células CD20-positivas em linhagens celulares de melanoma (SK-Mel-147, SK-Mel-29, SK-Mel-37 e UACC-62) utilizando o **PROCEDIMENTO II** (em azul), relacionando com a passagem ou sub-cultivo da célula, a confluência e o pH do meio de cultivo. Estas células estavam sobre condições normais de cultivo. CT positivo – porcentagem de células CD20-positivas na linhagem celular Toledo.....77
- Tabela 9** - Sigla, Nomeclatura e Função dos 6 DEGs relacionados com o gene MS4A1, avaliados pela Plataforma Gene Expression Omnibus (GEO).....91

Resumo

Mororó JS. *Análise da função vascular de tumores gerados com linhagem de melanoma humano BRAF^{V600E} em camundongos expostos a atividade física voluntária* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A vasculatura tumoral é estrutural e funcionalmente anormal em relação à vasculatura de órgãos normais, resultando em regiões de heterogeneidade intratumoral para concentração de oxigênio, nutrientes e células inflamatórias. Com isso a vascularização disfuncional muitas vezes leva à administração ineficiente de drogas, comprometendo portanto a eficácia do tratamento. Recentemente, foi demonstrado que terapias anti-angiogênicas e exercícios físicos poderiam “normalizar” a vasculatura tumoral, melhorando a sobrevida em pacientes com câncer. No entanto seria importante analisar se em melanomas portadores da mutação *BRAF^{V600E}*, que são altamente resistentes a terapia, se o exercício promoveria a normalização vascular. Este trabalho teve como objetivo analisar o impacto do exercício físico voluntário na função vascular de melanomas humanos com mutação *BRAF^{V600E}* em camundongos imunodeficientes (BALB/c Nude). Em relação ao crescimento tumoral, não observamos diferenças significativas entre os grupos dos animais exercitados e sedentários, tampouco diferença nos níveis de expressão de genes característicos de macrófagos M1 e M2 no microambiente tumoral desses animais. Por outro lado, a análise de expressão de genes nas células tumorais demonstrou que 8 genes foram diferencialmente expressos no Grupo exercitado (< 4 km) em relação ao Grupo Sedentário, dentre os quais: FLOT2, STK4, STAT3, LATS1, PTEN, MCL1, PCNA e ACTA2. Em adição, não observamos diferenças significativas no percentual de área necrótica, hipóxica e vasos CD31 positivos. Desse modo, concluímos que o exercício físico induz um aumento nos níveis de expressão de genes envolvidos em modificações epigenéticas, apoptose, proliferação e sobrevivência, ciclo celular e motilidade celular.

Descritores: exercício; normalização vascular; resistência a drogas; melanoma humano *BRAF^{V600E}*; camundongo imunodeprimido; análise por Fluidigm.

Summary

Mororó JS. *Analysis of vascular function of tumors generated with $BRAF^{V600E}$ human melanoma cell line in mice exposed to voluntary physical activity* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

The tumor vasculature is structurally and functionally abnormal in relation to the vasculature of normal organs, resulting in regions of intratumoral heterogeneity for oxygen partial pressure, nutrients and inflammatory cells. Thus dysfunctional vascularization often leads to inefficient drug delivery, thereby compromising the efficacy of treatment. Recently, it has been demonstrated that anti-angiogenic therapies and physical exercises could "normalize" tumor vasculature, improving survival in patients with cancer. However, it would be important to analyze in $BRAF^{V600E}$ melanoma tumors, which are highly resistant to therapy, whether exercise would promote vascular normalization. Based on this, this work aimed to analyze the impact of voluntary physical exercise on the vascular function of human melanomas with $BRAF^{V600E}$ mutation in immunodeficient mice (BALB / c Nude). In relation to the tumor growth, we did not observe significant differences between the groups of the exercised and sedentary animals, neither difference in the expression levels of genes characteristic of M1 and M2 macrophages in the tumor microenvironment of these animals. On the other hand, analysis of gene expression in tumor cells showed that 8 genes were differentially expressed in the exercised group (<4 km) in comparison to the Sedentary Group, among them: FLOT2, STK4, STAT3, LATS1, PTEN, MCL1, PCNA and ACTA2. In addition, we did not observe any significant differences in the percentage of necrotic, hypoxic area and CD31 positive vessels. Thus, we concluded that physical exercise induces an increase in the expression levels of genes involved in epigenetic modifications, apoptosis, proliferation and survival, cell cycle and cell motility.

Descriptors: exercise; vascular normalization; drug resistance; $BRAF^{V600E}$ human melanoma; immunodeficient mice; Fluidigm analysis.

INTRODUÇÃO

DA

TESE

A heterogeneidade tumoral se estabelece a partir de alterações intrínsecas e extrínsecas. As alterações intrínsecas incluem alterações genéticas, epigenéticas e propriedades biológicas de células cancerígenas contribuindo para a atividade oncogênica, enquanto as alterações extrínsecas estão relacionadas com a influência do microambiente tumoral, que pode induzir a progressão do tumor.

O microambiente tumoral apresenta um papel tão importante no desenvolvimento do tumor, que nos últimos anos diversas intervenções tem sido utilizadas para controlar o crescimento do tumor, sejam elas químicas (medicamentos), físicas (radiação), biológicas (imunoterapia) ou comportamentos de vida (exercícios físicos).

Em 1997, Bonnet e Dick lançaram uma nova luz para o entendimento do processo tumorigênico, ao identificarem células tronco cancerígenas (CTCs) em leucemia mieloide aguda. Embora as CTCs possam apresentar baixa frequência no tumor, elas são capazes de re-povoar o tumor, promovendo recorrência ao tratamento dos pacientes mediante resposta ao microambiente (Das e Law, 2018). Além disso, as CTCs apresentam mecanismos de resistência à terapias, apresentando por exemplo: baixa proliferação (células quiescentes), expressão de proteínas exportadoras de drogas, transição de epitélio para mesênquima, resistência a hipóxia, indução de angiogênese e evasão do sistema imune (Aponte e Caicedo, 2017).

As CTCs podem ter diferentes respostas mediante alterações do microambiente tumoral, alterações estas desencadeadas por exemplo por vias metabólicas e/ou imunológicas (Li & Zhu, 2018). A hipóxia assim como a acidez são duas condições importantes que alteram o microambiente tumoral e, como consequência, podem alterar a frequência das CTCs, principalmente em resposta ao HIF1-alfa e HIF2-alfa (Li & Rich, 2010).

O melanoma maligno é um tumor tratável, geralmente com cirurgia, mas em casos avançados os pacientes possuem baixo índice de sobrevida, mesmo com as novas terapias desenvolvidas atualmente (imunoterapias) (Domingues *et al.*, 2018). Com isso, a presença de CTCs nestes tumores pode ser uma provável causa de resistência.

Tendo em vista estes dois pontos apresentados aqui, estudamos o papel do exercício físico para intervir no microambiente tumoral (Capítulo 1), e utilizamos

técnicas de imagem molecular para imagear e acompanhar CTCs, importantes componentes do microambiente tumoral (Capítulo 2).

CAPÍTULO 1

O microambiente tem grande importância no desenvolvimento do melanoma (Villanueva & Herlyn, 2008), e a hipóxia como comentado anteriormente, tem grande importância na progressão tumoral, promovendo resistência a terapias e metástase, através da mudança fenotípica das células para se tornarem invasivas (Li e Rich, 2010).

Com isso, diversas terapias tem sido desenvolvidas para atuarem no controle da hipóxia (Paolicchi *et al.*, 2016) e no microambiente tumoral (Muz *et al.*, 2015), influenciando também na resposta imunológica (Ventola, 2017).

Dentre as alterações que podem haver no microambiente tumoral, algumas podem ser controladas por alguns tipos de intervenção do hábito de vida, incluindo o exercício físico, o qual pode aumentar a eficiência do tratamento de câncer e diminuir os eventos adversos dos tratamentos (Cormie *et al.*, 2017).

O exercício pode alterar uma série de fatores extrínsecos, incluindo efeitos físicos (desregulação do fluxo sanguíneo, shear stress, pH, produção de calor, dentre outros) e efeitos endócrinos (hormônios, miocinas e exossomos circulantes), que atuam em processos fisiológicos do tumor, como angiogênese e resposta imunológica, importantes fatores que regulam o tumor (Koelwyn *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que o exercício físico aumentou o fluxo sanguíneo, em modelos de câncer de próstata ortotópico, atuando no remodelamento da rede vascular. Assim é esperado um aumentona perfusão de vasos depois do treinamento, o qual deve aumentar a oxigenação e a entrega de fármacos para terapia (McCullough *et al.*, 2013). Além disso, alguns experimentos conduzidos com exercício físico em intensidade moderada tem demonstrado que ocorre indução de resposta imunológica inata, ativando células NKs e macrófagos (Pedersen *et al.*, 2016).

No entanto, é importante que sejam analisados o tipo de exercício, a intensidade e a frequência, relacionando com a resposta gerada no tumor.

Com isso, foi procedido o primeiro estudo nesta Tese de Doutorado (Capítulo 1), intitulado **“Análise da função vascular de tumores gerados com linhagem de melanoma humano BRAF $BRAF^{V600E}$ em camundongos expostos a atividade física voluntária”**, que tentou analisar a intervenção feita pelo exercício espontâneo em roda de exercício como potencial modificador do microambiente tumoral em camundongos.

Este projeto estudou tumores de melanoma formados a partir de uma linhagem celular com mutação $BRAF^{V600E}$, que é conhecida como uma alteração genética que leva maior agressividade aos tumores de melanoma. Com isso a pergunta central deste projeto foi se o exercício poderia interferir no crescimento de tumor de melanoma com mutação $BRAF^{V600E}$.

CAPÍTULO 2

A população de CTCs apresentam uma baixa frequência em relação ao tumor, sendo denominado de sub-população, no qual em melanomas alguns trabalhos tem detectado células de melanoma derivadas de pacientes quando estas são implantadas em camundongos imunodeprimidos (Quintana *et al.*, 2008). No entanto, a frequência pode ser diferente, e muitas das vezes esta detecção é limitada pelo tipo de marcador de superfície utilizado.

No segundo projeto descrito nesta Tese (Capítulo 2), averiguamos um marcador em específico, a proteína CD20 (cluster of differentiation 20), que tem sido analisada nos últimos anos como provável proteína presente em CTCs de melanoma.

Com isso, o segundo estudo desta Tese teve como título **“Análise da sub-população de células de melanoma CD20-positivas e o comportamento destas células mediante tratamento com quimioterápicos, utilizando detecção por imagem radionuclídica”**, com o objetivo de detectar por técnicas de biologia celular, molecular e imagem molecular uma sub-população de células tronco CD20-positivas.

Capítulo 1

Resumo

Mororó JS. *Análise da função vascular de tumores gerados com linhagem de melanoma humano $BRAF^{V600E}$ em camundongos expostos a atividade física voluntária* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A vasculatura tumoral é estrutural e funcionalmente anormal em relação à vasculatura de órgãos normais, resultando em regiões de heterogeneidade intratumoral para concentração de oxigênio, nutrientes e células inflamatórias. Com isso a vascularização disfuncional muitas vezes leva à distribuição ineficiente de drogas, comprometendo portanto a eficácia do tratamento. Recentemente, foi demonstrado que terapias anti-angiogênicas e exercícios físicos poderiam “normalizar” a vasculatura tumoral, melhorando a sobrevida em pacientes com câncer. No entanto é importante analisar se em melanomas portadores da mutação $BRAF^{V600E}$, que são altamente resistentes a terapia, se o exercício pode promover a normalização vascular. Este trabalho teve como objetivo analisar o impacto do exercício físico voluntário na função vascular de melanomas humanos com mutação $BRAF^{V600E}$ em camundongos imunodeficientes (BALB/c Nude). Em relação ao crescimento tumoral, não observamos diferenças significativas entre os grupos dos animais exercitados e sedentários, tampouco diferença nos níveis de expressão de genes característicos de macrófagos M1 e M2 no microambiente tumoral desses animais. Por outro lado, a análise de expressão de genes nas células tumorais demonstrou que 8 genes foram diferencialmente expressos no grupo exercitado (< 4 km) em relação ao grupo sedentário, dentre os quais: FLOT2, STK4, STAT3, LATS1, PTEN, MCL1, PCNA e ACTA2. Em adição, não observamos diferenças significativas no percentual de área necrótica, hipóxica e vasos CD31 positivos. Desse modo, concluímos que o exercício físico induz um aumento nos níveis de expressão de genes envolvidos em modificações epigenéticas, apoptose, proliferação e sobrevivência, ciclo celular e motilidade celular.

Descritores: exercício; normalização vascular; resistência a drogas; melanoma humano $BRAF^{V600E}$; camundongo imunodeprimido; análise por Fluidigm.

Summary

Mororó JS. *Analysis of vascular function of tumors generated with BRAF^{V600E} human melanoma cell line in mice exposed to voluntary physical activity* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

The tumor vasculature is structurally and functionally abnormal in relation to the vasculature of normal organs, resulting in regions of intratumoral heterogeneity for oxygen partial pressure, nutrients and inflammatory cells. Thus dysfunctional vascularization often leads to inefficient drug delivery, thereby compromising the efficacy of treatment. Recently, it has been demonstrated that anti-angiogenic therapies and physical exercises could "normalize" tumor vasculature, improving survival in patients with cancer. However, it would be important to analyze in *BRAF^{V600E}* melanoma tumors, which are highly resistant to therapy, whether exercise would promote vascular normalization. Based on this, this work aimed to analyze the impact of voluntary physical exercise on the vascular function of human melanomas with *BRAF^{V600E}* mutation in immunodeficient mice (BALB / c Nude). In relation to the tumor growth, we did not observe significant differences between the groups of the exercised and sedentary animals, neither difference in the expression levels of genes characteristic of M1 and M2 macrophages in the tumor microenvironment of these animals. On the other hand, analysis of gene expression in tumor cells showed that 8 genes were differentially expressed in the exercised group (<4 km) in comparison to the Sedentary Group, among them: FLOT2, STK4, STAT3, LATS1, PTEN, MCL1, PCNA and ACTA2. In addition, we did not observe any significant differences in the percentage of necrotic, hypoxic area and CD31 positive vessels. Thus, we concluded that physical exercise induces an increase in the expression levels of genes involved in epigenetic modifications, apoptosis, proliferation and survival, cell cycle and cell motility.

Descriptors: exercise; vascular normalization; drug resistance; *BRAF^{V600E}* human melanoma; immunodeficient mice; Fluidigm analysis.

1. INTRODUÇÃO

A vasculatura em tecidos normais é formada por artérias, capilares e veias, com ramificações simétricas e proporcionais, estando sobre uma forma organizada, que origina a chamada arquitetura funcional. Diferentemente, a vasculatura tumoral apresenta-se desorganizada, contendo vasos menores, imaturos, saculares, tortuosos, vazados e com paredes finas, que acabam por formar distribuição espacial heterogênea e irregular, que origina uma arquitetura disfuncional (ALGIRE & CHALKLEY, 1945). Além disso, a vasculatura tumoral é formada por ramificações com diferentes diâmetros e desproporcionais, apresentando junções inter-endotélio, elevado número de fenestrações e canais vesiculares, em associação a uma perda da membrana basal (CARMELIET & RAKESH, 2011). As células perivasculares do tumor, pericitos, tem morfologia anormal e associação heterogênea com vasos tumorais (CHANG *et al.*, 2000).

O estresse mecânico gerado pela proliferação de várias células tumorais também comprime os vasos tumorais (NORTHCOTT *et al.*, 2018). O fluxo sanguíneo através dos tumores não segue um caminho constante e unidirecional (RAKESH, 1988). Nem todos os vasos abertos são perfundidos de forma contínua e, durante alguns minutos, o fluxo sanguíneo pode seguir caminhos diferentes e até mesmo prosseguir em direções alternadas através do mesmo vaso (CHAPLIN *et al.*, 1987). Os vasos sanguíneos tumorais são mais abundantes na interface tumor-hospedeiro do que nas regiões centrais (GIATROMANOLAKI *et al.*, 2002). Além disso, a densidade vascular tende a diminuir à medida que os tumores crescem, aparecendo zonas de isquemia e, em última instância aparecem regiões de necrose à medida que os tumores superam o suprimento de sangue, levando a piora da qualidade dos vasos sanguíneos em todo o tumor (CHAPLIN *et al.*, 1987).

A distribuição de moléculas a partir da circulação sanguínea pode ocorrer por difusão, convecção e por transporte transvascular (por entre os vasos), sendo que pelos tumores o mais comum é por transporte transvacular, que é maior do que em vários tecidos normais, tendo estes transportes a função de fornecer nutrientes, oxigênio e

retirar metabólitos dos tecidos. No entanto, o microambiente tumoral, que contém uma matriz extracelular rica, e abundante fluido intersticial, promove a formação e manutenção de um ambiente hostil no microambiente tumoral que é caracterizado por hipóxia e acidose (RAKESH, 2014). Além dos fatores mecânicos, os fatores moleculares, como fatores pró e anti- angiogênicos envolvidos na via de sinalização do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) também influenciam na estrutura final desorganizada do tumor (RAKESH, 2005).

Com a desorganização destes vasos, são identificadas várias regiões hipovasculares onde, levando em consideração que o limite de difusão de oxigênio é 100-200 μm , várias regiões distantes dos vasos se tornam cronicamente hipóxicas. Além disso, algumas regiões também podem apresentar hipóxia aguda ou hipóxia por perfusão limitada, processo que acontece quando o tumor sofre ciclos de Isquemia/Reperusão (BROWN & GIACCIA, 1998; DEWHIRST, 1998).

Tanto a baixa pressão de oxigênio como o baixo pH são importantes fatores relacionados ao crescimento do tumor, metabolismo e resistência à terapia (BROWN, 1999). A hipóxia reduz a eficiência da radiação em tumores, pois nos efeitos indiretos da radiação é necessário que haja presença de oxigênio nos tecidos. Também, a baixa concentração de oxigênio também é relacionada à resistência do tumor a alguns tipos de quimioterápicos, como bleomicina, neocarzinostatina, adriamicina, doxorubicina e mitoxantona, por mediar progressão tumoral induzindo metástase (BROWN, 1999; VUKOVIC & TANNOCK, 1997).

Além de impactar nos processos terapêuticos, a função e resposta das células imunes também são alteradas em presença de ambientes com hipóxia ou ácidos, e com isso as células imunes do sistema inato e adaptativo não conseguem alcançar da maneira correta o tumor, com isso o tumor consegue evadir a resposta imunológica (NOMAN *et al.*, 2015).

Por estes motivos citados, o ambiente tumoral acaba selecionando células tumorais com perfil mais agressivo, geneticamente instáveis, e menos susceptíveis a apoptose, diminuindo a resposta a terapias, facilitando a invasividade e metástase de células tumorais, inclusive contribuindo com a liberação e aumento de expressão de fatores pró-angiogênicos (ERLER *et al.*, 2006; PENNACCHIETTI *et al.*, 2003).

O estresse mecânico também ocorre por causa das células endoteliais presentes no microambiente tumoral. As células endoteliais presentes em vasos maduros normais e quiescentes apresentam baixa proliferação, e o tempo estimado de renovação destas células é medido em anos, chegando a ser 50-200 vezes menor do que em células endoteliais tumorais (VERMUELEN *et al.*, 1995), uma vez que os vasos tumorais são dependentes de fatores de crescimento para sobrevivência, e quando um vaso do hospedeiro invade o tumor, as células endoteliais normais que entram em contato com células tumorais que produzem VEGF, são as responsáveis pela formação de novos vasos e também por induzir a permeabilidade de novos vasos formados.

Uma das consequências da má organização e arquitetura do endotélio é o aumento da pressão intersticial podendo produzir hemorragias, produzindo edemas no entorno do tumor (BALUK *et al.*, 2003). Como no tumor os vasos linfáticos também funcionam de maneira limitada, por serem comprimidos pelas células estromais e cancerígenas, aumenta ainda mais a pressão intersticial, interferindo na entrada de terapias no local do tumor (PADERA *et al.*, 2004).

Deste modo, a estrutura dos vasos pode ser variável, levando a um fluxo sanguíneo diferente entre tumores primários, tumores metastáticos e até mesmo em diferentes lugares em um único tumor (FUKUMURA *et al.*, 2010). Com isso, a arquitetura vascular dos tumores se demonstra desorganizada e ineficiente.

1.1 Processo de “normalização vascular”:

O excesso da produção de moléculas pró-angiogênicas e/ou diminuição da produção de moléculas anti-angiogênicas é responsável por causar anormalidades nos vasos e no microambiente tumoral, resultando em ineficiência na chegada de fármacos e baixa eficácia terapêutica (RAKESH, 2005). No entanto, se este balanço de moléculas anti e pró-angiogênicas for restaurado, a vasculatura voltará a ter um perfil “normalizado”, como relata o pesquisador Jain Rakesh, primeiro a utilizar o termo “normalização tumoral” (RAKESH, 2001).

Na figura 1, estão ilustradas as diferenças do tecido normal e cancerígenos (anormal). Com a terapia anti-angiogênica, “normaliza-se” a arquitetura dos vasos tumorais. O tecido normal apresenta hierarquia com vasos alinhados e seguindo

organização contendo membrana basal e pericito estruturado, com moléculas anti- e pró-angiogênicas proporcionais. No tecido anormal, os vasos são descontínuos e não apresentam orientação, existe de-estruturação do pericito e da membrana basal e as moléculas pró-angiogênicas estão em maior proporção. No tecido “normalizado”, existe uma re-estruturação nos vasos, com re-organização do pericito e da membrana basal, e a proporção de moléculas anti- e pró- angiogênicas é semelhante.

Figura 1 - Ilustração demonstrando a estrutura vascular e o processo de “normalização vascular” no tecido normal e tumor, a partir do balanço de proteínas anti e pró angiogênicas, utilizando terapia anti-angiogênica: **(A)** Desenho esquemático demonstrando a dinâmica vascular das mudanças estruturais; **(B)** Imagem 2D da musculatura esquelética em vasos sanguíneos de camundongos com tumor de cólon humano; **(C)** Diagrama demonstrando a mudança concomitante nos pericitos (vermelho) e na membrana basal (azul); **(D)** Fatores pró- e anti-angiogênicos no tecido que interferem nas mudanças fenotípicas da vasculatura. Modificada de Rakesh, 2005.

A utilização de fármacos anti-angiogênicos, como o Bevacizumabe (anti-VEGF), tem obtido bons resultados na normalização do tumor, demonstrando que os vasos imaturos, ramificados e que não são cobertos com pericitos mudam para vasos eficientes, mediante re-estruturação da membrana basal (RAKESH, 2005).

Estes resultados foram inicialmente descobertos porque as drogas anti-angiogênicas, como bevacizumabe, sozinhas não apresentavam benefícios no tempo de sobrevida dos pacientes. No entanto, na combinação de quimioterápicos com bevacizumabe, houve um aumento de 5 meses na sobrevida de pacientes com câncer colorretal (RAKESH *et al.*, 2006; SANDLER *et al.*, 2006). Este efeito foi visto pela inibição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2), que levaram a normalização da vasculatura do tumor e microambiente, em vários modelos tumorais. Esses dados foram apresentados em dois trabalhos independentes, na qual o Bevacizumabe e o DC101 (anticorpo anti-VEGFR2) remodelaram a vasculatura de animais com xenotransplante de câncer de colon humano (TONG *et al.*, 2004) e glioma (WINKLER *et al.*, 2004).

Em um outro estudo, foi visto que dos camundongos que não receberam bevacizumabe e que possuíam tumor de ovário ou esôfago, somente 10% dos vasos presentes em cada tumor tinha cobertura pericítica, sendo que após o tratamento com bevacizumabe 75% dos vasos em cada tumor passou a apresentar cobertura pericítica, sendo este um importante sinal de normalização vascular (ARJAANS *et al.*, 2013).

A normalização vascular é identificada através dos seguintes fatores: o amadurecimento de células perivasculares, o fluxo sanguíneo se torna mais homogêneo, ocorre diminuição do extravasamento, aumento da oxigenação, e ocorre uma chegada sistêmica mais uniforme de fármacos no tumor (RAKESH *et al.*, 2001).

1.2. Exercício físico como “normalizador vascular”:

Embora tenham sido vistos bons resultados, a “normalização vascular” usando agentes anti-angiogênicos apresentam duas grandes limitações, i) existe uma pequena janela de eficácia, e ii) os efeitos adversos podem ser grandes, podendo levar a hemorragias e trombose (ELICE & RODEGHIRO, 2012). Por isso, deve ser analisado

muito bem o tempo e a concentração dos agentes anti-angiogênicos utilizados nos pacientes. Com isso, uma nova modalidade para “normalização vascular” tem sido estudada, utilizando o exercício físico (SCHADLER *et al.*, 2016).

Foi observado por Betof e colaboradores (2015) que o exercício voluntário estatisticamente reduziu o crescimento do tumor, aumentando a apoptose de células tumorais e a perfusão tumoral, como resultado da normalização dos vasos, tanto em tumores de células positivas ou negativas a receptores de estrógenos, além de terem sido observadas a redução na hipóxia intratumoral e o aumento da densidade dos microvasos, comparando o grupo exposto ao exercício físico em relação ao grupo controle sedentário. Isso demonstra o impacto que o exercício físico pode ter como conduta adjuvante ao tratamento dos tumores, inclusive com a possibilidade de diminuição de doses de anti-angiogênicos, e diminuindo a possibilidade de efeito tóxico das drogas. ,

Os principais mecanismos moleculares envolvidos no processo de “normalização” pelo exercício são: 1) aumento da associação de pericitos com células endoteliais; 2) aumento do “shear stress” na parede vascular do tumor, levando ao aumento de VEGF-A, osteopontina, proteína inflamatória de macrófago 1 α nas células endoteliais; e 3) aumento da expressão de trombospondina 1 em células endoteliais, levando a normalização vascular (KOELWYN *et al.*, 2017). O aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico, um mediador crítico de angiogênese tumoral e metástase, também parece estar relacionado para induzir a maturação vascular e função regular dos vasos linfáticos (FUKUMURA *et al.*, 2006).

Evidências pré-clínicas e clínicas sugerem que o exercício é responsável por promover (1) controle da progressão tumoral, (2) aumento da eficácia do tratamento anti-câncer, (3) redução de doença residual e (4) diminuir os efeitos adversos relacionados ao câncer e a terapia (ASHCRAFT *et al.*, 2016, CORMIE *et al.*, 2017), reduzindo inclusive os riscos pós-operatórios, atuando tanto localmente como sistemicamente, impactando as funções pulmonares, cardiocirculatórias, músculo esqueléticas, dentre outros.

Na resposta sistêmica, o exercício pode mediar redução da metástase (ASHCRAFT *et al.*, 2016), redução ou inibição da caquexia (ALVES *et al.*, 2015) e

aumento da resposta imune (ASHCRAFT *et al.*, 2016). Na atividade sistêmica, especificamente na região neuro-sensorial, o exercício promove liberação de vários neurotransmissores e hormônios (como catecolaminas, miocinas, serotoninas, endorfinas, etc.), além de ser responsável por ativação simpática, aumento do fluxo sanguíneo e o aumento da temperatura corporal, atuando direta ou indiretamente na resposta ao tumor, que terão efeitos principalmente no aumento da perfusão sanguínea e imunogenicidade, como detalhado abaixo (JOHN *et al.*, 2014).

A caquexia é um processo de debilitação do indivíduo, sendo um dos principais responsáveis pela morbidade como consequência da progressão do tumor, sendo caracterizado por perda de peso, através do catabolismo do músculo esquelético e tecido adiposo, levando o paciente a redução da mobilidade e da função muscular, além de causar fadiga, diminuição da qualidade de vida, culminando na morte do paciente, que geralmente ocorre após perda de 25-30% da massa total do corpo. O exercício físico estimula a síntese de proteína e a redução da degradação de proteína, portanto aumentando a força do músculo, função física e qualidade de vida (ALVES *et al.*, 2015). Portanto, estudos de uma revisão sistemática tem demonstrado que implementar o exercício físico após o diagnóstico do câncer, pode ser uma causa importante para evitar a morte dos pacientes (CORMIE *et al.*, 2017).

Dentre as potencialidades no tratamento utilizando exercício físico, está a combinação do exercício físico com a quimioterapia. Alguns estudos tem demonstrado a potencialização desta combinação (BETOF *et al.*, 2015; SCHADLER *et al.*, 2016) assim como quando é combinado o bevacizumabe com quimioterapia. Tanto o exercício como o bevacizumabe tem um potencial papel como “normalizador” de vasculatura, aumentando a perfusão tumoral e a chegada dos fármacos anti-neoplásicos no tumor, aumentando os efeitos do tratamento.

A combinação do aumento do fluxo sanguíneo e maior pressão arterial promovida pelo exercício, colaboram para maior pressão dentro do tumor, que aumenta a perfusão do sangue em vasos sanguíneos tumorais que não estavam sendo irrigados quando os animais estavam em repouso, por isso o exercício facilita a distribuição homogênea do fluxo sanguíneo no tumor, diminuindo assim a hipóxia (McCULLOUGH *et al.*, 2014).

Tanto a diminuição da hipóxia como aumento da perfusão podem colaborar para as respostas imunológicas resultantes do exercício, sendo que o exercício agudo e o exercício crônico possuem diferentes respostas que ativam o sistema imune inato e o adaptativo de diferentes maneiras (LEANDRO *et al.*, 2007).

No estado fisiológico saudável, enquanto o exercício agudo (frequência alta de exercícios em curto espaço de tempo) aumenta o número células circulantes pró-inflamatórias (como por exemplo, monócitos, neutrófilos, e células Natural Killers [NK]) como um consequência do aumento do fluxo sanguíneo, e induz a ativação do receptor β 2-adrenérgico induzido por catecolamina, que estimula células imunológicas (WALSH *et al.*, 2011). O exercício crônico (frequência baixa de exercícios em grande espaço de tempo) diminui o número de monócitos pró-inflamatórios circulantes (CD14 e CD16 -positivos) e reduz a resposta inflamatória mielóide, medido pela redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF) produzidas por lipopolisacarídeo (LPS) em monócitos, e diminuindo a quantidade de neutrófilos (PYNE *et al.*, 1995).

O exercício promove em vários modelos de câncer o favorecimento de macrófagos peritoniais com perfil pró-inflamatório de fenótipo M1, sendo estes anti-tumorigênicos. Foi visto em uma análise de modelo de câncer de mama de camundongo induzido quimicamente, que o exercício atuou diminuindo o desenvolvimento do tumor e promoveu ativação de macrófagos M1, evidenciado por aumento de IFN γ , TNF e IL-12 induzido por LPS, enquanto que os macrófagos peritoniais de camundongos não expostos ao exercício exibiram elevada proporção de macrófagos pró-tumorigênicos M2, evidenciado pelo aumento de IL-10 e TGF β induzido pela ativação com LPS (ABDALLA *et al.*, 2014).

Murphy e colaboradores (MURPHY *et al.*, 1985) observaram que o exercício inibiu o crescimento metastático em camundongos, e macrófagos peritoniais isolados apresentaram aumentada citotoxicidade em células B16 *in vitro*.

Assim como o VEGF, o Fator induzido por hipóxia (HIF) também exerce importante papel, na indução da formação de vasos, promovendo também um ruim processo de perfusão e oxigenação no tumor, que cria um ciclo vicioso de oxigenação e de re-oxigenação, que assim como falado acima, colabora com o perfil agressivo das células tumorais (CARMELIET *et al.*, 2000).

HIF também tem um importante papel em células imunes infiltrantes no tumor. Os mediadores HIF-1 α e HIF-2 são importantes na modulação da função imune, na qual apresentam opostas funções na polarização de macrófagos M1 e M2. Macrófagos M1 parecem estar associados com níveis de expressão de HIF-1 α , enquanto macrófagos M2 no tumor estão associados com HIF-2 (HARRIS *et al.*, 2014). A hipóxia parece principalmente, mas não exclusivamente, facilitar a manutenção de um microambiente pró-angiogênico e imunossupressor, por ativar expressão de VEGF, recrutando células T-regulatórias, e aumentando a expressão de PD-L1, que diminui a resposta anti-tumoral de células T citotóxica. Os sinais parácrinos ativados por HIF promovem um ambiente imunossupressor, por recrutar células T-regulatórias, promovendo polarização de macrófagos M2 e aumento da expressão de PD-L1, na qual é associado com pior sobrevivência do paciente. Assim, independentemente da associação de HIF-1 α com a maturação dos macrófagos M1, a hipóxia tem um importante papel na progressão e imuno-supressão do tumor.

A hipóxia está presente em tumores de melanoma, e tem sido visto que nestas condições, as células de melanoma com mutação *BRAF*^{V600E} rapidamente se tornam resistentes ao Vemurafenibe. Isso foi observado tanto em análise 3D utilizando modelo em esferóides tumorais, como análise em cultura 2D, em condições de hipóxia, na qual houve aumento de regulação HGF/MET como um principal mecanismo associado com a resistência ao vemurafenibe (QIN *et al.*, 2016). No entanto, quando houve inibição farmacológica do c-Met/Akt esta resistência foi revertida. Com isso, nos perguntamos se teria o exercício um papel importante nestes melanomas para tentar reduzir a hipóxia e também reverter a resistência destes tumores aos fármacos.

A frequência de mutação no gene BRAF está em torno de 40%, das quais mais de 90% das mutações são *BRAF*^{V600E}, sendo esta mutação específica um importante marcador terapêutico para tratamento por vemurafenibe. No entanto, tanto o vemurafenibe como outros inibidores desta via de sinalização apresentam curta duração de resposta dos pacientes. Com isso, o exercício talvez tenha um importante papel nestes modelos de melanoma para sensibilizar tumores de melanoma ao vemurafenibe ou à outros quimioterápicos.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista:

(1) A função do exercício físico, e também de fármacos anti-angiogênicos, como importantes mediadores de resposta a quimioterapia, atuando na normalização vascular, que consequentemente diminui a hipóxia e aumenta o efeito do sistema imune, levando a diminuição do tumor.

(2) A prospecção de ensaios clínicos registrados no site www.clinicaltrials.gov, que demonstra vários estudos matriculados utilizando exercício físico para aumentar a eficiência do tratamento ou aumentar a qualidade de vida dos pacientes, associado ou não a algum quimioterápico (Site do clinicaltrials.gov).

(3) Os altos índices de morte de pacientes com melanoma avançado no Brasil, principalmente os pacientes com mutação *BRAF*^{V600E}, que geralmente apresentam uma rápida recidiva.

Este trabalho se propõe a realizar análise da eficácia do exercício físico em alterar o tamanho e a fisiologia vascular do tumor de melanoma com mutação em *BRAF*^{V600E}, comparando com camundongos sedentários.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL:

- Analisaremos o papel do exercício físico voluntário na função vascular de tumores gerados com linhagem de melanoma humano *BRAF^{V600E}* em animais imunocomprometidos .

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Padronizar a execução e a quantificação do exercício, utilizando a gaiola adaptada, a roda e o contador da distância percorrida, para camundongos BALB / c NUDE;
- Analisar a formação do tumor gerado por uma linhagem de melanoma humano com mutação *BRAF^{V600E}*, observando tanto a morfologia macroscópica como a coloração histológica com hematoxilina/eosina no corte histológico;
- Examinar o tamanho do tumor e a sobrevida livre de tumores por Kaplan Mayer, comparando os dois grupos de animais (sedentário X exercício voluntário);
- Identificar a expressão de genes marcadores de macrófagos M1 e M2 por Real-Time PCR;
- Analisar a expressão gênica dos tumores dos animais exercitados e sedentários para genes envolvidos com pluripotência, resistência, proliferação, metabolismo e morte celular utilizando a Plataforma Fluidigm Dynamic Arrays;
- Proceder a marcação e quantificação dos anticorpos anti-CD31 e anti-pimonidazol por imunoistoquímica para avaliar a estrutura dos microvassos e condições de hipóxia em tumores gerados pela linhagem UACC-62.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Manutenção da linhagem celular UACC-62 contendo *BRAF* mutado (*BRAF*^{V600E}):

Neste trabalho foi utilizada a linhagem celular de melanoma humano UACC-62, cultivada em meio DMEM 10% SFB. Esta linhagem foi mantida de acordo com as recomendações do American Type Culture Collection (ATCC). Como controle de qualidade da cultura celular, foram procedidos mensalmente testes para detecção de micoplasma por Real-Time PCR, conforme estabelecido pelo laboratório, e a linhagem foi mantida sob baixos sub-cultivos após o descongelamento.

Esta linhagem celular contém *BRAF* mutado (*BRAF*^{V600E}), determinado pelo nosso grupo, mais especificamente pela pesquisadora Priscila Cirilo, tendo sido utilizado os primers com sequência abaixo para detecção (Tabela 1). Além disso, esta informação também pode ser confirmada na consulta ao site do Instituto Suíço de Bioinformática (ExPASy) (Site do ExPASy).

Tabela 1 - Sequência dos pares de *primers* utilizados para identificação da mutação no gene B-RAF (V600E) na linhagem de melanoma humano UACC-62, e do controle endógeno GAPDH, utilizando a metodologia Real-Time PCR.

Primer	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
B-RAF (V600E)	5'-AAACTCTTCATAATGCTTGCTCTG-3'	5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGAA-3'
GAPDH	5'-TGCACCACCACCTGCTTAGC-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

4.2. Padronização do exercício espontâneo em animais enxertados com tumores gerados com a linhagem UACC-62:

Nos experimentos com a roda de exercício, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem Balb/c NUDE, com idades entre 6 e 8 semanas. Os animais utilizados são *Specific Pathogen Free* (SPF) provenientes do biotério central da

Faculdade de Medicina da USP e foram mantidos em unidades microisoladoras, dispostas em *racks*, com temperatura controlada entre 20 °C à 25 °C, com ciclo de fotoperíodo de 12/12 horas. Os animais foram manipulados experimentalmente somente 7 dias após estes serem liberados para experimentação pelo biotério central, ficando estes por um período de aclimação no biotério experimental. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da FMUSP/USP (Anexo A).

Foram inoculadas em torno de 1×10^6 células tumorais na região dorsal dos animais, utilizando como veículo 100 μ L de meio DMEM sem soro fetal bovino. O acompanhamento da formação inicial do tumor foi feito através da detecção de uma massa tumoral palpável não mensurável (PNM) e, após o crescimento do tumor, foram medidos o tamanho destes utilizando um paquímetro, e a fórmula do volume foi calculada como a forma de um esferóide ($V=0,52 \times d^2 \times D$), onde V = volume, d = dimensão menor do tumor e D = dimensão maior do tumor. Após a inoculação do implante sub cutâneo de melanoma, os animais foram separados aleatoriamente, entre grupo sedentário (7 animais) e grupo exercício voluntário (7 animais), na qual cada animal foi mantido em um único microisolador. Cinco dias após isto, os animais foram separados nas caixas com as rodas de exercício, e foram eutanasiados quando o tumor alcançou entre 450-700 mm³, como demonstrado no esquema da Figura 2. As medições da distância percorrida pelos animais, a averiguação da roda de exercícios e o relógio marcador de distância para ver se funcionavam corretamente foram feitas duas vezes ao dia, ao final de cada fotoperíodo. A medida do tamanho dos tumores foi feita uma vez por dia.

Figura 2 - Desenho esquemático demonstrando o cronograma do experimento do exercício espontâneo realizado com os animais Balb/c NUDE.

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados e eutanasiados em câmara com CO₂, de anestésico e os tumores removidos cirurgicamente, sendo estes utilizados para os seguintes armazenamentos/análises: i) mantido congelado, para

análise por imunofluorescência, ii) mantido em formol 10%, para análise por imunoistoquímica, e iii) mantido em Trizol Reagent (Ambion – Life Technologies), para análise por Real Time-PCR.

4.3. Avaliação da hipóxia nos tumores utilizando o reagente pimonidazol:

Para análise da distribuição de oxigênio e detecção de regiões de hipóxia no tumor, foi utilizado o reagente pimonidazol, que foi fornecido e utilizado sobre a forma do kit HipoxiprobeTM-1 Omni Kit (HPI catalog # HP3-XXX). Sendo o reagente pimonidazol, um reagente 2-nitroimidazol que é ativado em células hipóxicas, com baixa concentração de O₂, e que forma nestas condições adutos covalentes estáveis com grupos tióis em proteínas, peptídeos e aminoácidos, como demonstrado no trabalho de Varia e colaboradores (1998). Posteriormente, para serem feitas análises destas áreas de hipóxia, foi utilizado o anticorpo anti-pimonidazol PAb2627AP (fornecido pelo kit) que se liga aos adutos formados, reagente este que também acompanha o kit acima, e foi procedido técnica de imunoistoquímica.

O reagente pimonidazol foi injetado por via intraperitoneal na dosagem de 60 mg/Kg, 90 minutos antes da eutanásia dos animais. Após a morte do animal, foi procedida a retirada dos tumores e órgãos para ser procedido a técnica de imunoistoquímica.

4.4. Preparo da caixa de exercícios e quantificação do exercício físico voluntário:

As gaiolas utilizadas foram microisoladores com dimensão externa de 30 cm X 20 cm X 23 cm contendo filtro em algodão, na qual foram adaptadas rodas de exercício para atividade física voluntária do animal. A roda possuía comprimento calculado em 32,97 cm, e o contador digital fazia mensuração do caminho percorrido em quilômetros (km), com base no diâmetro da roda. Na Figura 3A e 3B, são apresentadas a roda e o contador para o exercício voluntário e o sistema montado em um microisolador.

A)

marcador digital de velocidade e
distância percorrida

B)

marcador digital de velocidade
e distância percorrida

Figura 3 – Sistema de roda para exercício espontâneo e marcador digital de velocidade e distância percorrida (A). Microisolador montado com grade de fornecimento de alimento e água, e roda de exercícios acoplado a marcador digital de velocidade e distância percorrida (B).

Tanto as rodas de exercícios como os marcadores de giros das rodas foram adquiridos com a empresa AVS Projetos. Como demonstrado na Figura 4, os sensores de giros eram detectores de giros de bicicletas que foram adaptados para fazerem as medidas com base nos ímãs acoplados nas rodas, como demonstrado na figura abaixo (círculo em vermelho).

Figura 4 - Demonstração do ímã preso na roda de exercícios (círculo vermelho). Utilizado para auxiliar o marcador digital de velocidade e distância a contabilizar o caminho percorrido.

4.5. Análise de expressão gênica:

Para análise quantitativa da expressão gênica para os genes indicativos de polarização de macrófagos M1 ou M2 foi procedido Real Time PCR, e para análise da expressão gênica de genes relacionados a pluripotência, resistência, proliferação, alterações epigenéticas e alterações vasculares por screening em larga escala foi utilizado a Plataforma Fluidigm Dynamic Array. No entanto previamente foram procedidas a extração e síntese de cDNA.

Extração de RNA e Síntese de cDNA:

Para a extração de RNA das amostras, foi utilizado o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo do fabricante. Em seguida o RNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro e a qualidade da extração (integridade do RNA) foi analisada em gel de agarose 1% para detecção das bandas ribossomais.

Na síntese de cDNA, o RNA obtido foi convertido em cDNA através da reação de transcrição reversa. Os reagentes utilizados foram Oligo dT, dNTP mix (10 mM) e água contendo Dicarbonato de Dietila (DEPC), e as amostras foram incubadas a 65 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriadas em gelo por 1 minuto. Decorrido esse tempo, foram adicionadas às amostras de RNA: tampão (5X First Strand Buffer); DTT (0,1 M); RNase OUT (40 U/μl) e Superscript III RT (200 U/μl, Life Technologies), e homogeneizadas, centrifugadas e incubadas por 50 minutos a 50°C. Ao final desse

período, incubamos cada amostra a 85⁰C por 5 minutos e, a seguir, resfriamos cada amostra em gelo. Para cada reação adicionamos 1 µl de RNase e incubamos por 20 minutos a 37⁰C. Em seguida o cDNA foi utilizado para a reação de PCR quantitativo (ou Real Time PCR).

Real-Time PCR:

Na análise de expressão gênica em tempo real foi utilizada a metodologia do SYBR Green. Primeiramente, foi preparada a seguinte mistura (*mix*) para cada amostra: 10 µl do SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies), primers forward e reverse (específicos para cada gene) e o volume foi completado para 20 µl com água ultrapura. Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado e adicionado de 1 a 2 µl da amostra de cDNA em cada poço da placa ou em cada microtubo sobre o gelo. Logo após, adicionamos 18 a 19 µl do *mix* em cada amostra (perfazendo um volume final de 20 µl por poço) e as amostras foram homogeneizadas. A amplificação gênica foi realizada utilizando-se o equipamento de Real Time modelo 7.500 (Applied Biosystems; Life Technologies). Nessa etapa foram analisados os níveis de expressão de genes relacionados a polarização de macrófagos M1 ou M2, comparando-se as amostras dos tumores de animais sedentários, animais exercitados < 4 km e animais exercitados entre 18-20 km. Hipoxantina-guanina Fosforibosiltransferase (HPRT) foi utilizado como controle endógeno. A quantificação relativa da expressão gênica foi calculada utilizando $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os genes analisados foram para perfil de polarização M1 (Interleucina-12p40 [IL-12] e Óxido Nítrico Sintase [iNOS]), e perfil de polarização M2 (Interleucina-10 [IL-10], Arginase-1 [Arg1] e Receptor 1 de Manose de Macrófago [MRC-1]), contendo os primers para genes murino abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados para identificação da polarização de macrófagos M1 e M2 nos tumores dos animais, por Real Time PCR

Primer	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
IL-10	5'-ACTTGCTCTTGCACTACCAAAGCC-3'	5'-GCATGTGGCTCTGGCCGACTG-3'
IL-12p40	5'-AGCAGTAGCAGTTCCCCTGA-3'	5'-AGTCCCTTTGGTCCAGTGTG-3'
iNOS	5'-CAGGAACCTACCAGCTCACTCT-3'	5'-ATGTGCTGAAACATTTCTGTG-3'
Arg1	5'-GAACCCAACCTTTGGGAAGAC-3'	5'-GGAGAAGGCGTTTGCTTAGTT-3'
MRC-1	5'-TTTGCAAGCTTGTAGGAAGGA-3'	5'-CCAATCCACAGCTCATCATTT-3'
HPRT	5'-AGGCCAGACTTTGTTGGATTT-3'	5'-GGCTTTGTATTTGGCTTTTCC-3'

Fluidigm Dynamic Array:

A análise de expressão gênica em larga escala foi procedida utilizando a Plataforma Fluidigm (Juno-Biomark HD), pertencente a rede de equipamentos do Centro Translacional em Oncologia (ICESP), realizada pelas funcionárias/pesquisadoras do serviço, Miyuki Uno e Tatiane Furuya.

Na análise de expressão gênica foi utilizado a plataforma 96.96 dynamic array, avaliando genes envolvidos com pluripotência, proliferação, resistência, metástase, angiogênese, metabolismo, morte celular, reparo celular e epigenética, como demonstrado na lista dos *primers* no Anexo B. Simplificadamente a técnica foi realizada da seguinte forma: foi procedida a transcrição reversa a partir de RNA total (intervalo de concentração de 2,5 pg a 250 ng) utilizando uma mistura de *random primers* e *oligo dT*. O DNA complementar (cDNA) foi submetido a uma etapa de pré-amplificação alvo-específica utilizando-se um *pool* contendo *primers* para os transcritos de interesse. Em seguida, esse cDNA foi submetido a amplificação por meio de PCR quantitativa para detecção dos níveis de expressão dos genes de interesse utilizando o corante *EvaGreen*.

Os primers foram pré-desenhados para o método quantitativo Real Time PCR contendo 96 genes humanos, utilizando software D3 da Fluidigm, incluindo os genes endógenos (7 genes), para a pré-amplificação necessária para a Plataforma Fluidigm. A pré-amplificação e as amostras foram preparadas de acordo com as recomendações da Fluidigm, utilizando os reagentes *EvaGreen*. O desenho da placa está sendo demonstrado com os 96 genes utilizados na plataforma Fluidigm no Anexo C.

Após ser procedido o ensaio na Plataforma Fluidigm, os resultados experimentais foram tratados da seguinte forma: foi feito a correção do Threshold das amostras, em seguida foram excluídas as amostras que tiveram Ct value não confiável (999), contendo genes em particular para somente uma amostra, assim como os genes que não funcionaram para todas as amostras (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, e 13). Tendo como genes excluídos, os seguintes: ABCC3, ALDH3A1, CD34, IL17, LOX, MMP12, MMP9, NLRP3, NOS2 e NOTCH4. Em seguida, foi utilizado o programa NormFinder para identificar o melhor gene endógeno para ser utilizado nas análises dentre os sete gene endógenos da reação (ACTB, B2M, GAPDH, GUSB, HPRT1,

RPLPO, TRFC). Tendo sido utilizado como melhor gene endógeno o RPLPO sozinho (Stability value 0,044), ou a combinação dos dois genes, o B2M e o RPLPO (Stability value 0,037). Utilizando a combinação dos genes B2M e RPLPO foi analisado o $2^{-\Delta CT}$, e o resultado dos três grupos de animais foram analisados no software Multi Experiment Viewer (MeV) para avaliar a relação estatística e gerar o Heatmap. Finalmente, a análise estatística utilizada foi Análise não Paramétrica com Teste de Willcoxon Rank Sum, baseado na significância de FDR=0,49 (Benjamini-Hochberg).

4.6. Histologia e Imunoistoquímica:

No corte e análise dos tumores nas lâminas, tanto utilizando coloração com HE e análise por imunoistoquímica, somente sete tumores de animais foram utilizados (CX 3, 5, 6, 9, 11, 12 e 13), o restante dos animais foi separado para imunofluorescência e extração de RNA. Devido ao pequeno tamanho dos tumores não conseguimos separar material suficiente de cada tumor para todas as análises (imunofluorescência, imunoistoquímica e Real Time PCR).

Após os tumores serem retirados cirurgicamente dos camundongos, estes foram lavados em solução salina PBS e mantidos em formol 10% (Q Artifice Farmácia) por 24 horas. No dia seguinte, o formol 10% foi substituído pelo Alcool 70%, e processado conforme explicado a seguir.

As etapas de emblocamento do tumor, cortes em lâminas silanizadas e coloração dos tecidos com Hematoxilina & Eosina (HE, Hematoxilina EEL e Eosina VETEC) foram procedidas pelo setor de Patologia do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do ICESP (CTO-ICESP). Para as análises de imunoistoquímica, contendo as etapas de desparafinização dos cortes, hidratação, recuperação antigênica, bloqueio, incubação com anticorpos primário e secundário, revelação, contra-coloração, desidratação e montagem das lâminas, foi procedido no nosso laboratório, conforme descrito abaixo.

Os procedimentos experimentais de imunoistoquímica para detecção de CD31 (anti-CD31, PECAM-1 D8V9EXP Rabbit mab - 776995) e pimonidazol (anti-pimonidazol, kit HipoxiprobeTM-1 Omni Kit) foram realizados utilizando o seguinte protocolo: a desparafinização do tecido foi realizada deixando as lâminas em estufa a

60°C por 30 minutos, seguido por 10 minutos mergulhando as lâminas em Xilol 1 e Xilol 2; em seguida foi feita a hidratação do tecido, fazendo mergulhos consecutivos por 5 minutos no Alcool 100%, 95%, 70% e lavagem em água mili-Q. A recuperação antigênica foi realizada mergulhando as lâminas em tampão citrato (1 molar, pH 6,0), por 20 minutos à 95°C, seguindo com uma nova lavagem com água mili-Q. Posteriormente foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por 10 minutos com a solução do kit de detecção da Abcam (ab64261), seguida pela lavagem com água mili-Q; o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com a solução de bloqueio do kit por 5 minutos, seguido pela incubação com anticorpo primário nas suas devidas concentrações, na condição *overnight* à 4°C; as lâminas foram lavadas com PBS, seguido pela incubação com anti-*rabbit* por 10 minutos; seguido por lavagem com PBS; depois incubação com polímero Streptavidina Peroxidase por 10 minutos, presente no kit; outra lavagem com PBS; seguido por incubação com cromógeno DAB por 1 minuto e 30 segundos; logo depois as lâminas foram lavadas com água-mili Q; seguido por coloração com Hematoxilina de Harris por 30 segundos; lavagem em água corrente; tendo como ponto final a desidratação, com 10 mergulhos em álcool 70%, 95% e 100% e depois 10 mergulhos em xilol 1 e 2, seguido pela montagem, utilizando uma lamínula aderida com Entellan no corte do tecido. O kit de detecção anti-Rabbit da abcam (ab64261) foi utilizando tanto para o anti-CD31 como para o anti-pimonidazol.

Tanto na técnica de imunoistoquímica utilizada para o CD31 assim como para o pimonidazol, somente foi alterada a concentração dos anticorpos utilizados. No caso do anticorpo anti-CD31 foi utilizada uma diluição de 1:30 do frasco original, no caso do anti-pimonidazol foi utilizada uma diluição de 1:50.

A análise e montagem das imagens das lâminas foram feitas utilizando o microscópio pertencente aos sistema EVOS FL Auto Cell Imaging, da empresa Invitrogen. As imagens das regiões necróticas e em hipóxia foram procedidas utilizando o software ImageJ (ImageJ 1.51h). A porcentagem da área necrótica foi determinada dividindo o valor da área necrótica pela área total do tecido, enquanto que a densidade de vasos (CD31) foi determinado dividindo o número de vasos pela área total do tecido (em mm²), e o resultado apresentado em Número de Vasos/mm².

4.7. Análise estatística:

Para as análises estatísticas das quantificações das regiões de necrose por HE, marcação de hipóxia e marcação com CD31 por imunoistoquímica, foi realizado o teste não Paramétrico One-way Anova com Kruskal Wallis pós teste, com o software GraphPad Prism 5.

As análises de sobrevida por Kaplan-Meier e da eutanásia do animal quando o tumor alcançou entre 450-700 mm³ foram procedidas utilizando o programa GraphPad Prism 5.

As análises acima foram procedidas considerando-se três grupos experimentais: grupo de animais sedentários, grupo de animais exercitados < 4 km e grupo de animais exercitados entre 18-20 km.

5. RESULTADOS

5.1. Formação do tumor com implante sub cutâneo da célula UACC-62 e distância percorrida pelos animais:

Dentre algumas linhagens celulares com mutação em *BRAF* (*BRAF^{V600E}*) que apresentávamos no laboratório, optamos pela linhagem UACC-62 para realizar o implante sub cutâneo.

Os animais, em média, obtiveram massa PNM após 4 dias da injeção sub cutânea no dorso com células tumorais, e em sua grande maioria levaram aproximadamente 15 dias após a inoculação das células para desenvolver tumor com tamanho de 450-700 mm³, medidos com o paquímetro digital, externamente à pele. Após o sacrifício e excisão cirúrgica dos tumores, estes apresentavam-se melanizados (cor escura) e eram altamente vascularizados e hemorrágicos, apresentando-se em cápsula hemorrágica, como demonstrado na figura abaixo (Figura 5A e 5B).

Figura 5 - Tumor hemorrágico demonstrado no dorso do camundongo Balb/c NUDE gerado pela linhagem de melanoma humano UACC-62 (A), e tumor após excisão cirúrgica lavado com solução salina de PBS, demonstrando a melanização no tecido (B).

Neste primeiro experimento, foi utilizado um grupo de 13 animais, na qual 6 animais foram separados em gaiolas sem rodas e 7 animais separados em gaiolas com roda, sendo 1 animal em cada gaiola. Todos os animais que estiveram em gaiolas com

rodas de exercício percorreram um determinado percurso, no entanto, o grupo exercitado se subdividiu em dois grupos, ficando três grupos no total: animais sedentários (CX1-CX6), animais exercitados < 4 km (CX10, CX12 e CX13) e animais exercitados entre 18-20 km (CX7, CX8, CX9 e CX11).

Os animais aqui utilizados fizeram maior atividade com exercício voluntário durante à noite, após as luzes do biotério serem apagadas.

Na tabela 3 são apresentados o volume do tumor e a distância percorrida (km) para cada animal no final do experimento. Com estas medidas foram realizadas a análise de sobrevida livre de tumores $\geq 450 \text{ mm}^3$ (por Kaplan-Meier; Gráfico 1A) e análise da eutanásia do animal quando o tumor alcança entre 450-700 mm^3 (Gráfico 1B), nestes três grupos de animais.

Tabela 3 - Descrição dos volumes dos tumores (mm^3) e da distância percorrida no total do experimento (km), pelos 13 animais utilizados neste projeto. Foram dispostos 6 animais em gaiola sem roda e 7 animais em gaiola com roda. Medidas feitas no dia em que os animais foram eutanasiados. (*) Durante todo o tempo de exposição as rodas de exercícios.

	Animal	Volume do Tumor (mm^3)	Distância Total Percorrida (km) *
Animais sem Roda	1	556,94	
	2	562,00	
	3	607,70	
	4	643,98	
	5	454,34	
	6	603,06	
Animais com Roda	7	711,55	18,55
	8	530,40	18,3
	9	521,50	19,1
	10	644,80	0,4
	11	550,92	20,1
	12	515,26	2,15
	13	580,79	3,7

No resultado obtido na análise de sobrevida por Kaplan-Meier, o grupo sedentário apresentou maior sobrevida livre de tumores $\geq 450 \text{ mm}^3$, seguido pelo grupo exercício voluntário $< 4 \text{ km}$ e depois pelo grupo exercício voluntário 18-20 km, sendo que estes dois últimos grupos foram semelhantes, com pequena diferença observada em torno do 10º dia depois de ser adicionado a roda de exercícios (Gráfico 1A).

Na análise da eutanásia do animal, foi observada uma tendência do grupo sedentário levar maior tempo para alcançar o volume entre 450-700 mm^3 , seguido pelo exercício voluntário $< 4 \text{ km}$ e o exercício voluntário 18-20 km (Gráfico 1B), respectivamente, semelhante o resultado da análise da sobrevida por Kaplan Mayer, ou seja, parece que o exercício influenciou no aumento do tumor. As diferenças, porém não são estatisticamente significativas.

Gráfico 1 - Análise do crescimento dos tumores mediante o exercício espontâneo. Curva de sobrevida livre de tumores $>450 \text{ mm}^3$ por Kaplan-Meier (%) (A; $p=0,6634$), e dia de eutanásia do animal quando o tumor alcançou entre 450-700 mm^3 (B; $p=0,5301$), dos grupos sedentário, exercício voluntário $< 4 \text{ km}$ e exercício voluntário 18-20 km. A data 0 no gráfico representa o dia em que foi adicionado a roda de exercícios.

Analisando o volume do tumor (mm^3) em relação ao tempo ou a distância percorrida não houve diferença entre os três grupos de animais.

5.2. Análise da Polarização de Macrófagos M1 e M2 por Real-Time PCR:

Na análise da expressão gênica de marcadores de polarização de macrófagos M1 e M2 foram avaliados dois genes relativos a polarização de macrófagos M1 (IL-12p40 e iNOS) e três genes relativos a polarização de macrófagos M2 (IL-10, Arg-1 e MRC-1) (Gráfico 2). Embora a expressão do gene iNOS teve aumento no grupo exercitado < 4 km em relação ao grupo sedentário, demonstrado principalmente pelos animais 1 e 2, o outro marcador de células M1 (IL-12) não demonstrou homogeneidade entre os animais, na qual alguns tiveram expressão de IL-12 maior, e outros tiveram expressão de IL-12 menor em relação ao grupo sedentário.

Dentre os marcadores de macrófagos M2, a expressão gênica da Arginase-1 apresentou-se elevada para os dois grupos dos animais exercitados, sendo que para o marcador IL-10 a expressão dos animais exercitados se manteve igual ao grupo sedentário, e para o gene MRC-1 a expressão foi maior para os animais sedentários em relação aos animais exercitados.

Gráfico 2 - Análise da expressão gênica de marcadores de polarização de macrófagos M1 (iNOS e IL-12p40) e M2 (IL-10, Arginase e MRC1) extraídos dos tumores dos camundongos dos grupos sedentário, grupo exercitado < 4 km e grupo exercitado 18-20 km. Sendo demonstrado por animal de cada grupo, e como uma média dos grupos. Expressão gênica dos grupos dos animais exercitados pelos animais sedentários.

5.3. Análise da expressão gênica utilizando a plataforma Fluidigm:

Na análise da expressão gênica utilizando a plataforma Fluidigm, de todos os 79 genes analisados para os três grupos experimentais neste trabalho, somente houve diferença entre o grupo dos animais exercitados até 4 km em relação aos animais sedentários, sendo que não houve diferença no grupo dos animais exercitados entre 18-20 km em relação aos animais sedentários. O aumento do Fold Change (expressão) detectado foi em 8 genes (gene FLOT2 [Fold Change: 1,17], gene STK4 [Fold Change: 1,18], gene STAT3 [Fold Change: 1,20], gene LATS1 [Fold Change: 1.22], gene PTEN [Fold Change: 1.33], gene MCL1 [Fold Change: 1.35], gene PCNA [Fold Change: 1.37] e gene ACTA2 [Fold Change:1.48]; Figura 6A e 6B), sendo a nomenclatura e as funções apresentadas na tabela abaixo (Tabela 4). O maior aumento de expressão foi do gene ACTA2 (alfa actina demúsculo liso 2) quando comparado os dois grupos, apresentando aumento de 48%.

A)

B)

Figura 6 - Expressão de genes resultante da análise da plataforma do Fluidigm demonstrado em gráfico de barras (A), e pelo dendograma de clusterização associado ao *heat map* (B). Foram identificados 8 genes com aumento da expressão diferencial comparando o grupo dos animais exercitados < 4 km (CX10, CX12 e CX13) com o grupo dos animais sedentários (CX3, CX2, CX4, CX1 e CX6).

Tabela 4 - Gene, nomenclatura e função dos 8 genes diferencialmente expressos quando comparando o grupo dos animais exercitados < 4 km pelo grupo dos animais sedentários, utilizando a plataforma Fluidigm.

GENE	Nomenclatura	Função
FLOT2	Flotilina 2	Codifica uma cavéola (proteína associada a membrana)
STK4	Serina/Treonina kinase 4	Fosforila histona H2B podendo induzir a condensação de cromatina
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3	Fator de transcrição que pode mediar crescimento e apoptose
LATS1	Grande supressor de tumor kinase 1	Reduz a atividade da histona kinase H1. Diminui a proliferação e aumenta a apoptose.
PTEN	Homólogo da fosfatase e tensina	Atua de maneira indireta regulando a progressão no ciclo celular e sobrevivência.
MCL1	Regulador da família apoptótica BCL2	Transcreve um membro da família de Bcl-2. Atua na sobrevivência celular e viabilidade.
PCNA	Antígeno nuclear de células em proliferação	Atua no reparo do DNA
ACTA2	Alfa actina de músculo liso 2 (alfa-SMA2)	Transcreve alfa-SMA2, atuando principalmente na motilidade e estrutura.

5.4. Histologia e imunoistoquímica:

5.4.1. Coloração por hematoxilina & eosina (HE):

✓ Necrose:

A detecção de regiões de necrose foi feita principalmente pela identificação de núcleos picnóticos e coloração levemente rósea (Figura 7A e 7B). No entanto, a porcentagem de áreas de necrose em relação ao tumor total foi similar entre os três grupos de animais, atingindo de 2-4% de necrose em praticamente todos os tumores analisados (Tabela 5), excetuando no tumor da CX3, na qual não foi detectado área de necrose.

Figura 7 - Corte histológico demonstrativo do tumor do animal da CX 13, com coloração por HE. Sendo demonstrado no aumento de 40X (A) e no aumento de 200X (B). A estrutura demonstrada em ambos os cortes é uma área com região necrosada, sendo ressaltado pela coloração rósea (seta branca), e pelos núcleos picnóticos (seta amarela) CADÊ A SETA AMARELA. Imagem procedida utilizando o aparelho EVOS® FL Auto.

5.4.2. Imunoistoquímica:

✓ Hipóxia (anti-pimonidazol):

As áreas das regiões de hipóxia, assim como a detecção de necrose, também foram determinadas por porcentagem relativa em relação ao tumor total, não tendo sido detectado uma reprodutibilidade nestas amostras de detecção de zonas de hipóxia, pois

houve grande variação, excetuando o grupo exercitado até 4 km, que apresentou hipóxia média em torno de 22% (Tabela 5).

Embora as regiões de hipóxia estivessem próximas ou circundando as regiões de necrose, foi possível diferenciá-las pois as regiões de necrose não foram marcadas por DAB, seguindo a detecção do pimonidazol, e também por não apresentarem núcleos picnóticos (Figura 8A e 8B).

Figura 8 - Corte histológico representativo do tumor do animal da CX 12, demonstrando a reação de imunistoquímica anti-pimonidazol. Foi utilizado o método SCAN do aparelho EVOS, para fazer agrupamento e junção de várias imagens (**A**) e no aumento de 40X (**B**). As estruturas identificadas com setas em vermelho são regiões de hipóxia circundando regiões de necrose. Imagem feita utilizando o aparelho EVOS® FL Auto.

✓ CD31 (anti-CD31):

Para as marcações de vasos, geralmente são utilizados dois marcadores para imunistoquímica, anti-CD31 ou anti-CD34. Neste trabalho, foi realizada as marcações para CD31 (Figura 9A e 9B), sendo identificado os vasos pela marcação com DAB. Pode ser visto na figura, vasos colabados (Figura 9A) e um vaso não colabado (com lúmen contendo vestígios de hemácias) (Figura 9B).

Figura 9 - Corte histológico dos tumores dos animais das CX3 e CX5, demonstrando a reação de imunoistoquímica com o anticorpo anti-CD31. As imagens apresentam aumento de 100X em ambas os cortes. Está sendo demonstrado um vaso colabado (A, seta vermelha) e um vaso não colabado com lúmen contendo vestígios de hemácias (B, seta vermelha).

Na detecção de CD31, o grupo sedentário obteve maior quantidade de vasos por mm^2 , tanto em relação ao grupo dos animais exercitados < 4 km como em relação ao grupo de animais exercitados entre 18-20 km (Tabela 5).

Com isso, vimos que dentre as análises feitas por corte de tecido tumoral para análise de histologia e imunoistoquímica, somente a detecção de CD31 obteve diferença nos grupos experimentais, sendo os outros inconclusivos, pois houve grande variação no próprio grupo (Tabela 5).

Tabela 5 - Quantificação de necrose (%), hipóxia e vasos por mm^2 dos tumores dos camundongos dos grupos sedentário, animais exercitados < 4 km e animais exercitado 18-20 km.

		Necrose (%)	Hipóxia (%)	Vasos por mm^2
Grupo sedentário	CX3	0	2,93	33,45
	CX6	4,41	24,29	35,58
Grupo exercitado < 4km	CX9	2,32	20,98	21,30
	CX11	3,18	19,91	26,23
Grupo exercitado 18-20 km	CX12	3,4	5,92	22,53
	CX13	3,59	16,25	24,72

6. DISCUSSÃO

Na década de 1940, os pesquisadores Harold P. Morris (1945) e Van R. Potter (1945) já citavam a importância do exercício e da alimentação para diminuir a incidência de determinados tipos de tumores (coloque as referências aqui).

Atualmente, pesquisadores têm relacionado o exercício não somente à incidência do câncer, mas também à mortalidade, à recorrência e aos efeitos adversos resultante do tratamento (CORMIE *et al.*, 2017). Em grande parte estes fatores se devem como uma consequência do aumento da qualidade de vida destes pacientes, sendo sugerido por alguns autores como um hábito inclusive para ser mantido mesmo após o fim do tratamento oncológico (JONES & ALFANO, 2013).

Em uma revisão sistemática da literatura foi visto que menor mortalidade foi detectada em pacientes que foram expostos ao exercício, em 17 dos 30 estudos, na qual estes estudos envolviam diferentes tipos de tumores, como câncer de mama, câncer colorretal, câncer de próstata assim como outros tipos de cânceres combinados (ASHCRAFT *et al.*, 2016; CORMIE *et al.*, 2017). No caso de recorrência, foi verificado que houve menor índice de recorrência em 4 de um total de 9 estudos comparando-se o efeito do exercício, também com os mesmos tipos de tumores (ASHCRAFT *et al.*, 2016).

O exercício voluntário (corrida em roda) utilizado em análises pré-clínicas para roedores, tem sido adotada, principalmente pelo fato que a corrida é um hábito de vida que não induz ao estresse físico nestes animais, quando comparado com outros tipos de exercícios (RICHTER *et al.*, 2014). Além disso, estes animais geralmente são bons corredores, pelo fato de ser um hábito de sobrevivência, tanto para evitar os predadores como para fins de migração. Fisiologicamente, este hábito também é uma forma de manter o balanço energético do animal, tanto para temperatura corporal como para o metabolismo, principalmente pelo fato destes animais serem fisicamente e metabolicamente muito ativos (RICHTER *et al.*, 2014). Com isso, existem várias vantagens para a utilização do exercício em roda para roedores, e vários resultados tem sido produzidos nos últimos anos.

A despeito dos resultados já apresentados, sobre o efeito do exercício físico no tratamento dos tumores, questões como qual a intensidade, duração, progressão e dose de tratamento devem ser elucidados em cada caso, tanto para o exercício físico como para a quimioterapia combinada. Pois assim como visto para o Bevacizumabe, existem tempo e dose correta para promover a normalização tumoral (RAKESH *et al.*, 2005). Além disso, como seria a influência do exercício no tumor de melanoma.

6.1. Padronização experimental e condução do estudo preliminar:

A fim de assegurar a qualidade do experimento e maior precisão, detectando o percurso correto feito pelo detector de giros, e analisando em qual período do tempo os animais mais se exercitavam, as medições foram feitas no início e no final do fotoperíodo dos animais, por volta das 8 da manhã e 19 da noite (resultados não demonstrados). Além disso, também foi importante para se observar se os animais não estavam subindo em cima das rodas e rodando-as de modo errôneo, e acompanhar por mais tempo como os animais correram.

Os animais utilizados neste trabalho fizeram maior atividade com exercício voluntário durante a noite, após as luzes do biotério serem apagadas (das 19 horas – 7 horas), como também é mencionado no estudo realizado por Fuss e colaboradores (2010), sendo isto já esperado pelo fato dos animais (roedores) apresentarem hábito noturno.

Para evitar que não houvesse interferência de outros animais na mesma roda de exercícios, cada animal foi alocado em uma caixa com roda de exercício separado, para tornar possível a análise individual.

Para não haver problemas na realização do exercício devido o tamanho do tumor, a inoculação das células tumorais foi feita no dorso do animal, além do fato do tamanho máximo permitido para os tumores ter sido estabelecido em 500 mm³. Esse volume foi estabelecido a fim de que não houvessem grande número de regiões de necrose no tumor, e não alterasse as análises laboratoriais da vascular tumoral.

No entanto, neste ensaio, somente 4 animais dos 7 animais correram ou fizeram exercício voluntário como esperado (CX7, CX8, CX9 e CX11). Vários pesquisadores

têm detectado estas variações, que podem ocorrer na mesma espécie, e neste caso a variação poder estar relacionada com a linhagens, sexo, idade ou lote (ninhada), ou em espécies diferentes, conforme relatos publicados na literatura, resumida na tabela abaixo (Tabela 6).

O pesquisador Eikelboom e Mills (1988), trabalhando com ratos Sprague-Dawley, também demonstraram que diferentes animais da mesma espécie obtiveram variações, alcançando uma variação de 1.000-12.000 giros em roda de exercício voluntário por dia.

Com relação aos camundongos, a distância de corrida voluntária percorrida por dia pode variar de 3-12 km (Tabela 6). Somente foram encontrados dois estudos em que animais imunodeprimidos foram avaliados com exercício voluntário, no qual estes animais percorreram distância de 4-6 km/dia, conforme reportado por JONES *et al.* (2010), e 0,6-1,2 km/dia, conforme reportado por HIGGINS *et al.* (2014). No entanto em outros estudos os animais imunodeprimidos geralmente são utilizados no exercício forçado em esteira. Dentre os camundongos, o mais utilizado, apresentando boa eficiência em corrida com exercício voluntário, é a linhagem C57BL/6 (ASHCRAFT *et al.*, 2016). Com isso, tanto os ratos como os camundongos podem apresentar amplo intervalo de variação com relação à distância percorrida por dia.

O fato de haver variações entre as mesmas espécies e as mesmas linhagens de camundongos muitas das vezes já é esperado pelos pesquisadores, já que assim como nos seres humanos, este hábito pode variar de indivíduo para indivíduo (RICHTER *et al.*, 2014). No entanto, em uma análise laboratorial é importante serem comparados grupo de animais que correram a mesma distância, estando submetidos as mesmas condições. Sendo assim, é importante que o grupo dos animais exercitados tenha maior quantidade de animais, para que depois possam ser divididos em subgrupos, de acordo com a distância percorrida, de modo a ter um grupo amostral significativo.

Tabela 6 - Distância percorrida (km/dia) de animais de laboratório (roedores) procedendo exercício voluntário em experimentos de tumorigênese.

Animal	Distância percorrida (km/dia)	Referências
Ratos	5-6	Afonso e Eikelboom (2003)
Lêmingue	19	Kock e Rohn (1971)
Hamster-sírio ou Golden	9	Richards (1966)
Gerbil-da mongólia	8	Roper (1976)
Camundongo	3-12	Lightfoot (2004)

Com isso, é importante que vários parâmetros sejam analisados antes de começarem os estudos, para que não ocorram erros experimentais

Com ênfase no exercício os principais pontos a serem decididos são: 1) tipo do exercício (forçado ou voluntário); 2) intensidade (duração e frequência); 3) cronograma do exercício (exercício pré, pós ou durante o desenvolvimento do tumor ou tratamento).

Neste trabalho, o exercício foi iniciado 5 dias após inoculação do tumor, a fim de que o exercício não interferisse na formação do tumor, já que alguns trabalhos associam o mal desenvolvimento do tumor devido ao exercício (ASHCRAFT *et al.*, 2016). Levando em consideração que o objetivo principal deste trabalho foi a análise vascular, não priorizamos a interferência do exercício na formação do tumor. Esta fase do exercício na clínica, seria como se o paciente tivesse sido indicado a fazer exercícios logo após o diagnóstico do tumor.

O grupo controle/sedentário também apresenta grande importância nas análises dos animais exercitados. É importante que o ambiente o qual o grupo controle está exposto seja o mesmo para o grupo exercitado. Neste trabalho, os animais sedentários e

exercitados ficaram alojados em gaiolas contendo o mesmo tamanho, com água e ração *ad libitum*, porém sem a roda de exercícios (para os sedentários). Kathleen e colaboradores (ASHCRAFT *et al.*, 2016) já haviam abordado a importância da utilização de caixas iguais para os grupos não desenvolvam processos fisiológicos diferentes.

6.2. Exercício e a inibição do tumor:

Em uma análise sistemática sobre vários estudos com exercício e câncer, foi observado que o exercício esteve associado com a diminuição do crescimento do tumor em 64% dos casos, em 21% dos casos foi associado com nenhuma resposta e em 9% dos casos foi associado com aumento do tumor (ASHCRAFT *et al.*, 2016). No caso de nenhuma resposta, demonstrado nos experimentos de Jones e colaboradores (JONES *et al.*, 2010; JONES *et al.*, 2005), foram utilizados camundongos imunocomprometidos, não sendo observado nenhuma diferença estatisticamente significativa tanto no crescimento do tumor como na sobrevivência dos animais, semelhante ao observado neste trabalho de doutorado.

Nessa mesma análise sistemática, também foi verificado que dos animais respondedores, grande parte dos mecanismos envolvidos estavam relacionados com aumento do infiltrado celular, aumento do metabolismo tumoral, aumento da apoptose de células tumorais e re-modelamento vascular (ASHCRAFT *et al.*, 2016).

Com relação a resposta imune tumoral, o exercício parece ser importante em mobilizar células imunes citotóxicas para a circulação como consequência do movimento de *shear stress* (aumento da força de cisalhamento nos vasos) e sinalização adrenérgica (IDORN AND HOJMAN, 2016).

Em outros trabalhos foi demonstrado a importância das células NK, e também dos linfócitos T, em mediar a resposta imune no tumor. Foi visto em animais com tumores de melanoma B16, que tanto as células NK como as células T CD3-positivas foram importantes na diminuição do tumor (PEDERSEN *et al.*, 2016). No entanto, embora os animais utilizados aqui neste projeto de Doutorado apresentem resposta por células NK, no entanto talvez a ausência dos linfócitos T seja importante para a atenuação do tumor.

Em experimentos *in vivo*, foi visto que a chegada de células NKs e outras células inflamatórias no tumor pode ser mediada tanto pelo aumento da perfusão vascular como pelo aumento do fluxo sanguíneo, reflexo do aumento da temperatura corporal do animal (IDORN AND HOJMAN, 2016). Este fato ocorre pois a temperatura aumenta o calibre dos vasos que facilita o tráfico das células imunes para o tumor.

Em um estudo com pacientes com câncer de mama, foi visto que as que apresentavam maior sobrevida foram capazes de mobilizar células NKs após um período de atividade física (EVANS *et al.*, 2015).

Além das células NKs, alguns resultados tem demonstrado a importância da ativação de macrófagos no tumor, sendo induzido pelo exercício para polarização de macrófagos M1, promovendo uma resposta anti-tumoral (COLEGIO *et al.*, 2014). Como visto por exemplo por dois pesquisadores independentes, na qual macrófagos expostos ao lactato dentro do microambiente tumoral podem seguir uma polarização M2 (anti-inflamatória e pró-tumoral) por aumento de expressão dos seguintes marcadores canônicos, Arg1 e Mrc1. No entanto, quando ocorre a estabilização da oxigenação induzida pela normalização vascular, deve também ocorrer a redução da exposição de macrófagos ao lactato, diminuindo a frequência da ativação de macrófagos M2, e aumentando a ativação de macrófagos M1 (anti-tumoral) (CARMONA-FONTAINE *et al.*, 2017).

Por outro lado, Kawanishi e colaboradores (2010) observaram que ratos saudáveis expostos ao exercício, possuíam expressão de mRNA no tecido adiposo que indicou uma mudança no fenótipo de macrófagos de um estado M1 pró-inflamatório para um estado M2 anti-inflamatório, como indicado pela diminuição da expressão de Tnfa e Adgre1 (comumente conhecido como F4/80), e aumento da expressão de Icam1, CD11c e CD163.

Assim, têm sido observado resultados conflitantes sobre a polarização de macrófagos em resposta ao exercício, e os mecanismos existentes na ativação de macrófagos mediante o exercício físico, ainda precisam ser melhor estudados. Neste trabalho de Doutorado não conseguimos relacionar a polarização de macrófagos presente no tumor, utilizando os marcadores de Macrófagos M1, iNOS e IL-10, e utilizando os marcadores de Macrófagos M2, IL-12, Arg1 e Mrc1.

No trabalho de Line Pedersen e colaboradores (2016), o exercício voluntário promoveu 60% de redução no volume tumoral, mediado principalmente por células NKs. No entanto, embora o exercício em vários trabalhos tenha se mostrado eficiente, para erradicar o tumor parece ser necessário a combinação do exercício com fármacos, como por exemplo quimioterápicos, pois somente a normalização vascular não seria capaz de erradicar o tumor.

Embora a “normalização vascular” seja um importante processo observado pelo grupo do pesquisador Jain Rakesh (RAKESH, 2005) para eficiência dos tratamentos anti-tumorais, mesmo com a “normalização vascular” pode haver crescimento do tumor, mediado inclusive pelo exercício. Isso porque com o exercício físico, ocorre aumento do fluxo sanguíneo, aumentando a estabilidade do aporte de oxigênio, diminuindo a hipóxia e aumentando o fornecimento de nutrientes, que pode aumentar o crescimento do tumor. Com isso, o fato de não ter a combinação com outras terapias também pode auxiliar o crescimento do tumor. Além disso, tanto o tempo como a dose/atividade de fármacos anti-angiogênicos e do exercício físico são importantes fatores para promover boa “normalização vascular” e boa combinação de terapias (RAKESH, 2005).

Se correta, esta hipótese talvez possa permitir a interpretação de nossos resultados, pois caso neste trabalho tenha havido processo de “normalização vascular”, este foi responsável por aumentar o tumor. Sendo que os resultados são contraditórios, pois não houve nenhuma variação na hipóxia, necrose e houve diminuição do marcador CD31 quando comparado os animais exercitados com os animais sedentários.

O fato de nosso experimento provavelmente não ter induzido a “normalização vascular” pode ter sido causado por dois principais motivos: i) baixo ímpeto nos exercícios pelos animais (baixa distância percorrida), já que análises no nosso grupo demonstraram que outras linhagens de camundongo alcançaram maiores distâncias percorridas; ii) ou pelo fato do grupo amostral de cada grupo não ter sido estatisticamente significativo.

No trabalho de Oliver e colaboradores (2017), foi visto que até mesmo animais exercitados com tumores de mama expostos ao exercício apresentaram aumento do tumor em resposta ao exercício e na ausência de tratamento, e que este efeito foi principalmente mediado pela inibição da síntese de HIF-1-alfa.

6.3. Análise da expressão gênica pela plataforma fluidigm:

Na análise da expressão gênica, foi identificado um painel de 8 genes diferencialmente expressos quando comparado grupo exercitado < 2 km e grupo sedentário. Sendo que dentre estes genes temos: 2 Epigenética (STK4 e LATS1), 2 Fatores de transcrição (STAT3 e PTEN), 1 Apoptose (MCL1), 1 Reparo de DNA (PCNA), 1 Estrutura de Membrana (FLOT2) e 1 Modelagem Vascular ou angiogênese (ACTA2 ou alfa-SMA2). Com isso, seria interessante que fosse analisado a proteína ACTA2 por imunoistoquímica para confirmar estes resultados. Todavia, não foi possível realizar esse experimento.

A análise que fizemos para vascularização foi a detecção da proteína CD31 por imunoistoquímica, no entanto somente este marcador não é suficiente, e a metodologia de quantificação que utilizamos aqui, analisando vasos por mm² não é o suficiente, sendo necessário que fossem quantificados os tamanhos dos vasos e a quantidade de vasos funcionais por mm² comparando os três grupos de animais.

No artigo da Line Pedersen e colaboradores (2016), quando feita análise de microarranjo gênico de grupos exercitados em relação ao grupo sedentário, foi observado que 52% dos genes alterados estavam relacionados com função a imune e a inflamação, e somente 10% dos genes foram relacionados com angiogênese e modelagem vascular. Sendo que neste trabalho, utilizando a plataforma de Fluidigm, analisamos genes envolvidos com pluripotência, proliferação, resistência, metástase, angiogênese, metabolismo, morte celular, reparo celular e epigenética, e não com funções imunológica e inflamação, pois além dos animais utilizados serem imunodeprimidos, optamos por fazer análise imunológica por expressão gênica somente para averiguar a polarização de macrófagos murinos utilizando Real-Time PCR convencional. Com isso, seria interessante que outros modelos de animal imunocompetente submetido ao exercício voluntário fossem comparados com o nosso modelo, e também análise de outros genes ou proteínas envolvidas com resposta inflamatória/imunológica fossem averiguadas, seja por Real-Time PCR ou imunoistoquímica.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho, demonstram que os animais imunodeprimidos Balb/c NUDE que praticam o exercício voluntário de corrida, em roda de exercício, o fizeram de modo heterogêneo, tendo sido necessário criar dois sub-grupos, um que percorreu < 4 km/dia e outro que percorreu 18-20 km/dia. Com isso, obtivemos para os nossos experimentos um número amostral pequeno.

O grupo sedentário teve maior sobrevida livre de tumores $\geq 450 \text{ mm}^3$ do que os grupos exercitados, e não houve diferença na detecção de regiões de hipóxia e necrose no tumor quando comparado os três grupos deste estudo. No entanto, houve maior quantidade de vasos por mm^2 no grupo sedentário em relação aos grupos exercitados.

Neste trabalho, não houve diferença na expressão gênica de marcadores de polarização de macrófagos entre os três grupos. Além disso, dentre os 7 genes diferencialmente expressos quando comparado o grupo sedentário com o grupo exercitado < 4 km para diferentes genes de tumorigênese, o gene com maior *Fold Change* foi o gene alfa actina de músculo liso (ACTA2).

Capítulo 2

Análise da sub-população de células de melanoma CD20-positivas e o comportamento destas células mediante tratamento com quimioterápicos, utilizando detecção por imagem radionuclídica

Resumo

Mororó JS. *Análise da sub-população de células de melanoma CD20-positivas e o comportamento destas células mediante tratamento com quimioterápicos, utilizando detecção por imagem radionuclídica.*

O melanoma maligno é considerado o câncer mais agressivo dentre os tumores de pele. O alto índice de recidiva presente neste tumor, tem sido relacionado a alguns processos celulares e moleculares do tumor, como por exemplo a atuação de células tronco tumorais, que seriam responsáveis pela repopulação do tumor. Estas células, assim como as células tronco normais seriam as responsáveis por controlar a proliferação e crescimento de tecidos, cancerígenos e normais, respectivamente. No caso do melanoma, tem sido sugerido nos últimos anos a detecção de prováveis células tronco cancerígenas, que possuem características fenotípicas de célula tronco e que são detectadas como sendo células CD20-positivas. Com isso, alguns estudos clínicos estão sendo conduzidos com anticorpos monoclonais anti-CD20, como por exemplo o rituximabe, para tratamento de pacientes com melanoma metastático. Sendo assim, este medicamento poderia ser uma provável ferramenta de terapia e até mesmo de diagnóstico, quando conjugado com radiofármacos, para os tumores de melanoma que apresentem células CD20-positivas. Este trabalho tem como objetivo detectar as células de melanoma CD20-positivas em condições normais ou sob estresse, para que assim, esta proteína possa ser utilizada como provável biomarcador de resposta à terapia e alvo terapêutico de células tronco tumorais. Considerando a baixa frequência das células CD20-positivas foi utilizado um painel de seis linhagens celulares para aumentar a proporção de detecção, e foram procedidas análises *in vivo* e *in silico*. Foram procedidas as seguintes metodologias: citometria de fluxo, imunofluorescência, imunocitoquímica, imunohistoquímica, análise por imagem molecular, detecção da expressão do gene que codifica o CD20 (MS4A1) e análise *in silico* utilizando amostras de pacientes com melanoma dos bancos R2 database, GEO e cBIOPortal. Como resultados vimos que a porcentagem de células CD20-positivas em quatro linhagens celulares de melanoma alcançou no máximo 7% de células CD20-positivas, sem ou com agentes estressores no meio (meio levemente ácido ou meio com cisplatina). Além disso, na análise por imunofluorescência e na imagem óptica *in vivo* as análises pareciam terem detectadas células CD20-positivas, com leve marcação de membrana. No entanto, por análises de imunohistoquímica, imunofluorescência e análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real não foram detectadas células CD20-positivas. Além disso, na análise da expressão gênica do MS4A1 (codifica a proteína CD20) a detecção da fase log somente ocorreu a partir do 30^a ciclo, tanto em células de melanoma como em tumor derivado de células de melanoma inoculado em camundongos imunodeprimidos, e a expressão foi muito baixa em relação a um controle positivo. Na análise *in silico*, a alta expressão de células CD20 em melanoma foi co-relacionado com genes envolvidos com regulação da resposta imune e inflamatória, sem co-relação com genes de pluripotência, e as análises das curvas de sobrevivência identificam que a elevada expressão de CD20 em células é relacionado com melhor prognóstico, diferentemente de pluripotência. Com isso, abordagem que utilizamos neste trabalho não se mostrou promissora o suficiente para detectarmos as células CD20-positivas ou correlacioná-la com pluripotência *in vitro*, *in vivo* e *in silico*, tanto pelo fato da baixa frequência destas células, assim como pelo fato do CD20 ser um marcador de linfócitos B.

Descritores: células CD20-positivas, células tronco tumorais, melanoma, resistência, rituximabe, terapêutico

Summary

Mororó JS. *Analysis of the subpopulation of CD20-positive melanoma cells and the treatment with chemotherapeutic agents, using radionuclide imaging.*

Malignant melanoma is considered the most aggressive cancer among skin tumors. The high rate of relapse present in this tumor has been related to some cellular and molecular processes of the tumor, for example the activation of cancer stem cells, which would be responsible for the repopulation of the tumor. These cells as well as normal stem cells would be responsible for controlling the proliferation and growth of cancerous and normal tissues, respectively. In the case of melanoma, it has been suggested in recent years that CD20-positive melanoma cells have phenotypic characteristics, related to cancer stem cells. Regarding this, some clinical studies are being conducted with anti-CD20 monoclonal antibodies to treat patients with metastatic melanoma, such as rituximab. Thus, this drug could be a likely tool for therapy and even diagnostic, when conjugated with radiopharmaceuticals, for melanoma tumors presenting CD20-positive cells. This work aims to detect CD20-positive melanoma cells under normal or stress conditions, for this protein can be used as a probable biomarker to support the therapeutic of cancer stem cells. Considering the low frequency of CD20-positive cells, a panel of six cell lines was used to detect these cells, and *in vitro*, *in vivo* and *in silico* analyzes were performed. The following methodologies were carried out: flow cytometry, immunofluorescence, immunocytochemistry, immunohistochemistry, molecular imaging, detection of CD20 (MS4A1) encoding gene expression and *in silico* analysis using samples from melanoma specimens from R2 database, GEO and cBIOPortal. In the results, It was found that the percentage of CD20-positive cells in four melanoma cell lines reached a maximum of 7% of CD20-positive cells, with or without stress agents in the medium (slightly acidic medium or cisplatin medium). Furthermore, in the analysis by immunofluorescence and *in vivo* optical imaging appeared to have detected CD20-positive cells with slight membrane labeling. However, CD20-positive cells were not detected by immunohistochemical, immunofluorescence and gene expression analysis by quantitative real-time PCR. In addition, in the analysis of the gene expression of MS4A1 (encoding the CD20 protein) the detection of the log phase only occurred from the 30th cycle, both in melanoma cells and in tumor derived from melanoma cells inoculated in immunodepressed mice, and the expression was very low relative to a positive control. *In silico* analysis, high expression of CD20 cells in melanoma was co-related to genes involved in regulation of immune and inflammatory response, unrelated to pluripotency genes, and survival curve analyzes identified that the high expression of CD20 in cells is related to a better prognosis, different from pluripotency. Regarding this, the approach that we used in this work was not promising enough to detect CD20-positive cells or to correlate it with pluripotency *in vitro*, *in vivo* and *in silico*, both because of the low frequency of these cells, as well as the fact that CD20 is a marker of B lymphocytes.

Descriptors: CD20-positive cells, cancer stem cells, melanoma, resistance, rituximab, theranostic

1. INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma e tratamento:

O câncer de pele é o tumor mais freqüente na população brasileira (NORA *et al.*, 2004), sendo o tipo mais agressivo o melanoma maligno, que apresenta elevados índices de metástases e recidivas nos pacientes após a terapia (BALCH *et al.*, 2009). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCa), no ano de 2018, seriam detectados em torno de 6.300 novos casos de melanoma no Brasil (Site do INCa, 2018).

Nos tumores de melanoma a cirurgia é utilizada como principal tratamento em diferentes estágios da doença, apresentando boa resposta nos tumores iniciais. No entanto, em tumores mais avançados, o alto índice de recorrência demonstra a necessidade das terapias adjuvantes (GOGAS *et al.*, 2013). O melanoma metastático apresenta prognóstico ruim, no qual os pacientes apresentam sobrevida mediana de 6 meses (GARBE *et al.*, 2011) e um índice de sobrevida de 5 anos em apenas 15% dos casos (BALCH *et al.*, 2009).

Embora nos últimos anos grandes avanços foram obtidos principalmente com o desenvolvimento da imunoterapia para melanoma, utilizando os fármacos anti-PD-1/PD-L1, geralmente ainda são utilizados medicamentos como citocinas (interferon) ou interleucina-2 em redes assistenciais com baixos recursos no mundo. Outros procedimentos utilizam a combinação destes quimioterápicos (interferon e interleucina-2) associado com outros fármacos, por exemplo, com tamoxifeno. Todavia, o tamoxifeno promova aumento no índice de resposta dos pacientes, promove também elevada toxicidade e não aumenta a sobrevida dos pacientes quando comparado ao grupo que recebe tratamento com dacarbazina, quimioterápico padrão para melanoma (CHIARION *et al.*, 2001).

O derivado do agente alquilante dacarbazina, o medicamento temozolamida, apresenta efeitos similares no índice de resposta, na média de sobrevivência dos pacientes e também no elevado índice de resistência (NAZARIAN *et al.*, 2010), tendo somente como vantagens a administração poder ser feita por via oral e ter passagem pela barreira hemato-encefálica (HUTCHINSON *et al.*, 2003).

Os medicamentos alvo dirigidos também apresentam grande importância para terapia de melanoma, e estes podem ser utilizados sobre a forma de anticorpos íntegros, fragmentos, ou nanopartículas. Como exemplo, temos o vemurafenibe, o ipilimumabe, e os fármacos anti-PD-1/PD-L1 (GOGAS *et al.*, 2013). O vemurafenibe é um inibidor enzimático anti-B-raf que recebeu aprovação para tratamento de primeira linha em pacientes com melanoma metastático. Em um estudo de fase 3, foi demonstrado que a monoterapia com vemurafenibe aumentou a sobrevida mediana de 9,6 para 13,2 meses dos pacientes tratados com dacarbazina (HAUSCHILD *et al.*, 2012). No entanto, por mais que inicialmente tenha-se uma boa resposta a estes medicamentos, no entanto a recidiva dos pacientes tratados com vemurafenibe acontece de 6-8 meses depois do início do tratamento (MANZANO *et al.*, 2016).

1.2. Células Tronco Cancerígenas:

Os elevados índices de ineficiência das terapias em melanoma seja por causa da elevada toxicidade dos medicamentos nos pacientes, ou por causa dos altos índices de recidiva, como explicado anteriormente, é a causa ou consequência para que as células de melanoma escapem do processo de apoptose e assim promovam a repopulação do tumor (SOENGAS & LOWE, 2003; MANZANO *et al.*, 2016). Foi visto que estas células resistentes, em muitos casos, apresentam um perfil fenotípico de célula tronco, sendo essas responsáveis pelo crescimento, manutenção e metástase do tumor (SABATINO *et al.*, 2009). Essas células foram denominadas células tronco cancerígenas (CTCs) ou células iniciadoras de tumor, e sua presença tem sido demonstrada em diversos tipos de tumores, incluindo o melanoma (SELL & PIERCE, 1994; LIU *et al.*, 2006; SCHATTON *et al.*, 2008).

A resistência das CTCs aos tratamentos tem sido associada com diversos fatores, dentre eles a elevada quantidade de proteínas de efluxo de droga, proteínas intracelulares responsáveis pela detoxificação de xenobióticos, superexpressão de proteínas anti-apoptóticas, elevada capacidade de reparo de danos no DNA e a baixa taxa proliferativa (geralmente se encontram em quiescência) no tumor (LA PORTA, 2009).

Outras características como a habilidade de formar esferas *in vitro* e a capacidade de se proliferar, diferenciar, e induzir o tumor em animais

imunodeprimidos também são relacionados às características fenotípicas das CTCs (ROBERTS, 2008). No entanto, estas características podem ser alteradas de acordo com as características microambientais e experimentais, como, por exemplo, a hipóxia, tratamento com fármacos ou pH ácido, fenômenos esses extremamente comuns em tumores malignos (HSU *et al.*, 2013; OLIVOTTO & DELLO, 2008).

Embora ainda não existam marcadores universais de CTCs, algumas poucas proteínas existentes nestas células têm sido utilizadas como marcadores fenotípicos do perfil tronco, como a proteína CD20 em melanoma (FANG *et al.*, 2005), a proteína CD133 em glioma (UCHIDA *et al.*, 2000) e as proteínas CD44 e CD24 para câncer de mama (BHAT-NAKSHATRI *et al.*, 2010), dentre outros marcadores de membrana (SARVI *et al.*, 2014).

Inicialmente, a proteína CD20 obteve bastante destaque por ser detectado em melanomas quando em um estudo realizado por Bittner e colaboradores (2000) foi identificado o aumento de expressão de 22 genes em melanomas em relação a 7 amostras controle, e dentre estes genes estava o MS4A1/CD20.

No entanto, somente a partir do estudo de Fang e colaboradores (FANG *et al.*, 2005) que foram identificadas prováveis CTCs CD20-positivas em uma pequena porcentagem de células de melanoma humano quando cultivadas em meio condicionado, e estes marcadores foram relacionados à células iniciadoras pelo fato destes clones terem características fenotípicas tronco, como capacidade de formar esferóides não aderentes, capacidade de auto-renovação e induzir formação de tumor em animais imunodeprimidos. Com isso, alguns estudos começaram a serem conduzidos utilizando como terapia adjuvante o anticorpo contra CD20 (Rituximabe) em pacientes com estadiamento IV e que apresentavam elevado risco de recorrência de melanoma (PINC *et al.*, 2012).

O anticorpo monoclonal anti-CD20 Rituximabe tem sido utilizado no tratamento de diversas doenças, dentre elas linfoma não-Hodgkin, leucemia linfóide crônica e artrite reumatóide, com isso este medicamento também poderia ser uma provável ferramenta de terapia e até mesmo de diagnóstico, quando conjugado com radioisótopos, para os tumores de melanoma que apresentem células CD20-positivas.

Em um estudo, realizado por Pinc e colaboradores (2012), utilizando rituximabe para tratar pacientes com recidiva ou com tumores metastáticos, foi visto que cinco dos nove pacientes não apresentaram recorrência da doença, e seis pacientes estavam vivos ao final do estudo. Tendo sido este um dos primeiros estudos realizados com pacientes em estadiamento avançado de melanoma, e sendo considerado motivador para serem feitos outros estudos clínicos envolvendo terapias adjuvantes anti-CD20 em melanoma (Site www.clinicaltrials.gov), provavelmente pelo fato dessa terapia alvo almejar as CTCs de melanoma.

1.3 Métodos de detecção de melanoma por imagem:

Assim como para terapia, para diagnóstico, os métodos atuais não tem sido eficientes para detecção do melanoma maligno, principalmente para lesões nos estádios iniciais. Ainda a análise visual, seguida da análise histológica, tem sido utilizada para confirmação de tumor de melanoma. (GOLDSMITH, 2014).

Nas duas últimas décadas o radiofármaco [^{18}F]-FDG, , tem sido muito estudado na detecção de melanoma primário e de metástases em pacientes (BOURGEOIS *et al.*, 2013). Como analisado por Crippa e colaboradores (2000), em 38 pacientes com estadiamento III de melanoma foram identificados um total de 56 linfonodos comprometidos utilizando o [^{18}F]-FDG, o que representa uma sensibilidade de 95% e 84% de especificidade do [^{18}F]-FDG neste estudo. Todavia, outros estudos este radiofármaco não tem demonstrado boa eficiência, principalmente nos estadiamentos iniciais do tumor (SINGH *et al.*, 2008; WAGNER *et al.*, 2005). Singh e colaboradores (2008) compararam o resultado fornecido pelo radiofármaco ^{18}F -FDG com os resultados de biópsias de linfonodo sentinela e linfocintilografia. Foi visto neste estudo que o ^{18}F -FDG apresentou baixa sensibilidade (14,3%) e baixo valor preditivo positivo (50%) em detectar metástases linfonodais sub-clínicas de pacientes em estádios I e II, quando comparado aos outros métodos de detecção.

Portanto, levando em consideração a dúvida da eficiência do ^{18}F -FDG em detectar melanomas iniciais nos pacientes utilizando o PET/CT, tem sido estudado radiofármacos utilizando outros radionuclídeos emissores de pósitrons, como o ^{89}Zr (ZHANG *et al.*, 2011) e ^{68}Ga (AL-NAHHAS *et al.*, 2007) para também serem utilizados por PET/CT. O ^{89}Zr apresenta várias vantagens para ser utilizado pela medicina nuclear

em relação ao ^{18}F (VAN DE WATERING *et al.*, 2014), principalmente para ser utilizado na radiomarcção de anticorpos, pelo fato do ^{89}Zr apresentar elevada meia-vida física (78,4 horas) semelhante à meia-vida biológica dos anticorpos ($t_{1/2}$ = 3 a 4 dias). Além disso, o ^{89}Zr , quando complexado ao quelantes deferroxamida (DFO), conjugado ao anticorpo, apresenta alta estabilidade *in vivo* quando comparado a outros radionuclídeos (MEIJS *et al.*, 1992).

Ao longo dos anos, os radiofármacos tem sido muito utilizados para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e diagnósticas (TRAN *et al.*, 2009; KLEYNHANS *et al.*, 2018), sendo também utilizados para entender processos de tumorigênese *in vitro* e *in vivo*, principalmente em tumores com elevada resistência a quimioterápicos, como no caso do melanoma (BOURGEOIS *et al.*, 2013).

RESULTADOS PRELIMINARES DO LABORATÓRIO

De acordo com resultados preliminares do laboratório, demonstrado pelas pesquisadoras Luciana Andrade e Camila Machado, três linhagens celulares de melanoma humano (SK-Mel-147, SK-Mel-29 e SK-Mel-37) apresentavam um amplo espectro de células CD20-positivas variando de 2-75%, por citometria de fluxo. A linhagem SK-Mel-147 foi a linhagem que apresentou maior expressão de todas as três linhagens estudadas (aproximadamente 70%) (Anexo A, Figura 1 e Tabela 1). Nestes experimentos, foi utilizado o rituximabe associado com o fluoróforo FITC, pelo método de marcação direta, para identificar as células CD20-positivas .

Além disso, foi visto ter ocorrido alta captação do radiofármaco rituximabe- $\text{Tc}^{99\text{m}}$ nos implantes sub cutâneos de melanoma, de animais inoculados com a linhagem B16F10, que foi detectado pelo aparelho SPECT/CT (Anexo A, Figura 2). Sendo assim, estes resultados indicaram a provável presença da sub-população de células CD20-positivas, tanto *in vitro* como *in vivo*, que foram investigadas aqui.

2 JUSTIFICATIVA

Levando em consideração a alta agressividade e resistência do melanoma, e a necessidade tanto de novas terapias como de metodologias de diagnóstico, é importante serem analisadas novas moléculas para serem utilizados no tratamento e diagnóstico de pacientes com melanoma avançado.

Além disso, os processos envolvidos na tumorigênese deste tipo de câncer, que podem ser mediados por CTCs, também devem ser melhor investigados.

Dados da literatura apontam a provável existência de uma população de células tronco tumorais CD20-positiva em melanomas. Desenvolvimento de sondas diagnósticas baseadas em anticorpos terapêuticos como o rituximabe poderá ser útil como futura ferramenta teranóstica para melanomas.

3 OBJETIVO

3.3 OBJETIVO GERAL:

- Este trabalho teve como objetivo detectar a sub-população de células CD20-positiva em linhagens estabelecidas e tumores derivados de células de melanoma humano.

3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Proceder a padronização da conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD20 rituximabe com os fluoróforos isotiocianato de fluoresceína isômero I (FITC), cianina 3 com ester NHS mono-reativo (Cy3) e cianina 7 com ester NHS (Cy7);
- Estabelecer o melhor protocolo de preparo, aquisição e análise imunofenotípica por citometria de fluxo, para detectar células CD20-positivas em linhagens celulares de melanoma, em condições normais e de estresse;
- Fazer análise de imagem molecular *in vivo* e *ex vivo* de células CD20-positivas por fluorescência utilizando o Sistema de Imagem In Vivo (IVIS), de tumores derivados da linhagem de melanoma SK-Mel-147, em camundongos imunodeprimidos;
- Identificar as células CD20-positivas por imunofluorescência e imunocitoquímica em cortes congelados de tumor ou células, respectivamente, por marcação direta ou indireta;
- Analisar as células CD20-positivas por marcação indireta pela imunohistoquímica, utilizando anti-CD20 policlonal, em tonsila humana e em tumores gerados pelas linhagens de melanoma;

- Detectar a expressão do gene MS4A1, gene que codifica a proteína CD20, em um painel de linhagens celulares e tumores de melanoma por real time PCR (RT-PCR);
- Proceder averiguação *in silico* de tumores de melanoma CD20-positivos, através das detecções: (i) correlação entre o gene MS4A1 e genes relacionados a pluripotência, ou ativação e regulação de linfócito B; e (ii) análise da expressão do gene MS4A1 relacionando com características clínicas de pacientes, utilizando bancos de amostras de pacientes com melanoma (R2 database, GEO e cBIOPortal).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Manutenção das linhagens celulares em cultura e aquisição de anticorpos anti-CD20:

Neste trabalho foi utilizada um painel de seis linhagens celulares de melanoma humano, SK-Mel-37 (cultivo em MEM 10% SFB), SK-Mel-147, SK-Mel-29, SK-Mel-05, CHL-1 e UACC-62 (todas cultivadas em meio DMEM 10% SFB); uma linhagem celular de linfoma humano não-Hodgkin, Toledo (RPMI 10% SFB), utilizada como controle positivo da proteína CD20; e uma linhagem celular de câncer de pulmão humano, H1299 (RPMI 10% SFB), utilizada como controle negativo da proteína CD20, nos experimentos *in vitro*. Todas as células foram mantidas de acordo com as recomendações do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) ou com as padronizações prévias do laboratório. Como controle de qualidade da cultura celular, foram procedidos mensalmente testes para detecção de micoplasma por PCR quantitativo em tempo real, conforme estabelecido pelo laboratório.

Foi procedido inativação do sistema complemento presente no soro fetal bovino (SFB) da cultura de células, a fim de evitar o efeito de citotoxicidade celular dependente de complemento, promovido pelo rituximabe. Para isto o SFB foi mantido à 56°C por 30 minutos.

Nas metodologias experimentais de citometria de fluxo, imunofluorescência, imunohistoquímica, imunocitoquímica, e detecção por imagem molecular foram utilizados três anticorpos anti-CD20: i) o rituximabe, ii) um anticorpo anti-CD20 de coelho policlonal e iii) um anticorpo anti-CD20 de camundongo monoclonal (clone 2H7), ambos da empresa ThermoFisher. O anticorpo rituximabe foi cedido gentilmente pela Roche.

4.2. Conjugação do rituximabe com FITC (RTX-FITC), Cy3 (RTX-Cy3) ou Cy7 (RTX-Cy7):

O anticorpo monoclonal quimérico rituximabe estava na concentração de 10 mg/mL, e foi utilizado para ser conjugado com os fluoróforos: isotiocianato de

fluoresceína isômero I (FITC – Sigma; F7250); cCianina 3 com ester NHS mono-reactivo (Cy3 – GE Healthcare Life Sciences; PA13105) e cianina 7 com ester NHS (Cy7 – GE Healthcare Life Sciences, PA17004), sendo utilizado em experimentos *in vitro* ou *in vivo*. Além disso, também foi conjugado um anticorpo isotipo humano com estes fluoróforos (Human IgG Isotype Control, 12000C, ThermoFisher), para ser utilizado como controle isotópico nos experimentos. As conjugações foram procedidas de acordo com o *datasheet* da empresa fabricante, ou de acordo com referências da literatura.

As etapas de conjugação com estes fluoróforos foram semelhantes, sendo feitas em três etapas principais: troca de tampão da solução original de IgG, marcação com o fluoróforo e separação do fluoróforo conjugado do fluoróforo livre, de acordo com o *datasheet* do fluoróforo. Nestas etapas, a fim de obter a melhor padronização, que seria o maior grau de marcação (relação molar Fluoróforo-IgG ao final da reação), foram feitas conjugações alterando as seguintes variáveis: tempo de marcação, os materiais de separação dos tampões, o tampão de marcação, as massas de anticorpo, a proporção molar de Fluoróforo-IgG no início da marcação, e a ausência ou presença de Cloreto de Amônia (NH₄Cl), para encerrar a reação. A proporção molar de Fluoróforo-IgG difere do grau de marcação (relação molar Fluoróforo-IgG ao final da reação), já que o primeiro é a quantidade de Fluoróforo em relação a IgG utilizada para reagir no início da reação, sendo que o segundo é quanto de fato está associado e conjugou com o IgG, tudo sendo dado na proporção molar entre os dois (Fluoróforo:IgG).

Ao final, foram utilizados os aparelhos Nanofotômetro P-CLASS P330 IMPLN e o Lambda25 da Perkin Elmer, para medir a concentração e o grau de marcação do conjugado (Fluoróforo:IgG), utilizando os três fluoróforos.

Com isso, ao final das padronizações, chegou-se aos seguintes métodos para conjugação do anticorpo rituximabe com fluoróforo, e que foram utilizados nos experimentos desta Tese: dois Métodos utilizando o fluoróforo FITC (**Método I** e **Método II**), um método utilizando o fluoróforo Cy3 (**Método único**), e um método utilizando o fluoróforo Cy7 (**Método único**), como explicado abaixo.

No **Método I** do **FITC**, foi utilizado 5 mg de rituximabe diluído em 500 µL de excipiente do anticorpo, na qual foi eluído na Amicon para ser feito troca do tampão da

solução do rituximabe para PBS pH 7,4. Logo após, foi feita troca de tampão salina fosfato (PBS) para solução de bicarbonato pH 9,0, também utilizando Amicon. Em seguida, foi procedida marcação do rituximabe com FITC utilizando proporção molar de Fluoróforo para IgG de 1:20, por 1 hora à temperatura ambiente (TA) e protegido da luz. Finalmente foi feita filtração do anticorpo marcado em Amicon para separar o fluoróforo livre do fluoróforo marcado, utilizando PBS pH 7,4, até que o eluato estivesse limpo.

No **Método II** do **FITC** também foi utilizado 5 mg de rituximabe diluído em 500 µL de excipiente, na qual foi utilizado a Amicon para ser feita troca do tampão para PBS pH 7,4. Em seguida, foi feita a troca para o tampão de marcação Borato pH 8,5, e procedida a marcação com o FITC na proporção molar de Fluoróforo para IgG de 1:20 durante o tempo de 1 hora à TA, em agitador orbital. Finalmente, foi procedida a separação do fluoróforo conjugado do fluoróforo livre utilizando a Amicon com PBS pH 7,4, até que o eluato estivesse limpo.

Para o fluoróforo **Cy3** foi utilizado um **Método único** nas marcações do anticorpo com fluoróforo para ser utilizado nos experimentos, e para isto foi procedida a padronização da marcação como descrito na metodologia do fabricante (GE), somente sendo feita uma alteração, a proporção molar inicial de Fluoróforo para IgG (Cy3:rituximabe) no início da reação deveria ser escolhida entre 15:1 ou 30:1.

Com relação ao **Cy7** não houve padronização de marcação (**Método único**), sendo seguido somente o datasheet do fabricante. Com isso foi utilizado: 5 mg de rituximabe diluído em 500 µL de excipiente, passado na Amicon para ser feita troca do tampão para bicarbonato pH 8,5. Em seguida, foi procedida a marcação do rituximabe com o Cy7 pelo tempo de 2 horas à TA, em agitador orbital. Finalmente, foi procedida a separação do fluoróforo conjugado do fluoróforo livre utilizando novamente a Amicon e PBS pH 7,4.

4.3. Citometria de Fluxo:

Com o objetivo de identificar e quantificar as células CD20-positivas em um painel de linhagens celulares de melanoma (SK-Mel-147, SK-Mel-29, SK-Mel-37 e UACC-62) foi feita citometria de fluxo (Attune NxT Flow Cytometer - invitrogen). A

padronização desta metodologia foi feita em duas partes, (1) preparo das células para marcação e aquisição, e (2) estratégia de análise imunofenotípica das células CD20-positivas.

Preparo das Células para Aquisição: No protocolo de citometria a ser preparado, diferentes variáveis foram testadas para preparar as células para marcação e aquisição. Dentre elas foram testados números de células; diferentes concentrações de bloqueio (albumina bovina); tipos de marcação (direta ou indireta); tempos de incubação dos anticorpos e bloqueio; temperaturas de marcação; anticorpos anti-CD20 (I-rituximabe, II-anti-CD20 humano de camundongo clone 2H7 [ThermoScientific], III-anti-CD20 humano de camundongo clone 2H7 conjugado com Alexa 647 [BioLegend]); fluoróforos (FITC 448, Alexa Fluor 633 ou Alexa Fluor 647) e presença ou não de fixador em diferentes concentrações (Parformaldeído, seguido por glicina) em diferentes tempos.

Estratégia de análise imunofenotípica das células CD20-positivas: Para melhor análise foram levados em consideração os aspectos morfométricos (FSC-A) e de granulosidade (SSC-A) de 10.000 eventos de células de melanoma, para que assim sejam detectados e analisados os eventos no comprimento de onda da excitação do fluoróforo (BL1-A X FSC-A ou BL3-A X FSC-A).

Após a padronização da análise fenotípica utilizando a metodologia citometria de fluxo foram analisadas as células de melanoma em condições normais de cultivo e sobre condições de estresse para detectar a sub-população de células CD20-positivas.

- **Exposição das células de melanoma à condições de estresse (meio com quimioterápico ou meio ácido):**

Meio com quimioterápico (cisplatina): Antes de serem procedidas a detecção de células CD20-positivas, foi feita análise da melhor concentração e tempo a ser utilizado no experimento com a cisplatina, detectando a porcentagem de morte celular após tratamento com diferentes concentrações de cisplatina. Foi utilizado o reagente iodeto de propídeo (PI), que se intercala nas bases de ácido nucleico.

Inicialmente foi plaqueada a linhagem SK-Mel-147, e 24 horas depois foi incubado CDDP nas concentrações de 10, 25 e 50 μM por 24 horas. No momento da análise, em torno de 1×10^6 células da linhagem SK-Mel-147 foram resuspendidas em 1 mL de etanol (EtOH) 70% por 2 horas a -20°C e foi feita a lavagem com PBS. A seguir, foi ressuspendido o *pellet* de células em solução de PI e analisado o percentual de células com DNA fragmentado (população sub- G_1), como indicativo de morte celular. Sendo assim após ser decidido a melhor concentração para o experimento, foi procedida a análise das células CD20-positivas.

Para o experimento com cisplatina, a linhagem celular SK-Mel-147 foi semeada em 2 placas de 100/20 mm (Greiner Bio-One), na densidade de 2×10^6 células/placa, e mantida em atmosfera úmida a 37°C , contendo 5% de CO_2 . Após 24 horas, uma placa foi incubada com cisplatina (CDDP) na concentração molar de 10 μM , e somente foi trocado o meio na placa controle. Após 72 horas de tratamento, foi retirado o meio com CDDP da placa e permitida as células crescerem por mais 48 horas a fim de que aumentasse a população de células tratadas com CDDP. Na placa controle a cada dois dias foi feita diluição das células e mantidas sobre sub-confluência. Ao final desse período, foram analisadas as células CD20-positivas por citometria.

Meio levemente ácido: As linhagens celulares SK-Mel-147 e SK-Mel-37 foram semeadas em 3 placas e 3 garrafas de cultura (Greiner Bio-One) respectivamente, na qual cada garrafa/placa representa uma condição (três condições no total). Após 48 horas, tivemos as seguintes condições: I) foi trocado 50% do meio de cultivo destes recipientes por 50% de meio em condições normais de cultivo, sem alteração no pH; II) na segunda condição foi trocado 50% do meio anterior por 50% de meio ácido (pH 6,7), que foi preparado com 25 mM do agente 2-(*N-Morpholino*) *ethanesulfonic acid* [MES]); III) e na terceira condição não houve troca de meio (situação controle), e o pH final das 3 placas ou 3 garrafas de todas as condições foram mensurados. O agente MES é utilizado como agente tamponante para pH ácido. Finalmente, após 6 horas de cultivo, a análise das células CD20-positivas destas três condições foram procedidas por citometria de fluxo.

4.4. Padronização e análise das células CD20-positivas em amostras de tumor (*in vivo*):

No experimento *in vivo* foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos e fêmeas das linhagens NOD/SCID ou Balb/c NUDE, com idades entre 6 e 8 semanas. Foram inoculadas em torno de 5×10^5 - 1×10^6 células da linhagens celulares SK-Mel-147, CHL-1 ou UACC-62 por via sub cutânea na região abdominal, utilizando como veículo 100 µL de meio. Após isto, a identificação da formação inicial do tumor foi feito através da detecção de uma massa tumoral palpável não mensurável. Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados e eutanasiados em câmara com CO₂ e os tumores removidos cirurgicamente e armazenados da seguinte forma: no -80°C, para detecção de células CD20-positivas por imunofluorescência; ou mantidos por 24 horas no Tampão Formol, seguido por Etanol 70%, e enviados para o serviço de Patologia para serem emblocados em parafina, para metodologia de imunofluorescência. Estes animais, *Specific Free Patogen* foram provenientes do Centro de Bioterismo da FMUSP, e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMUSP/USP (Anexo B).

PARA ANÁLISE DOS TUMORES FORAM PROCEDIDOS AS SEGUINTE METODOLOGIAS:

4.4.1. Imagem óptica *in vivo* (IVIS):

Após o crescimento do tumor nos camundongos, foi procedida injeção de 100 µL de anticorpo rituximabe conjugado com Cy7 (RTX-Cy7), por via caudal. Foram feitas imagens por epi-fluorescência no aparelho Xenogen IVIS (Spectrum In Vivo imaging System), pelo período de 2, 4, 6, 24 e 96 horas *in vivo*, e de 96 horas *ex-vivo*, após a inoculação do RTX-Cy7. Foi utilizado um animal sem tumor e sem injeção do RTX-Cy7, como controle do experimento. O software utilizado para processar as imagens foi o Software Living Image 4.2 (Spectral unmixing – método automático).

4.4.2. Imunofluorescência:

Esta metodologia também foi utilizada para identificar as células CD20-positivas em tecidos, utilizando tanto marcação pelo método direto (anticorpo conjugado) ou

indireto. Foram utilizados os tumores dos animais acima mencionados, e como controle positivo, amostras de linfonodo humano do Biobanco USP localizado no CTO-ICESP. Para isto, foram procedidos cortes histológicos utilizando o Criostato Hyrax C25. Na qual, para os tumores e para os linfonodos foram feitos cortes que variavam de 3-10 μm à -20 °C, dependendo do ensaio de imunofluorescência, e aderidos em lâminas do tipo StarFrost (KNITTEL Glasser).

Além da padronização dos cortes e aderência dos tumores nas lâminas, também foi padronizado e analisado as melhores condições para a marcação dos cortes com anticorpos anti-CD20, sendo variado: tampões de lavagem (PBS e TBS), tempos de incubação no fixador (acetona), bloqueio com diferentes concentrações de albumina, concentração de bloqueador do receptor Fc, concentrações de anticorpo anti-CD20 (rituximabe e anticorpo monoclonal ou policlonal da ThermoFisher), metodologias de marcação (direto ou indireto) e diluições do Hoechst. As lâminas foram analisadas no microscópio Confocal LSM 510 Meta, utilizando o programa Zeiss LSM Image Browser Version 4,2,0,121, ou no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600, com o programa ACT-1.

4.4.3. Imunocitoquímica de células em condição de hipóxia:

A linhagens celulares SK-Mel-05, UACC-62 e CHL-1 foram semeadas em 2 placas de 24 poços (Greiner Bio-One), contendo em torno de 5×10^4 células por poço. Após a adesão das células, um placa foi mantida em condição de hipóxia (1% de oxigênio) e a outra placa foi mantida em cultura em condições de normóxia. Após isto, as células foram tripsinizadas, foi feito bloqueio com BSA 5% por 1 hora e foi procedido incubação com anticorpo primário (anti-CD20 policlonal de coelho, da empresa Thermo Scientific) na diluição 1:100 à 4°C *overnight*, seguido por lavagens com TBS/BSA 1%, incubação com anticorpo secundário (anti-coelho conjugado com Alexa 488) na diluição 1:500 por 1 hora e 30 minutos, e finalmente montagem e análise das células CD20-positivas, no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600, com o programa ACT-1.

4.4.4. Imunoistoquímica:

Nas análises de imunoistoquímica foram utilizadas marcações indiretas, contendo o anticorpo monoclonal rituximabe anti-CD20 ou o anticorpo anti-CD20 policlonal de coelho, da empresa Thermo Scientific, citado anteriormente. Em seguida, utilizando um anticorpo anti-humano ou anti-coelho conjugado com peroxidase (HRP) foram feitas as incubações do anticorpo secundário. A padronização da marcação anti-CD20 foi feita com amostras de baço de camundongos BALB/c ou com amostras de tonsila humana, doada pelo Hospital das Clínicas da FM-USP. Para a etapa de padronização da solução de bloqueio da técnica, foi utilizado tecido de músculo liso de camundongo C57BL/6.

As etapas de emblocamento do tumor em parafina, cortes em lâminas silanizadas e coloração dos tecidos com Hematoxilina & Eosina foram procedidas pelo setor de Patologia do Centro de Investigação Translacional em Oncologia do ICESP (CTO-ICESP). As etapas de desparafinização dos cortes, hidratação, recuperação antigênica, bloqueio, incubação com anticorpos, revelação, contra-coloração, desidratação e montagem das lâminas foram procedidas em nosso laboratório, pelo aluno de doutorado. As lâminas foram analisadas em microscópio Nikon Eclipse E600.

Para a padronização da imunoistoquímica foram alteradas as seguintes variáveis: diferentes tipos de bloqueio, tipo de anticorpo primário (coelho anti-CD20 ou rituximabe), tempos e concentrações do anticorpo primário, e o tipo de anticorpo secundário (anti-coelho e anti-humano).

4.4.5. Real Time PCR:

Extração de RNA, Produção de cDNA e PCR quantitativa: Após ser retirado o tumor dos animais, estes foram submetidos a dissociação mecânica utilizando um homogeneizador (Brinkmann Polytron PT), para em seguida ser procedida a análise da expressão gênica. A extração de RNA total das linhagens celulares e dos tumores gerados em camundongos imunodeprimidos foi feita com Trizol Reagent (Ambion – Life Technologies), segundo o protocolo do fabricante. Em seguida, a partir do RNA obtido, foi feita a reação de síntese de cDNA utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Thermo Fisher Scientific), e para análise de expressão gênica em tempo real foi

utilizada a metodologia do SYBR® Green (Invitrogen – Life Technologies). Finalmente, os parâmetros de ciclagem termal foram feitos de acordo com o aparelho Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystem). As análises de expressão gênica foram feitas para o gene MS4A1 humano (CD20) e para o gene GAPDH (controle endógeno), cujas sequências dos pares de primers estão descritas abaixo (Tabela 7).

Tabela 7 - Sequências dos pares de *primers* do gene da proteína CD20 (MS4A1) e do controle endógeno GAPDH utilizados nos experimentos de Real Time PCR.

Primer	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
MS4A1	5'-GAATGGGCTCTTCCACATTGCC-3'	5'-TCTCCGTTGCTGCCAGGAGT-3'
GAPDH	5'-TGCACCACCACCTGCTTAGC-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

4.5. Análise *in silico*:

Para análise *in silico* de tumores de melanoma CD20-positivos, foi procedida em primeiro lugar a averiguação do índice de mutação e amplificação do gene MS4A1 amostras de melanoma, utilizando cBIOPortal, para posteriormente serem feitas a relação da expressão do gene MS4A1 de pacientes com imunidade ou pluripotência, prevendo a origem das células CD20-positivas a partir de linfócitos B ou de prováveis CTCs. Com isso, as análises foram feitas como descrito abaixo:

I) Análise de sobrevida e co-relação com expressão gênica: Foram utilizadas amostras de pacientes do dataset do GEO (Gene Expression Omnibus), na qual as informações foram coletadas através do R2 database (Genomics Analysis and Visualization Platform - <http://r2.amc.nl>). Em seguida, foi utilizado a plataforma R2 para analisar a co-relação entre prognóstico e expressão gênica. O método Scan da plataforma R2 foi utilizado para selecionar o melhor *cut-off* da análise de sobrevida, por Kaplan Meier. Finalmente, para ser procedida análise de *clusterization* de tumores com alta e baixa expressão de MS4A1 em tumores, foi utilizado o método de Distância Euclidiana (MeV software v.4.9.0).

II) Análise dos DEGs relacionados com o gene MS4A1: Foi procedida análise dos Genes Diferencialmente Expressos (DEGs) utilizando para isto o teste de Análises de Significância dos Microarrays (SAM) e teste-t com ou sem correção com Bonferroni.

Posteriormente, foi averiguado se os DEGs estavam relacionados com resposta imunológica, inflamatória ou pluripotência.

III) Análise da correlação entre o gene MS4A1 e genes relacionados com resposta imunológica, inflamatória ou pluripotência: Para analisar a co-expressão do gene MS4A1 e genes relacionados com linfócito B (BCR e CD19) ou pluripotência (CD271 [gene NGFR], CD133 [gene PROM1], gene WNT1, gene NOTCH1, Hedgehog (gene SHH), OCT4 (gene POU5F1), gene ALDH1A1, gene NANOG, gene CD34, gene ABCB1, gene ABCB5 e o gene ABCG2) utilizamos o mesmo dataset do GEO e procedemos análise de Correlação de Pearson.

IV) Análise da co-expressão de genes relacionado ao MS4A1: Para identificar os genes mais importantes co-expressos com o gene MS4A1, utilizamos o cBIOPortal, em associação com o TCGA Skin Cutaneous Melanoma dataset (SKCM). Em seguida, analisamos as funções biológicas procedendo a ontologia dos genes usando o WebGestalt 2017. O valor do cut-off utilizado foi de 0,8 utilizando a Corelação de Pearson para a lista final dos genes.

4.6. Amostras de Pacientes:

Foram utilizadas amostras de linfonodo de pacientes armazenadas no Biobanco para auxiliar na padronização das técnicas de imunofluorescência. Para isso os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderam ao Questionário Epidemiológico do Biobanco. As amostras foram congeladas em N₂ líquido, e depois armazenadas no -80°C.

5. RESULTADOS

5.1. Conjugação do rituximabe com FITC, Cy3 e Cy7:

A fim de obter a melhor conjugação dos fluoróforos com anticorpo, configurando maior relação molar ou grau de marcação Fluoróforo:IgG ao final do processo, foram feitos sucessivos testes e padronizações das variáveis de conjugação. Com isso, ao final das padronizações, chegou-se a dois métodos eficientes em relação ao FITC (Método I e Método II), um método para o Cy3 (Método único), e um método para o Cy7 (Método único), para serem utilizados para detecção de células CD20-positivas.

O **Método I** do **FITC** apresentou grau de marcação de 3,4 (Moléculas de FITC : Moléculas de IgG). O **Método II** do **FITC** apresentou grau de marcação de 3,38:1 (Moléculas de FITC : Moléculas de IgG).

Nas duas tentativas feitas com metodologias diferentes para o fluoróforo Cy3, quando utilizado a proporção molar inicial de 15:1 de Fluoróforo:IgG obtivemos grau de marcação de 3,45:1; e quando utilizado a proporção molar de 30:1 de Fluoróforo:IgG obteve-se grau de marcação de 3,86:1. Então como os rendimentos foram similares utilizamos para o **Cy3** um **Método único** que gerava grau de marcação de fluoróforo para IgG de 15:1 na conjugação do RTX-Cy3.

Com relação ao **Cy7** foi obtido o grau de marcação de aproximadamente 3:1 (Cy7:IgG) no **Método único** que seguia o datasheet.

5.2. Padronização e detecção de células CD20-positivas por Citometria de Fluxo:

5.2.1. Padronização da técnica de marcação de células CD20-positivas:

Foram padronizados dois procedimentos para marcação de células CD20-positivas com anticorpo anti-CD20, por citometria de fluxo. No **PROCEDIMENTO I**, foram estabelecidas as seguintes condições: 1×10^6 células por condição, bloqueio com 3% de BSA em PBS pH 7,4 por 60 minutos à TA e incubação com $2 \mu\text{g}$ de RTX-FITC

overnight à 4°C. No **PROCEDIMENTO II**, foi utilizado um outro anticorpo primário, anti-CD20 humano de camundongo clone 2H7 (ThermoScientific), e foram utilizadas as seguintes condições: 1×10^6 células, fixação com 0,4% de Paraformaldeído (PFA) por 8 minutos, seguido por solução de Glicina 300 mM em PBS por 15 minutos, bloqueio com 3 % de BSA em PBS pH 7,4 por 2 horas à TA, 0,5 µg de anticorpo primário anti-CD20 por 1 hora à TA e 0,05 µg de anticorpo secundário anti-mouse com Alexa 633 (Invirogen) por 1 hora à TA.

No PROCEDIMENTO I, foi utilizado 2 µg de RTX-FITC de anticorpo primário, porque foi visto que não havia diferença entre duas concentrações de anticorpo conjugado (2 µg e 4 µg), tanto no controle positivo (Toledo) como no controle negativo (H1299) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Padronização da massa de RTX-FITC utilizado *overnight* na marcação de células CD20-positivas por citometria de fluxo, tanto na linhagem celular Toledo (controle positivo) como na linhagem celular H1299 (controle negativo), utilizando 3% de bloqueio com BSA. Neste experimento foram utilizados 2 µg e 4 µg de RTX-FITC ou Isotipo-FITC. Porcentagem das células CD20-positivas com desvio Padrão dos experimentos.

No entanto, na análise de células CD20-positivas pelo PROCEDIMENTO I percebeu-se que a morfologia e a granulosidade das células de melanoma (SK-Mel-147 ou SK-Mel-29) e do controle positivo (Toledo) não estavam homogêneas, apresentando distribuição anormal ao longo do eixo do tamanho (FSC-A) e do eixo da granulosidade celular (SSC-A) (Gráfico 4A e 4B), que provavelmente poderia alterar as análises. Além disso, as células também apresentavam dupla população (Gráfico 4C). Por isso, tanto pela distribuição anormal como para averiguar se a frequência baixa de células CD20-positivas estavam certas (utilizando RTX-FITC), foi estabelecido um novo procedimento de marcação de células por citometria de fluxo (PROCEDIMENTO II), como já detalhado anteriormente, utilizando um anticorpo anti-CD20 da empresa ThermoFisher. Com isso, as células passaram a ter maior homogeneidade porque estas foram fixadas com 0,4% de PFA (Gráfico 4D).

Gráfico 4 - Eventos das linhagens celulares SK-Mel-29 (A), SK-Mel-147 (B) e Toledo (C e D) posicionados de acordo com o Tamanho (FSC-A) e a Granulosidade (SSC-A) por citometria de fluxo. A e B – Apresentando tamanho e granulosidade dispersa (PROCEDIMENTO I); C – apresentando dupla população (PROCEDIMENTO I); e D – apresentando população com maior homogeneidade (PROCEDIMENTO II).

5.2.2. Padronização da análise de células CD20-positivas em citômetro Attune NxT Flow Cytometer:

Como estratégia de análise foram selecionados as populações celulares com base em aspectos morfométricos, em gráfico de distribuição pontual de tamanho (FSC-A) por granulosidade (SSC-A), e depois foram analisadas nestas células as características imunofenotípicas, células CD20-positivas, em gráfico de distribuição pontual de marcador fenotípico (BL1-A) por tamanho (FSC-A). Além disso, também foram analisadas a contagem de eventos por BL1-A, utilizando um gráfico univariado do tipo histograma, a qual representa a detecção de eventos do fluoróforo FITC (Anexo C, Parte 1).

No gráfico SSC-A por FSC-A foram excluídos as partículas menores, que provavelmente seriam *debris* celulares e células mortas, sendo feito o *gate* em forma de polígono a partir da escala 1 de ambos os lados (Anexo C, Parte 1). Além disso, para cada imunofenotipagem, foram coletadas informações relativas aos aspectos morfométricos e imunofenotípicos de 10.000 eventos. A mesma padronização utilizada para a condição contendo RTX-FITC, também foi utilizada para as condições de controle da técnica (Autofluorescência, Anticorpo Secundário e Isotipo) (Anexo C, Parte 2).

Além disso, em todas as análises procedidas neste trabalho com as linhagens de melanoma também foram analisadas as linhagens Toledo e H1299 simultaneamente, com seus respectivos controles (Anexo C, Parte 2).

O número e a porcentagem de células CD20-positivas foram somente consideradas a partir das células detectadas pelo controle Isotípico, indiretamente descontando também a Autofluorescência e o Anticorpo secundário.

5.2.3. Resultado da análise de células CD20-positivas:

✓ PROCEDIMENTO I de marcação de células:

Inicialmente, utilizando o PROCEDIMENTO I, com anticorpo anti-CD20 RTX-FITC para marcação de células CD20-positivas, seguindo por análise de citometria de fluxo, foi visto que as linhagens celulares SK-Mel-147 e SK-Mel-29 em

condições de meio sugeridas pelo ATCC (condições normais), apresentaram em torno de 2,11% e 2,32% de células CD20-positivas em comparação ao isotipo (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Análise da porcentagem de células CD20-positivas nas linhagens celulares SK-Mel-147 e SK-Mel-29 por citometria de fluxo, utilizando 2 μ g de RTX-FITC, e os experimentos sendo feitos com células mantidas em condições de cultivo celular recomendada pelo ATCC.

Células em presença do agente estressor cisplatina:

Em seguida, para análise da linhagem celular de melanoma SK-Mel-147 em meio contendo agentes extressores (quimioterápico cisplatina), foi primeiro identificado a porcentagem de células em sub-G₁ utilizando diferentes concentrações de CDDP, com o objetivo de alcançar a concentração inibitória de 10% (IC₁₀).

Nas concentrações de 10, 25 e 50 μ M de CDDP a porcentagem de células contendo DNA fragmentado foi 8%, 37% e 56%, respectivamente, após tratamento por 24 horas (Gráfico 6). Com isso foi escolhida a concentração de 10 μ M para serem conduzidos os experimentos de análise de células CD20-positivas, em meio com condição de estresse.

Gráfico 6 - Determinação do percentual de células com DNA fragmentado (população sub-G₁), como indicativo de morte celular, utilizando Iodeto de Propídeo. Tratamentos da linhagem SK-Mel-147 nas concentrações de 10, 25 e 50 μ M de CDDP por 24 horas e procedida a análise em citômetro de fluxo. Os eventos são demonstrados por **(A)** gráfico do tipo histograma, contendo o parâmetro de Contagem linear por Contagem exponencial em BL3-A (fluoróforo), e por **(B)** gráfico de barras, contendo no eixo vertical DNA Fragmentado e no eixo horizontal concentração de CDDP.

O resultado da porcentagem de células CD20-positivas na linhagem SK-Mel-147 quando tratada com CDDP foi de 0,43%, sendo que na placa Controle (sem nenhum tratamento) a porcentagem de células CD20-positivas foi 1,05% (Gráfico 7), ou seja, não houve aumento das células CD20-positivas.

Gráfico 7 - Análise da porcentagem de células CD20-positivas na linhagem celular SK-Mel-147 em condições de estresse de cultivo celular com CDDP (10 μ M) por citometria de fluxo, comparado com condições de cultivo celular recomendado pelo ATCC (Controle), utilizando 2 μ g de RTX-FITC por condição.

✓ **PROCEDIMENTO II** de marcação de células:

Células em meio com diferentes condições:

Finalmente, utilizando o PROCEDIMENTO II, variando condições como confluência, passagem ou sub-cultivo e pH do meio em quatro diferentes linhagens celulares (SK-Mel-147, SK-Mel-29, SK-Mel-37 e UACC-62) detectamos no máximo 6,93% de células CD20-positivas (Tabela 8). Sendo que aparentemente estas condições não alteraram a porcentagem de células CD20-positivas. A linhagem celular utilizada como controle positivo (Toledo), apresentou porcentagem de células CD20-positivas que variaram à frequência de 53-86% dependendo do experimento (Tabela 8). Com isso, utilizando como anticorpo primário tanto o rituximabe como o anticorpo da Thermo, não houve alteração na porcentagem de células CD20-positivas.

Tabela 8. Análise da porcentagem de células CD20-positivas em linhagens celulares de melanoma (SK-Mel-147, SK-Mel-29, SK-Mel-37 e UACC-62) utilizando o **PROCEDIMENTO II** (em azul), relacionando com a passagem ou sub-cultivo da célula, a confluência e o pH do meio de cultivo. Estas células estavam sobre condições normais de cultivo. CT positivo – porcentagem de células CD20-positivas na linhagem celular Toledo.

Linhagem	Confluência	Passagem	pH do meio	% de céls CD20 positivas	CT positivo
SK-Mel-147	100%	27	7,02	0%	53%
	100%	30	7,14	0,17%	86%
	55%	32	7,36	1,2%	64%
	50%	27	7,38	1,29%	53%
SK-Mel-29	100%	48	6,79	0%	64%
	100%	28	6,80	3,20%	64%
	90%	47	6,81	6,93%	86%
	90%	44	6,85	0%	53%
	50%	30	6,98	1,09%	78%
	50%	51	6,87	2,58%	78%
	40%	45	7,11	0%	53%
SK-Mel-37	100%	85	7,05	1,24%	78%
	100%	89	7,38	1,63%	61%
	50%	89	7,43	0%	61%
UACC-62	100%	59	7,09	0%	61%
	95%	77	7,20	0%	61%
	55%	77	7,43	2,03%	61%

5.3. Imagem óptica *in vivo* (IVIS):

Na imagem óptica foram feitas análises de 2 (Figura 10A), 4 (Figura 10B), 6 (Figura 10C), 24 (Figura 10D) e 96 horas (Figura 11A) após a injeção via caudal do RTX-Cy7. Foi visto que a partir de 2 horas já havia *uptake* no tumor, como pode ser visto na detecção da Região de Interesse (ROI), que aumentou ao longo do tempo em relação ao camundongo controle (sem tumor e sem RTX-Cy7).

Figura 10 - Imagem óptica *in vivo* de camundongos NOD/SCID com tumores de células de melanoma SK-Mel-147, com a Região de Interesse (ROI) demarcando a área de *uptake* do tumor, tendo o conjugado RTX-Cy7 sido injetado nos tempos de 2 (A), 4 (B), 6 (C) e 24 (D) horas antes da aquisição da imagem. Foi utilizado como camundongo controle, um animal sem tumor e sem conjugado RTX-Cy7, que foi posicionado ao lado de cada animal com tumor e que recebeu o conjugado.

No entanto, no tempo de 96 horas o *uptake* do RTX-Cy7 foi menor do que o tempo de 24 horas, demonstrando como esperado a depuração do anticorpo conjugado.

Após o tempo de 96 horas, a análise *ex vivo* demonstrou elevado *uptake* em relação a um tumor de um animal que não recebeu o anticorpo conjugado (Figura 11B).

Figura 11 - Imagem óptica *in vivo* do camundongo NOD/SCID com tumor de célula de melanoma SK-Mel-147, com a Região de Interesse (ROI) demarcando a área de *uptake* do tumor, no tempo de 96 horas (A). Neste mesmo tempo foi feita análise *ex vivo* deste tumor, com ROI demarcado em comparação a um tumor de um animal que não recebeu o conjugado RTX-Cy7 (B).

5.4. Análise de células CD20-positivas por imunofluorescência:

Imunofluorescência com RTX-FITC: Embora conseguimos proceder a marcação da membrana celular de tecido de linfonodo humano (controle positivo) utilizando RTX-FITC, no entanto, a marcação do RTX-FITC se manteve difusa e inespecífica no tecido tumoral (Anexo D).

Imunofluorescência com RTX-Cy3: No caso do RTX-Cy3, não conseguimos proceder a marcação tanto no controle positivo (baço de camundongo C57/Bl 6) como no tecido tumoral de melanoma humano gerado pela linhagem SK-Mel-147 (resultado não demonstrado).

Imunofluorescência com anti-CD20 policlonal de coelho (empresa ThermoFisher): Levando em consideração que a detecção de células CD20-positivas utilizando o rituximabe não foi promissor, testamos um anticorpo monoclonal anti-CD20 humano de camundongo (clone 2H7) e um anticorpo policlonal de coelho específico para a realização desta técnica, ambos da empresa ThermoScientific. Esta análise foi procedida em tecido de melanoma, utilizando como controle positivo linfonodo humano.

A padronização deste metodologia foi: 10 minutos de fixação em Acetona, seguido por 60 minutos de bloqueio com TBS/BSA 3,0% à TA, seguido por incubação

com anticorpo primário na diluição de 1:100 *overnight* a 4°C, e finalmente incubação com anticorpo secundário (anti-rabbit conjugado com Alexa 633, fabricante Invitrogen) na concentração de 5 µg/ml juntamente com Hoechst (diluição 1:1000) por 2 horas à TA.

Abaixo está sendo demonstrado o resultado da técnica procedida com anticorpo policlonal de coelho na diluição 1:100 (Figura 12A), que foi a melhor padronização em tecido de linfonodo.

Em seguida, utilizando as mesmas condições foi procedida a marcação de células CD20-positivas no tecido de melanoma. Embora o tecido sugere marcação de membrana em algumas células de regiões do tumor (Figura 12B, seta amarela), no entanto as marcações demonstram-se difusas em comparação ao controle positivo (Figura 12A).

Figura 12 - Padronização da metodologia de imunofluorescência por marcação indireta em linfonodo humano, utilizando anticorpo policlonal anti-CD20 feito em rabbit (ThermoScientific) na diluição de 1:100 seguido por anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com Alexa 633 (Figura 9A). Em seguida foi procedida marcação em tumor gerado de células de melanoma humano SK-Mel-147, demonstrado padrão de marcação de membrana pelas setas amarelas (Figura 9B). Ambos analisados pelo microscópio Confocal LSM 510 Meta Zeiss.

5.5. Imunocitoquímica de células de melanoma em condição de hipóxia:

Seguindo o protocolo descrito na Metodologia deste capítulo, foi procedido a marcação da linhagem Toledo (controle positivo), seguido pela marcação das linhagens de melanoma. Embora foi detectado marcação de membrana no controle positivo quando utilizado o anticorpo anti-CD20 (Figura 13), no entanto não houve marcação nas linhagens de melanoma averiguadas (SK-Mel-05, UACC-62 e CHL-1), sendo somente demonstrado aqui a linhagem UACC-62. Tanto em condição de normóxia como em condição de hipóxia por 24 horas, como demonstrado no comprimento do fluoróforo Alexa 488 (Figura 14).

Figura 13 – Análise de Imunocitoquímica de células CD20-positivas, utilizando a linhagem Toledo (controle positivo). Na figura também são demonstrados os controles de marcação da técnica: controle Isotópico (imunoglobulina de coelho) e controle Secundário (somente o anticorpo secundário). Detecções utilizando o filtro de luz do DAPI e FITC, e a junção das duas imagens (Merge), com detalhamento da marcação de membrana (seta branca).

Figura 14 - Análise por Imunocitoquímica de células CD20-positivas em linhagem de melanoma humano UACC-62, em condição de hipóxia e normóxia por 24 horas. Foi diminuída à exposição em relação ao controle Isotípico. Linhagem celular de melanoma UACC-62 com marcação por Hoechst (Filtro DAPI) e Alexa 488 (Filtro FITC).

5.6. Análise de Histologia e Imunoistoquímica do tumor

5.6.1. Análise Histológica

Os tumores gerados por três linhagens celulares de melanoma humano (SK-MEL-147, CHL-1 e UACC-62) foram corados com coloração de HE (Figura 15A), apresentando as seguintes características histológicas resumidas abaixo:

O tumor gerado pela linhagem SK-MEL-147 foi o que apresentou morfologia mais agressiva, dentre os três, e os tumores gerados pelas linhagens CHL-1 e a UACC-62 apresentaram rico suprimento sanguíneo. Os três tumores sólidos foram limitados por uma cápsula fibrosa fina. O tumor SK-MEL-147 apresentou variação na arquitetura e área de necrose representada pela presença de núcleos picnóticos e células germinais necróticas (células fantasmas), além de o tumor apresentar células fusiformes. Os tumores CHL-1 e UACC-62 não apresentaram variação na arquitetura, entretanto, uma área hemorrágica foi detectada na UACC-62. Células epitelióides predominaram nos dois tumores. Os tumores CHL-1 e UACC-62 apresentaram núcleos claros e regulares com nucléolos proeminentes, contendo um ou dois nucléolos em CHL-1 e mais de dois nucléolos na UACC-62. A SK-

MEL-147 apresentou núcleos escuros e regulares com nucléolos imperceptível ou pouco notáveis. O citoplasma foi caracteristicamente rosa e claro na CHL-1 e UACC-62, enquanto rosa e escuro na SK-MEL-147. Finalmente, células individuais foram alongadas e condensadas com diminuição da relação nuclear/citoplasma em todos os tumores.

5.6.2. Padronização e Análise Imunoistoquímica de células CD20-positivas:

As marcações com anticorpo anti-CD20 somente foram procedidas em tecidos tumorais com as linhagens SK-Mel-147 e UACC-62. Tendo sido utilizado como controle positivo tonsila humana por causa da grande quantidade de células CD20-positivas nos centros germinativos (CG) (Figura 15B).

A marcação de células CD20-positivas utilizando o rituximabe não se demonstrou eficiente no controle positivo, mesmo sendo utilizado diferentes tipos de recuperação antigênica (como micro-ondas e panela de pressão) e bloqueios (como IgG de cabra e soro de cabra). Por isso, foi utilizado o mesmo anticorpo utilizado nas técnicas de imunocitoquímica e imunofluorescência, o anticorpo anti-CD20 policlonal de coelho, que também é específico para imunistoquímica.

Com isso, para a imunohistoquímica do anticorpo policlonal anti-CD20, as melhores condições foram: recuperação antigênica em micro-ondas por 20 minutos, bloqueio com soro de cabra por 30 minutos, anticorpo primário de coelho anti-CD20 por 1 hora à TA (diluição 1:100) e anticorpo secundário anti-coelho 1:400 por 1 hora à 37°C.

Na detecção de células CD20-positivas no tumor, não foram detectadas marcações positivas nos tumores gerados pelas linhagens SK-Mel-147 e UACC-62 (Figura 15B).

Figura 15 - Histologia procedida com marcação por HE em cortes de tumores gerados pelas linhagens celulares de melanoma humano CHL-1, SK-Mel-147 e UACC-62 (**A**), e Imunoistoquímica procedida com anticorpo de coelho anti-CD20 da empresa ThermoScientific em tumores gerados pelas linhagens SK-Mel-147 e UACC-62 (**B**). Foi utilizado como controle positivo de marcação anti-CD20 o tecido de tonsila humana, tendo sido detectadas maiores marcações membranares anti-CD20 nos centros germinativos (CG). Nas figuras estão sendo demonstrados cortes no aumento de 40X e 400X.

5.7. Análise da expressão gênica de CD20 em células e tumores de melanoma:

A análise da expressão do gene MS4A1, responsável pela proteína CD20, foi feita em células de melanoma e tumores, sendo utilizado como controle para padronização da curva de eficiência do *primer* MS4A1, o cDNA da linhagem celular Toledo. No qual foi procedido uma diluição seriada com cDNA desta linhagem (50; 25; 12,5; 6,35 ng), que demonstrou um bom coeficiente de rendimento para a curva de eficiência deste *primer* (Gráfico 8A).

Em seguida foi procedido análise do cDNA das linhagens celulares de melanoma (SK-Mel-147, SK-Mel-29, SK-Mel-37, SK-Mel-05, UACC-62 e CHL-1) e dos tumores de melanoma (gerado pelas linhagens SK-Mel-147 e UACC-62), e foi visto que somente houve amplificação a partir do 30º ciclo para estas amostras (Gráfico 8B).

A maior expressão relativa do gene MS4A1 foi detectada na linhagem Toledo (controle positivo), apresentando 5×10^6 vezes maior expressão do que o controle negativo (linhagem H1299). Com relação as amostras de células e tumores, foi visto que o tumor derivado da linhagem celular UACC-62 apresentou maior expressão relativa do gene MS4A1, em torno de 500 vezes maior expressão do que o controle negativo. Todas as outras expressões da análise foram próximas ou igual ao controle negativo (Gráfico 9).

Gráfico 8 - Gráficos da Amplificação da expressão gênica do CD20/MS4A1 e GAPDH (controle endógeno), contendo diluição seriada do cDNA (50; 25; 12,5; 6,35 ng) da linhagem Toledo para análise da Curva de Eficiência do *primer* CD20/MS4A1 (A); e com análise das amostras das linhagens celulares (SK-Mel-147, SK-Mel-29, SK-Mel-37, SK-Mel-05, UACC-62 e CHL-1) e de tumores (formados pelas linhagens SK-Mel-147 e UACC-62) (B). Controle positivo (Toledo) e controle negativo (H1299). A primeira chave demonstra o gene GAPDH, e a segunda chave demonstra o gene CD20/MS4A1, contendo amostras das linhagens celulares, tumores e controle negativo, com amplificação tardia.

A)

B)

Gráfico 9 - Análise da expressão relativa do gene MS4A1 das amostras de linhagens celulares (SK-Mel-147, SK-Mel-29, SK-Mel-37, SK-Mel-05, UACC-62 e CHL-1) e de tumores (formados pelas linhagens SK-Mel-147 e UACC-62). Desvio padrão de três experimentos.

5.8. Análise *in silico*:

Na análise *in silico*, em primeiro lugar para detecção da frequência de mutação do gene MS4A1, detectamos 3% e 2,2% de mutações somáticas presente no total de amostras de melanoma dos pacientes analisados (287 pacientes) (Figura 16A), utilizando o TCGA SKCM (3%) e o COSMIC portal (2,2%), respectivamente. A maior parte foi mutação missense com significância desconhecida. Também foi visto baixo índice de amplificação nestas amostras. Com isso, vemos que o gene MS4A1 é um gene conservado.

Em seguida, analisando a co-expressão de genes relacionado ao MS4A1 em melanomas, identificamos 153 genes utilizando a correlação de Pearson até 0,8. Logo após para analisar os processos biológicos destes genes, avaliamos se estavam envolvidos com resposta imunológica ou pluripotência. Foi identificado, que o gene MS4A1 estava associado com genes ligados a ativação de leucócitos, ativação de linfócitos, diferenciação

de linfócitos, regulação do sistema imune e genes de células B, e não foram relacionados a pluripotência, como demonstrado pelo Diagrama de Venn (Figura 16B).

As análises de sobrevida pelas curvas de Kaplan Mayer demonstraram que uma elevada expressão de MS4A1 foi correlacionada com melhor prognóstico, tanto por sobrevida livre de doença como sobrevida completa (Figura 16C). Para isto procedemos análise no microarray data set do GSE65904 do GEO database, e foram analisados 214 pacientes com melanoma metastático, nos estágios III e IV.

Para identificar os DEGs relacionados com o gene MS4A1, somente fizemos análise utilizando o Test-t sem a correção com o Bonferroni, e foi visto que 6 DEGs apresentaram expressão diminuída relacionado com alta expressão de MS4A1 em grupo de melanoma: RAB12, EGR3, FcGBP, ZNF346, ZNF236 and MAML3 ($p < 0.0001$). As funções destes genes estão sendo demonstradas na Tabela 9.

Finalmente, analisando a correlação entre expressão de MS4A1 em melanoma e genes marcadores celulares relacionados a pluripotência células tronco de melanoma ou ativação/regulação de linfócito B, detectamos que os genes correlacionados com expressão MS4A1 positiva foram apenas dois com expressão gênica de baixo à moderado: FCGBP (que foi um dos seis DEGs; $r=0.48$, $p=0.0005$) e SOX2 (gene de pluripotência; $r=0.45$, $p=0.001$).

Figura 16 - Análise *in silico* dos *clinical database* demonstrando: porcentagem de mutação somática do gene MS4A1 (A); processos biológicos associados com proteína CD20 apresentado pelo Diagrama de Venn (B); e Curva de sobrevida por Kaplan Mayer, analisando sobrevida livre de doença e índice de sobrevida global) (C).

Tabela 9 - Sigla, Nomeclatura e Função dos 6 DEGs relacionados com o gene MS4A1, avaliados pela Plataforma Gene Expression Omnibus (GEO).

Sigla do GENE	Nomenclatura	Função
RAB12	Proteína relacionada ao RAS	Metabolismo de proteínas
EGR3	Fator de resposta de crescimento inicial 3	Regulação transcricional de genes
FcGBP	Proteína ligada ao Fragmento Fc de IgG	Resposta imune
ZNF346	Proteína Zinc Finger 346	Crescimento celular e sobrevivência
ZNF236	Proteína Zinc Finger 236	Regulação transcricional de genes
MAML3	Co-ativador transcricional similar à proteína mastermind	Regulação transcricional de genes

6. DISCUSSÃO

A identificação de células tronco de melanoma CD20-positivas, ou de marcadores outros específico de melanoma levaria a provável utilização de um tratamento alvo para este tumor, ou até mesmo para ser feito um diagnóstico ou teranóstico acurado, quando marcado com radionuclídeo. Assim como é feito para outros tipos de tumores, como o HER2 utilizado na detecção do câncer de mama (MITRI *et al.*, 2012) ou BCR-ABL para a detecção de Leucemia Mielóide Crônica (WYLIE *et al.*, 2017).

Os melanomas são formados por sub-populações heterogêneas, no qual tem se tentado identificar nos últimos anos importantes marcadores de célula que possam prever resistência ou resposta ao tratamento (SOMASUNDARAM *et al.*, 2012), por exemplo identificando as CTCs de melanoma (KUMAR *et al.*, 2017). No entanto, várias linhas de pesquisa tem sido contraditórias com relação a teoria das CTCs, e não tem sido bem-sucedidas em identificar estas sub-populações e conseguir detectar os reais marcadores destas células (BRINCKERHOFF *et al.*, 2017). Principalmente pelo fato destas células terem uma baixa frequência e poderem ser dinâmicas, ou seja, aumentar ou diminuir a frequência conforme as alterações no microambiente (BAO *et al.*, 2013). Podendo chegar em alguns trabalhos a alcançar frequência somente de 0,0001% (QUINTANA *et al.*, 2008) ou 40% com perfil fenotípico tronco (HOEK & GODING, 2010).

A instabilidade genômica na qual as células cancerígenas podem alterar seus fenótipos ou marcadores celulares em resposta ao microambiente tem sido descrito detalhadamente para os melanomas por Hoek e Goding em 2010 (HOEK & GODING, 2010).

Tanto *in vitro* como *in vivo* tem vários fatores no ambiente ou microambiente que podem regular esta frequência das CTCs. Na parte *in vitro* existem os parâmetros de cultura, como concentração de oxigênio (CSETE, 2005), material da cultura celular (LUTOLF & HUBBELL, 2005), meio de cultura (soro ou fatores de crescimento) (RAO & ZANDSTRA, 2005), dentre outros, e na parte *in vivo* tem-se as células estromais

associadas com fibroblastos, adipócitos, células perivasculares, macrófagos associados a tumores e células imunes (LI & XIE, 2005; PATTABIRAMAN & WEINBERG, 2014).

Este trabalho teve como proposta a utilização do anticorpo monoclonal anti-CD20 rituximabe para ser utilizado na análise da dinâmica populacional de CTCs de melanoma, almejando as células CD20-positivas, e posteriormente utilizando este anticorpo como ferramenta de teranóstico para este tipo de tumor. No entanto por diferentes metodologias foi incerto ou não foi confirmado a presença destas células.

Mediante o uso do marcador CD20, nos perguntamos no final do projeto se talvez foi o melhor marcador a ser utilizado para CTCs de melanoma, já que outros marcadores como CD133, ABCB5 ou ALDH são muito utilizados. No entanto, o principal foco deste projeto foi aproveitar a possibilidade de ser utilizado uma imunoterapia já disponível e aprovada na clínica (rituximabe) para tratar e diagnosticar estes pacientes.

6.1. Detecção de CTCs - limitações técnicas e controles de qualidade experimentais:

O fato dos marcadores celulares de CTCs poderem ser alterados através de circunstâncias experimentais (laboratório), traz muitas limitações na detecção destas células. Por exemplo, o processo de dissociação enzimática ou mecânica de células ou do tumor pode alterar os marcadores de superfície (TSUJI *et al.*, 2017). Stecca e colaboradores (2013) demonstraram a relação de enzimas utilizadas no cultivo celular, que podem alterar a presença e frequência destes marcadores, levando em consideração a concentração e o tempo de uso.

A tripsina foi um bom método enzimático utilizado no trabalho de Quintana e colaboradores, tendo sido utilizado collagenase para identificar CTCs (QUINTANA *et al.*, 2008). No entanto, dependendo de experimento para experimento é importante analisar o dissociador enzimático, para evitar artefatos. Neste trabalho utilizamos tripsina para separar as células *in vitro*, e um homogeneizador mecânico Polytron para dissociar o tumor e proceder análise da expressão gênica, porém dificilmente estas metodologias devem ter alterados nossos resultados.

Além disso, tem se visto que alguns dos desafios relatados na literatura para detectar marcadores celulares está relacionado com protocolos ineficientes, utilizando concentrações e tipos de fluoróforos, densidades celulares, tempo de incubação ou diferentes estratégias de gate metodológicas ineficientes (GREVE *et al.*, 2012). Portanto, sempre o ideal é proceder diferentes análises metodológicas, padronizando os protocolos da melhor maneira possível.

Por isso, aqui neste trabalho foram utilizadas diferentes metodologias para detectar as prováveis CTCs CD20-positivas. Dentre elas imunoenaios, como citometria de fluxo, imunofluorescência, imunohistoquímica, imunocitoquímica; técnica de biologia molecular, como o PCR em tempo real; técnica de imagem molecular, como a imagem óptica *in vivo* por fluorescência; e até mesmo análises *in silico*.

Este trabalho teve como proposta utilizar o anticorpo monoclonal terapêutico anti-CD20 rituximabe para detectar células CD20-positivas de melanoma, principalmente para analisar a especificidade deste anticorpo em detectar o CD20 na membrana de células de melanoma. No entanto, outras opções de anticorpos anti-CD20 tiveram que ser utilizados, dentre eles anticorpos experimentais (monoclonal e policlonal) da empresa ThermoFisher, que eram específicos para determinadas técnicas laboratoriais.

A porcentagem de células CD20-positivas no painel de linhagens celulares (SK-Mel-147, SK-Mel-37, SK-Mel-29 e UACC-62) analisadas aqui foram baixas, alcançando no máximo 7% de células CD20-positivas, em condições de cultivo sugerida no ATCC ou em presença de agentes extressores, resultado que corrobora com a baixa frequência de células CD20-positivas, de acordo com a literatura. Estes resultados foram semelhantes tanto para o rituximabe como para um anticorpo monoclonal da ThermoFisher, inclusive variando os métodos de aquisição e processamento das linhagens celulares por citometria (PROCEDIMENTO I e PROCEDIMENTO II).

Levando em consideração a baixa frequência de células CD20-positivas, sempre utilizamos como controles da metodologia da técnica de citometria de fluxo, o controle de autofluorescência, controle isotópico, controle negativo e o controle positivo da técnica (linhagem celular Toledo), para diminuir os falso-positivos. Além disso, embora houve variação na porcentagem de células CD20-positivas na linhagem celular Toledo, variando

de experimento para experimento, mas isso não alterou a porcentagem de células CD20-positivas nas linhagens celulares de melanoma, sempre se mantendo até no máximo 6,9%. Alguns pesquisadores tem relatado a importância de ser procedida análise de *cell sorting* ou a separação utilizando beads magnéticos para serem feitas análises de pluripotência somente com células com marcadores de células tronco, no entanto não foi feito aqui.

A utilização de diversos fluoróforos (FITC, Cy3 e Alexa), utilizado aqui, foi para tentar diminuir o efeito do *background* que poderia haver nas análises, principalmente quando são utilizados fluoróforos que emitem luz no comprimento de onda da auto-fluorescência de tecidos animais ou células (como FITC).

Com relação aos resultados anteriores do grupo (Anexo A), os motivos pelas quais houve diferença entre a porcentagem de células CD20-positivas neste projeto em comparação aos resultados preliminares provavelmente foram: pela ausência do controle isotípico dos experimentos prévios; o lote de RTX-FITC utilizado para marcação das células foi um lote diferente deste trabalho de doutorado; e principalmente, porque o bloqueio com BSA (3% de BSA em TBS) utilizado neste trabalho foi maior do que o bloqueio utilizado nas análises dos resultados preliminares do laboratório (0,1% de BSA em TBS). Portanto, os resultados preliminares da porcentagem de células CD20-positivas pode ter sido super-estimado por ligações inespecíficas do anticorpo anti-CD20 rituximabe com epítomos na membrana das células das linhagens de melanoma.

No caso da imunofluorescência em tecido, a utilização do RTX-FITC demonstrou a detecção de células CD20-positivas em linfonodo, no entanto não obtivemos marcação específica no tumor (marcação difusa). Além disso, o método do RTX-Cy3 não apresentou marcação no controle positivo e não demonstrou especificidade.

Na imunofluorescência procedida em microscópio confocal obtivemos melhores resultados do que o microscópio de fluorescência comum. Além disso, foram utilizados dois anticorpos experimentais da ThermoFisher, e não o rituximabe, como utilizado nos experimentos anteriores, sendo que o melhor anticorpo utilizado foi um anticorpo anti-CD20 policlonal, em associação com um anticorpo secundário, contendo o fluoróforo Alexa 633. Este anticorpo primário policlonal acabou sendo o melhor padronizado e utilizado para as técnicas de imunocitoquímica e imunohistoquímica. Estes resultados da

imunofluorescência com microscopia confocal parecem ter demonstrado a marcação de membrana para o tecido de tumor da linhagem SK-Mel-147, no entanto pela ausência do controle isotópico da técnica não pudemos afirmar a especificidade da marcação.

As análises de imagem óptica *in vivo* utilizando o RTX-Cy7 demonstraram o *uptake* do conjugado a partir de 2 horas, se mantendo até 96 horas após a injeção do conjugado, em relação ao controle. No entanto, estes resultados também não tiveram o controle isotópico (Isotipo-Cy7) assim como as análises de imunofluorescência acima, para identificar se a marcação no tumor foi específica ou inespecífica (se ligando pelo domínio Fc dos anticorpos em receptores Fc das células tumorais). Com isso, uma estratégia ideal para sobrepor a marcação inespecífica seria a utilização do “Pretargeted imaging technique”, técnica esta que diminui as ligações inespecíficas promovidas pelo receptor de Fc. Este é um procedimento *in vivo*, que funciona através de dois passos principais, na primeira etapa é injetado o anticorpo acoplado a uma molécula trans-cicloocteno, e posteriormente é injetado um radionuclídeo conjugado a uma molécula tetrazina, havendo interação de um pelo outro *in vivo*, finalizando com a aquisição das imagens moleculares. Com isso, as captações geradas pelas ligações inespecíficas do anticorpo com o receptor de Fc da célula tumoral são atenuadas, aguardando-se o clearance destas substâncias que estão ligadas inespecificamente.

Esta técnica foi demonstrada e utilizada no artigo de colaboração feito com o Grupo de Radiomarcagem da Universidade de Montevidéu, aperfeiçoada e preparada nos nossos laboratórios do CTO-ICESP para conduzir os experimentos que foram demonstrados no artigo do Apêndice desta tese.

Com isso os resultados até aqui demonstraram uma provável identificação de células CD20-positivas, *in vitro* e *in vivo*, que precisavam serem confirmadas. Por isso foram procedidas análises por imuncitoquímica, análise por imunohistoquímica, análise da expressão gênica por PCR em tempo real e análise *in silico*.

Na análise por imunocitoquímica, utilizando três linhagens de melanoma em condições de hipóxia, foi visto que não houve detecção de células CD20-positivas quando comparado ao controle isotópico da metodologia. Análise e resultado que se repetiu na técnica de imunoistoquímica.

A análise da expressão gênica do CD20/MS4A1 em células e tumores de melanoma foi visto que a amplificação do gene foi somente a partir do 30°-34° ciclo, chegando algumas amostras à amplificarem no 38° ciclo, sendo uma expressão muito baixa ou inexistente, semelhante a linhagem H1299, utilizada como controle negativo. Esta técnica foi importante pois é altamente sensível, e mais uma vez sugere a não identificação de células CTCs CD20-positivas nas nossas amostras.

Na análise *in silico* foi identificado que apenas 2% das mutações estavam presentes no gene MS4A1 de amostras de melanoma metastático, sendo esta uma proteína conservada identificada como contendo 73% de homologia em sequências de aminoácido. Além disso, o site Uniprot somente apresenta referência de duas prováveis isoformas para esta proteína (Site do Banco de Dados Uniprot). Sendo este marcador detectado com maior facilidade em linfonodos e órgãos do baço. Portanto, o CD20 seria considerado um bom marcador celular para detectar e marcar células CD20-positivas, como no melanoma, por não possuir muitas mutações. No entanto, um dos problemas para isto é que o tumor de melanoma é considerado um tumor com alta quantidade de linfócitos B infiltrantes.

Considerando este problema, neste trabalho tentamos identificar *in silico* as células CD20-positivas no tumor e co-relacionar com as características de pluripotência (de CTCs), excluindo células CD20-positiva que fossem associados com resposta imunológica (de linfócitos B).

Como visto pela análise por Kaplan Mayer foi detectado que a alta expressão gênica de MS4A1 foi relacionada com aumento de sobrevida livre de metástase e aumento do índice de sobrevida completa, ou seja provavelmente a expressão do gene MS4A1 deve-se correlacionar com linfócitos B e não com pluripotência, como visto na literatura (FORTES *et al.*, 2015).

Além disso, as células CD20-positivas detectados em amostras de pacientes demonstram a detecção de 6 DEGs, demonstrados acima, no qual EGR3 é relacionado ao desenvolvimento de linfócitos (SINGH *et al.*, 2017). Na análise de co-expressão pelo TCGA SKCM sugere que a expressão de MS4A1 é fundamentalmente derivada do desenvolvimento de linfócitos B. Com isso, os dados *in silico* produzidos aqui sugerem que a detecção de células CD20-positivas no tumor seja de linfócitos B e não de células

pluripotentes, sugerindo conforme alguns autores a presença de Órgãos Linfóides Terciários.

6.2. Linfócitos B e Órgãos linfoides terciários:

Os resultados preliminares com imagem molecular demonstrando o aumento da captação em tumores de animais gerados pela linhagem B16F10, assim como as detecções nos animais NOD/SCID gerados pela linhagem SK-Mel-147, sugere a detecção de células CD20-positivas.

No entanto, considerando que o melanoma assim como tumor de cólon são tumores que possuem alta quantidade de linfócitos infiltrantes no tumor, como comentado anteriormente, estas detecções por imagem molecular podem estar demonstrando regiões de Órgãos Linfóides Terciários. Esta sugestão parece ter maior representatividade quando visto os resultados das análise *in silico*, onde o aumento de expressão de células CD20-positivas está co-expressa com genes relacionados a inflamação e resposta imunológica, oferecendo aos pacientes aumento de sobrevida global e sobrevida livre de metástase em relação a pacientes com baixo número de células CD20-positivas.

As regiões denominadas de Órgãos Linfóides Terciários (OLTs) são regiões que apresentam uma morfologia similar aos Órgãos Linfóides Secundários (OLSs), no entanto diferentemente os OLTs são formados em regiões de tecidos não-linfóides, muito próximas ou nas próprias regiões associada com inflamação, incluindo regiões de transplante e tumores (GEURTSVANKESSEL *et al.*, 2009; WILEY *et al.*, 2009). Além disso, os OLTs são órgãos linfóides pós natal, diferentemente dos Orgãos Linfóides Primários e Secundários que são formados na embriogênese ou no início da vida do bebê.

Foi visto que um tipo de OLT, tecido linfóide associado ao brônquio, poderia independentemente iniciar a resposta local de célula B e T (MOYRON-QUIROZ *et al.*, 2004), e também poderia atuar como um reservatório de memória contendo estas células B e T (MOYRON-QUIROZ *et al.*, 2006). Camundongos com estes OLTs são mais resistentes a infecção pulmonar à uma variedade de agentes infecciosos do que camundongos sem estas estruturas (GEURTSVANKESSEL *et al.*, 2009; WILEY *et al.*, 2009). Resultados de Dieu-Nosjean e colaboradores (DIEU-NOSJEAN *et al.*, 2016; DIEU-

NOSJEAN *et al.*, 2014) demonstram que os OLTs associados ao brônquio apresentam ativa resposta imune celular e humoral contra câncer de pulmão.

Além disso, tem sido visto que a presença (ou maior densidade) de OLTs deve estar relacionado não apenas como um marcador de prognóstico mas também como um biomarcador utilizado para seleção de pacientes tratados com imunoterapia e ou para monitorar pacientes durante intervenção terapêutica (HIRAOKA *et al.*, 2016). Na qual a imunoterapia é uma importante ferramenta utilizada atualmente para melanoma, utilizando por exemplo inibidores anti-PD1 e anti-PD-L1 (TSAI *et al.*, 2014).

Rodriguez e colaboradores foram capazes de identificar e caracterizar OLTs em melanoma murino gerado por linhagens B16-F1 em camundongos C57BL/6, tendo sido esta caracterização feita por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (RODRIGUEZ *et al.*, 2018).

6.3. Tumorigênese do melanoma dependente ou não de CTCs:

Os resultados mais recentes na literatura demonstram uma interessante proposta, todos publicados na revista Cell Stem Cell. Moon e colaboradores (2017) demonstraram que o melanoma se origina de células tronco de melanócitos competentes (não quiescentes) que são ativadas por radiação ultravioleta (UVB), por um processo induzido via inflamação. Por outro lado, Kohler e colaboradores (2017) demonstraram que a origem dos melanomas se deu através de melanócitos diferenciados, que se expandem clonalmente dentro da epiderme antes de perderem suas características diferenciadas, relacionado com mudanças regionais no tumor causadas por interação com microambiente ou alterações intrínsecas na célula, através de reprogramação transcricional. Em seguida, as pesquisadoras Soengas e Patton (2017) citaram estes dois artigos, relatando que a formação do melanoma pode ocorrer das duas formas para originar o tumor de melanoma, no entanto sendo dependente do momento da ativação da célula (proliferativa ou não) e do local, que devem promover alterações genéticas e epigenéticas, dando origem ao processo de tumorigênese.

Com isso, estes estudos demonstram que o processo de tumorigênese de melanoma pode ocorrer por processo dependente/independente relacionado à CTCs, e o microambiente tem uma importante função na carcinogênese.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, não fomos capazes de demonstrar a presença ou ausência completa de células de melanoma CD20-positivas. Embora, como visto aqui, existam fortes indícios da inexistência destas células em várias linhagens celulares e tumores de melanoma, com as condições utilizadas.

Além disso, é um desafio a detecção de células de melanoma CD20-positivas, tanto devido à baixa expressão de CTCs, caso sejam, como também pelo fato dos linfócitos B presentes no tumor também serem células CD20-positivas, levando à detecção errônea.

Com isso, nossos resultados demonstram duas hipóteses: (i) a confirmação da hipótese nula das células CD20-positivas, ou (ii) a presença de erros técnicos na experimentação, já que diversas condições podem alterar a dinâmica e a frequência de CTCs.

DISCUSSÃO DA TESE

Nestes dois projetos desenvolvidos ao longo deste Doutorado, foram analisados importantes estruturas presentes ou capazes de interferir no microambiente do tumor, sendo um grande desafio, pela presença de diferentes células e moléculas que interferem na biologia tumoral.

No primeiro projeto, tentamos identificar o efeito do exercício físico no crescimento do tumor, atuando através da modulação do microambiente. Sendo que como foi demonstrado, o exercício voluntário em roda de exercício parece promover o aumento do tumor, e não ao contrário, como era pensado, em células de melanoma derivadas de BRAF mutado, em camundongos imunodeficientes. Sendo que esta resposta pode ser provavelmente modulada por alguns processos fisiológicos, incluindo pela resposta imunológica, já que o camundongo Balb/c Nude é atímico.

Em seguida, no segundo projeto, tentamos identificar CTCs presentes em células e em tumores gerados de células de melanoma, sendo que não fomos capazes de detectar estas células, mesmo sendo analisado algumas variáveis presentes no microambiente tumoral, que poderiam interferir nos resultados, além disso utilizamos várias metodologias, como por exemplo análise por imagem molecular para aumentar a especificidade e sensibilidade do projeto, no entanto, sem sucesso.

Este projeto foi conduzido a fim de identificarmos prováveis marcadores de CTCs, como no caso, células CD20-positivas, que seria extremamente importante para os pacientes com tumor de melanoma, principalmente pelo fato de já termos na clínica um anticorpo monoclonal anti-CD20 (rituximabe) que poderia ser re-direcionado para uso em pacientes com melanoma. No entanto, parece que outras estruturas, como os Órgãos Linfóides Terciários deveriam ser investigadas.

CONCLUSÃO DA TESE

Este trabalho buscou por diferentes abordagens influenciar (pelo exercício físico) ou entender (através da detecção de células tronco cancerígenas) os mecanismos presentes no microambiente tumoral, para que possa ser obtido sugestões de boas estratégias terapêuticas ou diagnóstico. No entanto, pudemos observar que se faz necessário a utilização de mais de um marcador de CTCs associado com ensaios fenotípicos, e também que o exercício físico pode ser uma terapia intervencional interessante para os pacientes com melanoma, mas que necessitam melhores estudos sobre o papel da resposta imunológica e da vascularização no tumor em resposta ao exercício.

Em adição, a importância do estudo do microambiente tumoral é extremamente desafiador, já que a relação entre os componentes presentes neste nicho, dentre eles interação do sistema imunológico, células do vaso, células normais, células tumorais, células tronco (normal e tumoral) demonstra a participação e regulação de um pelo outro, para entendimento e intervenção do tumor. Com isso, é importante que seja compreendido bem cada componente e as células atuantes em cada sub-tipo tumoral, para alcançar melhor os objetivos pretendidos.

Anexo A - Genes analisados e desenho dos primers para plataforma Fluidigm – Parte 1

Target	Forward Primer	Reverse Primer	Gene Full Name
ABCB1	AACACCACTGGAGCATTGAC	TACAGCAAGCCTGGAACCTA	ATP binding cassette subfamily B member 1
ABCB5	CCGAGGAGCTGCCTTTCATA	GGTTTATATCCAGCTGTGGAAAAGTTA	ATP binding cassette subfamily B member 5
ABCC1	GAAGCTGATGGAGGCTGACA	GAGTCCGATGGCCTTCATGTA	ATP binding cassette subfamily C member 1
ABCC2	GTTTTCTGAGGCCTCCTTACC	CACAAGTTGGCCTGCCATAA	ATP binding cassette subfamily C member 2
ABCC3	GGTCTTGCTGATTCCACTCAAC	GCGCGAGTCCTTCAATTTCA	ATP binding cassette subfamily C member 3
ABCC5	TTCTGGGACGCACAGAGAC	CCAAGGCATCTTGGCATTCC	ATP binding cassette subfamily C member 5
ABCG2	CCACTGCTGTGGCATTAAAC	GTGGCTTATCCTGCTTGGAA	ATP binding cassette subfamily G member 2 (Junior blood group)
ACTA2	ACCCGATAGAACATGGCATCA	GGCAACACGAAGCTCATTGTA	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
ACTB	GCCGTCTTCCCCTCCA	CTCGTCGCCCACATAGGAA	actin beta
ACVR1B	AGAAGCTGCGTCCCAACA	ACACTCTCGCATCATCTTCCC	activin A receptor type 1B
AKT1	CACACACTCACCGAGAACC	TCGTGGGTCTGGAAAGAGTA	AKT serine/threonine kinase 1
ALDH1A1	AGCAGAGCAAACCTCCTCTCA	TTCACTACTCCAGGAGGAAACC	aldehyde dehydrogenase 1 family member A1
ALDH3A1	CCCCTCGATCCAGAACCAAA	CGGGATTTCTTAGCATCTTCCC	aldehyde dehydrogenase 3 family member A1
ATM	TGCTTGCTGTTGTGGACTA	ATCCAGCCAGAAAGCATCA	ATM serine/threonine kinase
B2M	TTAGCTGTGCTCGCGCTAC	CTCTGCTGGATGACGTGAGTAA	beta-2-microglobulin
BAX	CCGGAAGTATCAGAACCATCA	GTCTTGGATCCAGCCCAACA	BCL2 associated X, apoptosis regulator
BCL2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	GTGCCGGTTCAGGTACTCA	BCL2, apoptosis regulator
BCL2L1	CCATGGCAGCAGTAAAGCAA	CTGGGATGTCAGGTCACTGAA	BCL2 like 1
BIRC5	GACCACCGCATCTCTACATTCA	CCAAGTCTGGCTCGTTCTCA	baculoviral IAP repeat containing 5
BMP7	ACGTTCCGGATCAGCGTTTA	CTGTGAGCAGGAAGAGATCC	bone morphogenetic protein 7
CASP1	CATTTGAGCAGCCAGATGGTA	GTCCTGGGAAGAGGTAGAAACA	caspase 1
CD34	GCATCTGCCTGGAGCAAAA	CCTCTCCCCTGTCCTTCTTAAA	CD34 molecule
CD44	CGGACACCATGGACAAGTT	GCAAAGCGGCAGGTTATATTC	CD44 molecule (Indian blood group)
CDH1	AGTGCCAACTGGACCATTCA	TCTAAGGCCATCTTTGGCTTCA	cadherin 1
CXCR4	CCCGACTTCATCTTTGCCAAC	ACACAACCACCCACAAGTCA	C-X-C motif chemokine receptor 4
DNMT1	GCCATTGGCTTGGAGATCA	AGCAGCTTCCCTCCTCTTTA	DNA methyltransferase 1
DUSP1	AGACATCAGCTCCTGGTTCA	CAGTGGACAAACACCTTCC	dual specificity phosphatase 1
EGFR	AGTGTAAGAAGTGCGAAGGG	TCGTAGCATTTATGGAGAGTGAG	epidermal growth factor receptor
ERCC1	AACCCGGGGCAAAATCCAA	CACATTGCGCACGAACTTCA	ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit
FGFR2	TGCTGAAGGAAGGACACAGAA	ATGCCAACAGTCCCTCATCA	fibroblast growth factor receptor 2

Anexo A - Genes analisados e desenho dos primers para plataforma Fluidigm – Parte 2

FLOT2	AAACGTCGTCCTGCAGACC	ACTGGTCCCGGTCCTGATAAA	flotillin 2
GAPDH	GAACGGGAAGCTTGTCATCAA	ATCGCCCCACTTGATTTTGG	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA3	CACGGTGCAGAGGTACCC	AGGGTAGGGATCCATGAAGCA	GATA binding protein 3
GUSB	CTTCGAGGAGCAGTGGTAC	TCATTGAAGCTGGAGGGAAC	glucuronidase beta
HES1	CAACACGACACCGGATAAAC	TGCTCTTCGTCTTTTCTCCA	hes family bHLH transcription factor 1
HEY1	TGCGCGTTATCTGAGCATCA	TGAGATGCGAAACCAGTCGAA	hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif 1
HIF1A	CCGCTGGAGACACAATCATA	CCTCAAGTTGCTGGTCATCA	hypoxia inducible factor 1 alpha subunit
HMGA2	CACTTCAGCCCAGGGACAAC	TTGCTGCCTTTGGGTCTTCC	high mobility group AT-hook 2
HMGB1	CCCAGATGCTTCAGTCAACT	TGTCCGCTTTTGCCATATCT	high mobility group box 1
HPRT1	GCACTGAATAGAAATAGTGATAGATCC	CTTCCAGTTAAAGTTGAGAGATCA	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IGF1R	ACAGGGATCTCATCAGCTTCAC	CAGGCATCCTGCCATCATA	insulin like growth factor 1 receptor
IL17A	ACTACAACCGATCCACCTCAC	ACTTTGCCTCCCAGATCACA	interleukin 17A
IL18	ACCAAGGAAATCGGCCTCTA	ACCTCTAGGCTGGCTATCTTTA	interleukin 18
IL1A	CTGCCCAAGATGAAGACCAA	AGGAGGTTGGTCTCACTACC	interleukin 1 alpha
IL1B	GACCTGAGCACCTTCTTTCC	CGTGCACATAAGCCTCGTTA	interleukin 1 beta
IL1R1	AGAACAAGCCTCCAGGATTCA	CCTGAATCCTCCACCTTAGCA	interleukin 1 receptor type 1
IL6	AGAGCTGTGCAGATGAGTACAA	GTTGGGTGAGGGGTGGTTA	interleukin 6
KLF4	CTGCGGCAAAACCTACACAA	CGTCCCAGTCACAGTGGTAA	Kruppel like factor 4
KRAS	GGGAGGGCTTTCTTTGTGTA	ACTAGGACCATAGGTACATCTTCA	KRAS proto-oncogene, GTPase
LAMC2	AGAAGCACAGCAGCTCTTACA	TAGCAAGATTGGCACGGGAA	laminin subunit gamma 2
LATS1	CAGCAGCTGCCAGACCTATTAA	TCCAGCTCTGTTTGCGGTAA	large tumor suppressor kinase 1
LATS2	CTGGTGGGGACTCCAAACTAC	CCAACACTCCACCAGTCACA	large tumor suppressor kinase 2
LIN28A	CATGCAGAAGCGCAGATCAA	GGTGGCAGCTTGCAATTCC	lin-28 homolog A
LOX	TTTCTTACCCAGCCGACCAA	TCAAGCAGGTCATAGTGGCTAA	lysyl oxidase
MCL1	TGGGTTTGTGGAGTTCTTCCA	CTCCAGCAACACCTGCAAAA	MCL1, BCL2 family apoptosis regulator
MITF	CAGCCCCATGGCTATGCTTA	CTGCCCTGTTTTGCTCTTCAAA	melanogenesis associated transcription factor
MLH1	GACACTACCCAATGCCTCAAC	TTGAAGGCTAGGGTTTTATCCTCA	mutL homolog 1
MMP12	GGCCCGTATGGAGGAAACA	TCCGGATTGCGTAGTCAACA	matrix metalloproteinase 12
MMP9	AGTGGCACCACCACAACA	GCAAAGGCGTCGTCAATCA	matrix metalloproteinase 9
MOB1A	TGAAGCAAGCTGTCCAGTCA	AGTCAATGTATTTGGTGCAGAACA	MOB kinase activator 1A
MOB1B	GAGAGTTGTCCAGTGATGTCA	GTCCTGAACCCAAGTCATCA	MOB kinase activator 1B
MUC1	TAGCAGTACCGATCGTAGCC	CCACTGCTGGGTTTGTGTAA	mucin 1, cell surface associated
MYC	CCTGGTGTCTCCATGAGGA	CCTGCCTCTTTCCACAGAAA	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor

Anexo A - Genes analisados e desenho dos primers para plataforma Fluidigm– Parte 3

NANOG	TGCCTTGCTTTGAAGCATCC	TTTCTTCAGGCCCACAAATCAC	Nanog homeobox
NLRP3	TCGGAGACAAGGGGATCAAA	CGTGAGGTTGCAGTTGTCTA	NLR family pyrin domain containing 3
NOS2	CTCACAGCCTTTGGACCTCA	GAGATTTGAGCCTCATGGTGAAC	nitric oxide synthase 2
NOTCH1	ACGGCGTGAACACCTACAA	TGGCACTCGTCCACATCC	notch 1
NOTCH4	CTCTCTGGCCAATGCCTTCTA	TGGCAGGGGTCTATCTCCA	notch 4
PARP1	TTCTGGAGGACGACAAGGAA	GTTGCTACCGATCACCGTAC	poly(ADP-ribose) polymerase 1
PCNA	TCTGAGGGCTTCGACACCTA	CATTGCCGGCGCATTTTAGTA	proliferating cell nuclear antigen
POU5F1	GTGCCTGCCCTTCTAGGAA	AAAACCCTGGCACAACCTCC	POU class 5 homeobox 1
PPARGC1A	ACTTTTGTGGACGCAAGCAA	TGGAAGCAGGGTCAAAGTCA	PPARG coactivator 1 alpha
PROM1	GGCCAGTACAACACTACCAA	CAAGAATTCCGCCTCCTAGCA	prominin 1
PTEN	CCAGACATGACAGCCATCA	AGTCTTTCTGCAGGAAATCCC	phosphatase and tensin homolog
RHOA	AGCCGGTGAAACCTGAAGAA	TGGTCTTTGCTGAACACTCCA	ras homolog family member A
RPLP0	GCGACCTGGAAGTCCAAC	CACATTGTCTGCTCCCACAA	ribosomal protein lateral stalk subunit P0
SAV1	TCCTGACTGGCTTCAGGTTTAC	GCTGGAAGAGTTCCCACTTCA	salvador family WW domain containing protein 1
SNAI1	CCCAATCGGAAGCCTAACTACA	GTAGGGCTGCTGGAAGGTAAG	snail family transcriptional repressor 1
SOX2	CATGAAGGAGCACCCGGATTA	CGGGCAGCGTGTACTTATCC	SRY-box 2
ST8SIA1	CGTGGAGGAGGAACCAGAC	GGTCGCAGCAGTCTTCCA	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1
STAT3	AGCATCGAGCAGCTGACTAC	CCATGTGATCTGACACCCTGAA	signal transducer and activator of transcription 3
STK3	GGAACAGCAACGAGAATTGGAA	ACCATGGTGTGGGAATCCA	serine/threonine kinase 3
STK4	TTGCAGATTTTGGGGTAGCA	GCCATCCAAAATGGTGTTC	serine/threonine kinase 4
TAZ	TTCAGTGCCCTGCCTGTAC	AAGTCCGTCAGGGCTTTCC	tafazzin
TFRC	CCAGTTGGAGTGCTGGAGAC	AGCCTTTAAATGCAGGGACGAA	transferrin receptor
TGFB1	CTACTACGCCAAGGAGGTCAC	GCTGTGTGTACTCTGCTTGAAC	transforming growth factor beta 1
TNFRSF1A	CCACAAGCCACAGAGCCTA	GCCGCACGAATTCCTTCC	TNF receptor superfamily member 1A
TOP2A	GGCGTTTGATGGATGGAGAA	GAGCCAGTTCTTCAATAGTACCC	topoisomerase (DNA) II alpha
TP53	GACTGTACCACCATCCACTACA	AAAGCTGTTCCGTCCAGTA	tumor protein p53
TWIST1	TCAGCAGGGCCGGAGA	CCAGAGTCTCTAGACTGTCCATT	twist family bHLH transcription factor 1
TWIST2	AGCAAGATCCAGACGCTCAA	TCGTGCTCTGCAGGAC	twist family bHLH transcription factor 2
VEGFA	GAGGAGGGCAGAATCATCAC	GTCTCGATTGGATGGCAGTA	vascular endothelial growth factor A
VIM	TGCAGGAGGAGATGCTTCA	CCAGAGACGCATTGTCAACA	vimentin
XRCC1	AGAACACGGACAGTGAGGAAC	AAGTGCTTGCCCTGGAAGAA	X-ray repair cross complementing 1
YAP1	AACCCAGATGACTTCCTGAA	GCAGGGTGCTTTGGTTGATA	Yes associated protein 1
ZEB1	TCCAAGAACCACCCTTGAAA	GCGGTGTAGAATCAGAGTCA	zinc finger E-box binding homeobox 1

Anexo B - Desenho da placa utilizada na plataforma Fluidigm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ABCB1 1	ABCB5 2	ABCC1 3	ABCC2 4	ABCC3 5	ABCC5 6	ABCG2 7	ACTA2 8	ACVR1B 9	AKT1 13	ALDH1A1 14	ALDH3A1 15
B	DUSP1 64	EGFR 67	ERCC1 73	FGFR2 80	FLOT2 81	GATA3 93	HES1 101	HEY1 102	HIF1A 103	HMGA2 104	HMGB1 105	IGF1R 113
C	ATM 20	BAX 25	BCL2 27	BCL2L1 28	BIRC5 29	BMP7 31	CASP1 34	CD34 39	CD44 40	CDH1 42	CXCR4 58	DNMT1 63
D	IL17A 114	IL18 115	IL1A 116	IL1B 117	IL1R1 118	IL6 121	KLF4 130	KRAS 135	LAMC2 136	LATS1 137	LATS2 138	LIN28A 141
E	LOX 142	MCL1 148	MITF 151	MLH1 152	MMP12 154	MMP9 156	MOB1A 157	MOB1B 158	MUC1 161	MYC 163	NANOG 165	NLRP3 171
F	NOS2 174	NOTCH1 175	NOTCH4 176	PARP1 182	PCNA 183	POU5F1 196	PPARGC1A 197	PROM1 199	PTEN 203	RHOA 209	SAV1 215	SNAI1 225
G	SOX2 228	ST8SIA1 232	STAT3 234	STK3(MST2) 236	STK4(MST1) 237	TAZ 238	TGFB1 244	TNFRSF1A 249	TOP2A 251	TP53 254	TWIST1 260	TWIST2 261
H	VEGFA 263	VIM 264	XRCC1 269	YAP1 270	ZEB1 272	ACTB A	B2M B	GAPDH C	GUSB D	HPRT1 E	RPLPO F	TFRC G

Anexo C - Resultados preliminares do laboratório de Oncologia Experimental (CTO/ICESP)

➤ Análise por citometria de fluxo

Figura 1 - Análise das células CD20-positivas marcadas com anticorpo primário quimérico anti-CD20 (rituximabe) e anticorpo secundário anti-*mouse* FITC. Detecção na linhagem de melanoma murino B16F10 utilizando o citômetro Attune (Life Technologies) (A), e linhagem de explante de melanoma de camundongo, Tm1EE, utilizando o FACSCalibur (BD) (B). No eixo X, tamanho relativo das células; no eixo y, quantidade de fluorescência. As células com expressão elevada de CD20 apresentam-se destacadas pelo círculo em vermelho.

Tabela 1 - Porcentagem de células CD20-positivas em cultura de monocamada contendo linhagens celulares de diferentes tipos histológicos de melanomas murino e humanos. Detecção realizada por citometria de fluxo, utilizando como anticorpo primário o rituximabe.

Linhagem Celular	Tipo Histológico	Células CD20 ⁺ em cultura de monocamada
UACC62	Melanoma humano; não epitelial	15 - 30%
SKMel37	Melanoma humano	10 - 25%
SKMel147	Melanoma humano	25 – 75%
SKMel29	Melanoma humano	2 -30%
B16F10	Melanoma murino (<i>Mus musculus</i>)	20 – 45%
Tm1E	Melanoma explantado de <i>Mus musculus</i>	20%
Tm1DE	Melanoma explantado de <i>Mus musculus</i>	18%
Tm1EE	Melanoma explantado de <i>Mus musculus</i>	15%

Anexo C - Resultados preliminares do laboratório de Oncologia Experimental (CTO/ICESP)

➤ Análise de detecção de radiofármaco *in vivo*

Figura 2 - Imagens da captação do radiofármaco Rituximabe-Tc^{99m} nos implantes subcutâneos de melanoma (linhagem B16F10), sendo feitas por aquisições pelo CT, SPECT/CT e o SPECT.

Anexo D – Padronização das análises imunofenotípicas de células CD20-positivas por citometria de fluxo – Parte 1

Figura 1 – Padronização da análise imunofenotípica de células CD20-positivas utilizando a linhagem celular Toledo (Linfoma Não Hodgkin). Demonstração dos gráficos: SSC-A por FSC-A, do histograma BL1-A e do gráfico do tipo *dot plot* BL1-A por FSC-A, com a amostra de Autofluorescência da célula.

Anexo D – Padronização das análises imunofenotípicas de células CD20-positivas por citometria de fluxo – Parte 2

Figura 2 – Resultado da análise imunofenotípica de células CD20-positivas utilizando as linhagens celulares: Toledo (controle positivo) (I), H1299 (controle negativo) (II), e SK-MEL-147 (linhagem de melanoma humano) (III). Demonstração dos gráficos: SSC-A por FSC-A e do tipo *dot plot* BL1-A por FSC-A, para os controles de Autofluorescência, Anticorpo Secundário e Isotipo, e para a marcação com anticorpo anti-CD20.

Anexo E – Padronização da detecção de células CD20-positivas por imunofluorescência

Figura 1 - Padronização e identificação de células CD20-positivas pela técnica de imunofluorescência, utilizando 3% e 5% de bloqueio com albumina sérica (BSA), massa de 2,8 µg de RTX-FITC e marcação de DNA por Hoechst (1:500). Imagens de tecidos de linfonodo humano (controle positivo) e tecido tumoral de camundongo inoculado com células SK-Mel-147, em aumento de 200X. Na ultima linha a demonstração do Merge com as duas fluorescências.

REFERÊNCIAS

- Abdalla DR, Aleixo AA, Murta EF, Michelin MA. Innate immune response adaptation in mice subjected to administration of DMBA and physical activity. *Oncol. Lett.* 2014; 7, 886–890.
- Afonso VM, Eikelboom R. Relationship between wheel running, feeding, drinking, and body weight in male rats. *Physiol Behav.* 2003 Oct;80(1):19-26.
- Algire GH, Chalkley HW. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 1945; 6: 73–85.
- AL-Nahhas A, Win Z, Szyszko T, Singh A, Nanni C, *et al.* Gallium-68 PET: a new frontier in receptor cancer imaging. *Anticancer Res* 2007; 27(6B), 4087-4094.
- Alves CR, da Cunha TF, da Paixão NA, Brum PC. Aerobic exercise training as therapy for cardiac and cancer cachexia. *Life Sci.* 2015; 125:9-14.
- Aponte PM & Caicedo A. Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. *Stem Cells Int.*, 2017; 2017: 5619472.
- Arjaans M, Oude Munnink TH, Oosting SF, Terwisscha van Scheltinga AG, Gietema JA, *et al.* Bevacizumab-induced normalization of blood vessels in tumors hampers antibody uptake. *Cancer Res.* 2013 J;73(11):3347-55.
- Ashcraft KA, Peace RM, Betof AS, Dewhirst MW, Jones LW. Efficacy and Mechanisms of Aerobic Exercise on Cancer Initiation, Progression, and Metastasis: A Critical Systematic Review of In Vivo Preclinical Data. *Cancer Res.* 2016; 15;76(14):4032-50 .
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, Thompson jf, atkins M, *et al.* Melanoma Staging and Classification *J Clin Oncol* 2009; 27, 6199-6206.
- Baluk P, Morikawa S, Haskell A, Mancuso M, McDonald DM. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol.* 2003; 163(5):1801-15.
- Bao B, Aamir Ahmad, Asfar S. Azmi, Shadan Ali, Fazlul H. Sarkar. Cancer Stem Cells (CSCs) and Mechanisms of Their Regulation: Implications for Cancer Therapy *Curr Protoc Pharmacol.* 2013; Jun; 0 14: Unidade–14.25.
- Betof AS, Lascola CD, Weitzel D, Landon C, Scarbrough PM, *et al.* Modulation of murine breast tumor vascularity, hypoxia and chemotherapeutic response by exercise. *J Natl Cancer Inst.* 2015, 107(5).
- Bhat-Nakshatri P, Appaiah H, Ballas C, Pick-Franke P, Goulet R, *et al.* SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. *BMC Cancer* 2010; 10, 411.

Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Aug 3;406(6795):536-40.

Bonnet D & Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3:730–737.

Bourgeois AC, Chang TT, Fish LM, Bradley YC. Positron Emission Tomography/Computed Tomography in Melanoma. *Radiologic Clinics of North America* 2013; 51, 5, 865–879.

Brinckerhoff CE, Cancer Stem Cells (CSCs) in melanoma: There's smoke, but is there fire? *J Cell Physiol*. 2017; Oct;232(10):2674-2678.

Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Research* 1998; 58:1408–1416.

Brown JM. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy- Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Research* 1999; 59:5863–70.

Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473(7347):298-307, Review.

Carmeliet P, Rakesh J. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249–257 (2000).

Carmona-Fontaine C, Deforet M, Akkari L, Thompson CB, Joyce JA, Xavier JB. Metabolic origins of spatial organization in the tumor microenvironment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, 2934–2939 (2017).

Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, et al. Mosaic blood vessels in tumors: Frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97:14608–14613.

Chaplin DJ, Olive PL, Durand RE. Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer Res* 1987; 47: 597–601.

Chiarion SV, Nortilli R., Aversa SM, Paccagnella A, Medici M., et al. Phase II randomized study of dacarbazine, carmustine, cisplatin and tamoxifen versus dacarbazine alone in advanced melanoma patients. *Melanoma Res* 2001; 11(2), 189-196.

Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014; 513 559–563 (2014).

Cormie P, Zopf EM, Zhang X, Schmitz KH. The Impact of Exercise on Cancer Mortality, Recurrence, and Treatment-Related Adverse Effects. *Epidemiol Rev*. 2017; 39(1):71-92.

Crippa F, Leutner M, Belli F, Gallino F, Greco M, et al. Which kinds of lymph node metastases can FDG PET detect? A clinical study in melanoma. *J Nucl Med* 2000; 41(9), 1491-1494.

Csete M. Oxygen in the cultivation of stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; May;1049:1-8.
Das M & Law S. Role of tumor microenvironment in cancer stem cell chemoresistance and recurrence. *Int J Biochem Cell Biol.*, 2018 Oct; 103:115-124.

Dewhirst MW. Concepts of oxygen transport at the microcirculatory level. *Seminars in Radiation Oncology* 1998; 8:143–150.

Dieu-Nosjean MC, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Sautes-Fridman C. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol Rev* (2016) 271:260–75.

Dieu-Nosjean MC, Goc J, Giraldo NA, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol* (2014) 35:571–80.

Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther.*, 2018; 7: 35–49.

Eikelboom R, Mills R. A microanalysis of wheel running in male and female rats. *Physiol Behav.* 1988; 43(5):625-30.

Elice F, Rodeghiero F. Side effects of anti-angiogenic drugs. *Thromb Res.* 2012 Apr;129 Suppl 1:S50-3.

Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006; 440:1222–1226.

Evans ES, Hackney AC, McMurray RG, Randell SH, Muss HB, Deal AM, Battaglini CL. Impact of Acute Intermittent Exercise on Natural Killer Cells in Breast Cancer Survivors. *Integr Cancer Ther.* 2015 Sep;14(5):436-45.

Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R., Kulp AN, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 2005; 65(20), 9328-9337.

Fortes C, Mastroeni S, Mannooranparampil TJ, Passarelli F, Zappalà A, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict cutaneous melanoma survival. *P Melanoma Res* 2015; 25(4):306-11.

Fukumura D, Duda D, Munn L, Rakesh J. Tumor Microvasculature and Microenvironment: Novel Insights Through Intravital Imaging in Pre-Clinical Models. *Microcirculation* 2010; 17(3): 206–225.

Fukumura D, Kashiwagi S, Rakesh J. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(7):521-34.

Fuss J, Ben Abdallah NM, Vogt MA, Touma C, Pacifici PG, et al. Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*. 2010 Mar; 20(3):364-76.

Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood J. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist* 2011; 16, 5–24.

GeurtsvanKessel CH, Willart MA, Bergen IM, van Rijt LS, Muskens F, Elewaut D, Osterhaus AD, Hendriks R, Rimmelzwaan GF, Lambrecht BN. Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *J Exp Med*. 2009 Oct 26;206(11):2339-49.

Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Polychronidis A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Differential assessment of angiogenic activity and of vascular survival ability (VSA) in breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19(8):673-9.

Glass OK, Bowie M, Fuller J, Darr D, Usary J, Boss K, Choudhury KK, Liu X, et al. Differential response to exercise in claudin-low breast cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(60): 100989–101004.

Gogas H, Polyzos A., Kirkwood J. Immunotherapy for advanced melanoma: Fulfilling the promise. *Cancer Treatment Reviews* 2013; 39, 8, 879–885.

Goldsmith SM. A unifying approach to the clinical diagnosis of melanoma including “D” for “Dark” in the ABCDE criteria. *Dermatol Pract Concept* 2014; 4(4), 75–78.

Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT, Götte M. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytometry A* 2012; 81(4):284-93.

Harris RA. Spatial, Temporal, and Functional Aspects of Macrophages during “The Good, the Bad, and the Ugly” Phases of Inflammation. *Front Immunol*. 2014; 5: 612.

Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2012; 28, 380(9839), 358-365.

Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R. Tertiary Lymphoid Organs in Cancer Tissues. *Front Immunol*. 2016; 7: 244.

Hoek K, Goding C. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010; Dec;23(6):746-59.

Hsu DM, Agarwal S, Benham A, Coarfa C, Trahan DN, et al. G-CSF receptor positive neuroblastoma subpopulations are enriched in chemotherapy-resistant or relapsed tumors and are highly tumorigenic. *Cancer Res* 2013; 73(13), 4134-4146.

Hutchinson OC, Collingridge DR., Barthel H, Price PM., Aboagye EO. Pharmacokinetics of Radiolabelled Anticancer Drugs for Positron Emission Tomography. *Current Pharmaceutical Design* 2003; 9, 917-929.

Idorn M & Hojman P. Exercise-Dependent Regulation of NK Cells in Cancer Protection. *Trends Mol Med.* 2016; 22(7):565-577.

John AH, Mark H, Michael JJ, Juleen R. *Integrative Biology of Exercise Review* 2014; 159, 4, 6:738-749.

Jones LW, Eves ND, Courneya KS, Chiu BK, Baracos VE, Hanson J, Johnson L, Mackey JR. Effects of exercise training on antitumor efficacy of doxorubicin in MDA-MB-231 breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res.* 2005 Sep 15; 11(18):6695-8.

Jones LW, Viglianti BL, Tashjian JA, Kothadia SM, Keir ST, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *J Appl Physiol.* 2010 Feb; 108(2):343-8.

Jones, LW & Alfano CM. . Exercise-oncology research: Past, present, and future. *Acta Oncol* 2013 Pages 195-215.

Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev.* 2010;16:105-18.

Kleynhans J, Grobler AF, Ebenhan T, Sathekge MM, Zeevaart JR. Radiopharmaceutical enhancement by drug delivery systems: A review. *J Control Release.* 2018 Oct 10;287:177-193.

Kock LL & Rohn I. Observations on the Use of the Exercise-Wheel in Relation to the Social Rank and Hormonal Conditions in the Bank Vole (*Clethrionomys glareolus*), and the Norway Lemming (*Lemmus lemmus*). *Z Tierpsychol.* 1971; Pages 180-195; Volume 29, Issue2.

Koelwyn GJ, Quail DF, Zhang X, White RM, Jones LW. Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 2017; 25;17(10):620-632.

Köhler C, Nittner D, Rambow F, Radaelli E, Stanchi F, et al. Mouse Cutaneous Melanoma Induced by Mutant BRAF Arises from Expansion and Dedifferentiation of Mature Pigmented Melanocytes. *Cell Stem Cell.* 2017; 2;21(5):679-693.e6.

Kristin A. Higgins, Dongkyoo Park, Gee Young Lee, Walter J. Curran, Xingming Deng. Exercise-Induced Lung Cancer Regression: Mechanistic Findings From a Mouse Model. *Cancer.* 2014 Nov 1; 120(21): 3302–3310.

Kumar D, Gorain M, Kundu G. Therapeutic implications of cellular and molecular biology of cancer stem cells in melanoma. *Mol Cancer* 2017; Jan 30;16(1):7.

La Porta CA. Mechanism of Drug Sensitivity and Resistance in Melanoma. *Current Cancer Drug Targets* 2009; 9, 391-397.

Leandro CG, de Lima TM, Alba-Loureiro TC, do Nascimento E, Manhães de Castro R, de Castro CM, Pithon-Curi TC, Curi R. Stress-induced downregulation of macrophage phagocytic function is attenuated by exercisetraining in rats. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14(1):4-7.

Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:605-31.
Li Y & Zhu B. Editorial: Metabolism of Cancer Cells and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.*, 2018; 9: 3080.

Li Z & Rich JN. Hypoxia and Hypoxia Inducible Factors in Cancer Stem Cell Maintenance. Diverse Effects of Hypoxia on Tumor Progression, 21–30. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;345:21-30.

Lightfoot JT, Turner MJ, Daves M, Vordermark A, Kleeberger SR. Genetic influence on daily wheel running activity level. *Physiol Genomics*. 2004 Nov 17;19(3):270-6.

Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; 5, 67.

Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 2005; Jan;23(1):47-55.

Manzano JL, Layos L, Bugés C, Llanos GM, Vila L, Martínez-Balibrea E, Martínez-Cardús A. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med*. 2016 Jun; 4(12): 237.

McCullough DJ, Nguyen LM, Siemann DW, Behnke BJ. Effects of exercise training on tumor hypoxia and vascular function in the rodent preclinical orthotopic prostate cancer model. *J Appl Physiol*. Volume 115 Issue 12 December 2013 Pages 1846-1854.

McCullough DJ, Stabley JN, Siemann DW, Behnke BJ. Modulation of blood flow, hypoxia, and vascular function in orthotopic prostate tumors during exercise. *J Natl Cancer Inst*. 2014; 106(4):dju036.

Meijs WE, Herscheid JD, Haisma HJ, Pinedo HM. Evaluation of desferal as a bifunctional chelating agent for labeling antibodies with Zr-89. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation A: Applied Radiation and Isotopes* 1992; 43, 12, 1443–1447.

Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract* 2012;2012:743193.

Moon H, Donahue LR, Choi E, Scumpia PO, Lowry WE, et al. Melanocyte Stem Cell Activation and Translocation Initiate Cutaneous Melanoma in Response to UV Exposure. *Cell Stem Cell*. 2017; 2;21(5):665-678.e6.

Morris HP. AMPLE EXERCISE AND A MINIMUM OF FOOD AS MEASURES FOR CANCER PREVENTION? *SCIENCE* 1945; Vol. 101, Issue 2627, pp. 457-459.

Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Hartson L, Kusser K, Tighe MP, Klonowski KD, et al. Persistence and responsiveness of immunologic memory in the absence of secondary lymphoid organs. *Immunity* (2006) 25:643–54.

Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, et al. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med* (2004) 10:927–34.

Murphy EA, Davis JM, Brown AS, Carmichael MD, Mayer EP, Ghaffar A. Effects of moderate exercise and oat beta-glucan on lung tumor metastases and macrophage antitumor cytotoxicity. *J Appl Physiol* (1985) 2004; 97(3):955-9.

Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010; 16;468(7326):973-7.

Noman MZ, Hasmin M, Messai Y, Terry S, Kieda C, et al. Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015, 309(9): C569–C579.

Nora AB, Panarotto D, Lovatto I, Boniatti m. Frequency of counseling for skin cancer prevention by the various specialties in Caxias do Sul. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2004; 79(1), 45-51.

Northcott J, Dean I, Mouw J, Weaver V. Feeling Stress: The Mechanics of Cancer Progression and Aggression. *Front Cell Dev Biol* 2018; 6: 17.

Olivotto M & Dello SP. Environmental restrictions within tumor ecosystems select for a convergent, hypoxia-resistant phenotype of cancer stem cells. *Cell Cycle* 2008; 7(2), 176-187.

Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, et al. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* 2004; 427(6976):695.

Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13(7):497-512.

Pedersen L, Idorn M, Olofsson GH, Lauenborg B, Nookaew I, Hansen RH, Johannesen HH, Becker JC, Pedersen KS, Dethlefsen C, Nielsen J, Gehl J, Pedersen BK, Thor Straten P, Hojman P. Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK. *Cell Metab*. 2016 Mar 8;23(3):554-62.

Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003; 3:347–361.

Pinc A, Somasundaram R, Wagner C, Hörmann M, Karanikas G, et al. Targeting CD20 in melanoma patients at high risk of disease recurrence. *Mol Ther* 2012; 20(5), 1056-1062.
Potter VR. *SCIENCE* 1945, 101: 105.

Pyne DB, Baker MS, Fricker PA, McDonald WA, Telford RD, et al. Effects of an intensive 12-wk training program by elite swimmers on neutrophil oxidative activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1995; 27, 536–542.

Qin Y, Roszik J, Chattopadhyay C, Hashimoto Y, Liu C, Cooper ZA, Wargo JA, Hwu P, Ekmekcioglu S, Grimm EA. Hypoxia-Driven Mechanism of Vemurafenib Resistance in Melanoma. *Mol Cancer Ther.* 2016 Oct;15(10):2442-2454.

Qin Y, Roszik J, Chattopadhyay C, Hashimoto Y, Liu C, et al. Hypoxia-driven mechanism of vemurafenib resistance in melanoma. *Mol Cancer Ther.* 2016; 15(10): 2442–2454.

Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson T, et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 2008; 456(7222):593-8.

Rakesh J. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell* 2014, 26:605–622.

Rakesh J. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Research* 1988; 48:2641–58.

Rakesh J. Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005; 307:58–62.

Rakesh J. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med*. 2001 Sep;7(9):987-9.

Rakesh J., Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3(1):24-40.

Rao BM & Zandstra PW. Culture development for human embryonic stem cell propagation: molecular aspects and challenges. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; Oct;16(5):568-76.

Richards MP. Activity measured by running wheels and observation during the oestrous cycle, pregnancy and pseudopregnancy in the golden hamster. *Anim Behav.* 1966 Oct;14(4):450-8

Richter SH, Gass P, Fuss J. Resting Is Rusting: A Critical View on Rodent Wheel-Running Behavior, *Neuroscientist*. 2014 Aug; 20(4):313-325.

Roberts, PE. Isolation and Establishment of Human Tumor Stem Cells. *Stem Cell Culture* 2008; 86, 325–342.

Rodriguez AB, Peske JD, Engelhard VH. Identification and Characterization of Tertiary Lymphoid Structures in Murine Melanoma. *Methods Mol Biol.* 2018;1845:241-257.

Roper TJ. Sex differences in circadian wheel running rhythms in the Mongolian gerbil. *Physiology & Behavior* 17(3):549-551, 1976.

Sabatino M, Stroncek DF, Klein H, Marincola FM, Wang E. Stem cells in melanoma development. *Cancer Lett* 2009; 279(2), 119–125.

Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006, 355(24):2542-50.

Sarvi S, Mackinnon AC, Avlonitis N, Bradley M, Rintoul RC, et al. CD133+ cancer stem-like cells in small cell lung cancer are highly tumorigenic and chemoresistant but sensitive to a novel neuropeptide antagonist. *Cancer Res* 2014; 74(5), 1554-1565.

Schadler KL, Thomas NJ, Galie PA, Bhang DH, Roby KC, et al. Tumor vessel normalization after aerobic exercise enhances chemotherapeutic efficacy. *Oncotarget.* 2016; 7(40):65429-65440.

Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008; 451, 345–349.

Sell, S. & Pierce, GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest* 1994; 70, 6–22.

Singh R, Miao T, Symonds AL, Omodho B, Li S, et al. Egr2 and 3 Inhibit T-bet-Mediated IFN- γ Production in T Cells. *J Immunol* 2017; 198(11):4394-4402.

Singh B, Ezziddin S, Palmedo H, Reinhardt M, Strunk H, Preoperative 18F-FDG-PET/CT imaging and sentinel node biopsy in the detection of regional lymph node metastases in malignant melanoma. *Melanoma Res*, 2008; 18(5), 346-52.

Site clinical trials.gov (2018). Análise dos clinical trials utilizando as palavras “cancer” e “exercício”. Data de acesso: 04/12/2018. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Cancer&term=exercise&cntry=&state=&city=&dist=>

Site da Plataforma UNIPROT (2018). Identificação dos polimorfismos do gene MS4A1/CD20. Disponível em <https://www.uniprot.org/uniprot/P11836> Data de acesso: 04/12/2018.

Site do ExPasy contendo as especificações da linhagem de melanoma humano UACC-62 (2018). Disponível em: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1780 Data de acesso em: 04/12/2018

Site do INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. (2018). Estimativa de incidência e mortalidade por cancer no Brasil para 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/> Data de acesso: 04/12/2018.

Site <http://www.clinicaltrials.gov>. Palavras de busca: “melanoma” e “rituximab” Data de acesso: 16/03/2019.

Soengas MS & Patton EE. Location, Location, Location: Spatio-Temporal Cues That Define the Cell of Origin in Melanoma. *Cell Stem Cell*. 2017; 2;21(5):559-561.

Soengas, MS & Lowe, SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003; 22, 3138-3151.

Somasundaram R, Villanueva J, Herlyn M. Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism: role of melanomasubpopulations. *Adv Pharmacol* 2012; 65:335-59.

Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res*. 2004; 64:3731–6.

Tran MA, Watts RJ, Robertson GP. Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009; 22(4), 388–399.

Tsai KK, Zarzoso I, Daud A. PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. *Hum Vaccin Immunother*. 2014 Nov; 10(11): 3111–3116.

Tsuji K, Ojima M, Otabe K, Horie M, Koga H, et al. Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant*. 2017; 26(6): 1089–1102.

Uchida N, Buck D, He D, Reitsma M, Masek M, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97, 14720–14725.

van de Watering FC, Rijpkema M, Perk L, Brinkmann U, Oyen WJ, et al. Zirconium-89 Labeled Antibodies: A New Tool for Molecular Imaging in Cancer Patients. *BioMed Research International* 2014; Volume 2014.

Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Kennedy AS, Novotny DB, Fowler WC Jr, Raleigh JA. Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; Volume 71, Issue 2, Pages 270–277.

Ventola CL. Cancer Immunotherapy, Part 1: Current Strategies and Agents. *Pharmacy and Therapeutics*. 2017 Jun; 42(6): 375–383.

Vermeulen PB, Verhoeven D, Hubens G, Van Marck E, Goovaerts G, et al. Microvessel density, endothelial cell proliferation and tumour cell proliferation in human colorectal adenocarcinomas. *Ann Oncol*. 1995 Jan; 6(1):59-64.

Villanueva J. & Herlyn M. Melanoma and the Tumor Microenvironment. *Curr Oncol Rep*. 2008 Sep; 10(5): 439–446.

Vukovic V, Tannock IF. Influence of low pH on cytotoxicity of paclitaxel, mitoxantrone and topotecan. *Br J Cancer*. 1997;75(8):1167-72.

Wagner JD, Schauwecker D, Davidson D, Logan T, et al. Inefficacy of F-18 fluorodeoxy-D-glucose-positron emission tomography scans for initial evaluation in early-stage cutaneous melanoma. *Cancer* 2005; 104(3), 570-579.

Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc. Immunol. Rev*. 2011; 17, 6–63.

Wiley JA, Richert LE, Swain SD, Harmsen A, Barnard DL, Randall TD, Jutila M, Douglas T, Broomell C, Young M, Harmsen A. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue elicited by a protein cage nanoparticle enhances protection in mice against diverse respiratory viruses. *PLoS One*. 2009 Sep 23;4(9):e7142

Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: Role of oxygenation, angiopoietin-1 and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 2004; 6:553–563.

Wylie A, Schoepfer J, Jahnke W, Cowan-Jacob SW, Loo A, et al. The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of *BCR-ABL1*. *Nature*. 2017; Mar 30;543(7647):733-737.

Zhang Y, Hong H, Cai W. PET tracers based on Zirconium-89. *Curr Radiopharm*, 2011; 4(2), 131-139.

Apêndice A - Aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP para a realização do projeto do Capítulo 1 (Protocolo de Pesquisa nº 100/17)

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “ANÁLISE DA FUNÇÃO VASCULAR DE TUMORES DE MELANOMA HUMANO ENXERTADO COM LINHAGENS BRAFV600E EM CAMUNDONGOS QUE FORAM EXPOSTOS A ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA”, registrada com o nº 100/17, sob a responsabilidade de Roger Chammas e Janio da Silva Mororo, apresentada pelo ICESP - que envolve a produção, manutenção e/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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 05.07.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 13-06-2017 Término: 12-11-2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo NOD/SCID
Nº de animais	65
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 05 de Julho de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Apêndice B - Aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP para a realização do projeto do Capítulo 2 (Protocolo de Pesquisa nº 031/15)

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/02/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 031/15 intitulado: “Análise da sub-população de células de melanoma CD20+ e o comportamento destas células mediante tratamento com quimioterápicos, utilizando detecção por imagem radionuclídica” que utilizará 94 animais da espécie **camundongo**, apresentado pelo Departamento de Radiologia e Oncologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Roger Chammas

Pesquisador (a) Executante: Janio da Silva Mororo

CEUA-FMUSP, 25 de Fevereiro de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Apêndice C – Primeira página do artigo de colaboração aceito para publicação

Organic & Biomolecular Chemistry

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 5275

Synthesis of hydrophilic HYNIC-[1,2,4,5]tetrazine conjugates and their use in antibody pretargeting with $^{99m}\text{Tc}^{\dagger}$

Maria Fernanda Garcia,^{a*} Fabio Gallazzi,^b Mara de Souza Junqueira,^c Marcelo Fernández,^a Ximena Camacho,^a Janio da Silva Mororó,^c Daniele Faria,^d Camila de Godoi Carneiro,^d Marcos Couto,^e Federico Carrión,^f Otto Pritsch,^{f,g} Roger Chammas,^h Thomas Quinn,^b Pablo Cabral^a and Hugo Cerecetto^{b,*}

Pretargeted imaging, based on the highly reactive process between [1,2,4,5]tetrazines with *trans*-cyclooctene (TCO), appears as an attractive strategy to overcome disadvantages associated with traditional radioimmunoconjugates. To be successful, the radiolabeled component should react *in vivo* with the conjugated antibody and the non reactive excess clear fast from the organism. Herein, we explore the *in vivo* effects of hydrophilic linker incorporation into [1,2,4,5]tetrazine systems bearing a 6-hydrazinonicotinyl (HYNIC) moiety for technetium-99m coordination. Incorporation of a polypeptide chain containing hydrophilic aminoacids, resulted in a derivative with renal clearance. Pretargeted bevacizumab imaging was used as proof of concept.

Received 28th May 2018,
Accepted 28th June 2018

DOI: 10.1039/c8ob01255e
rsc.li/obc

Introduction

Imaging is an essential tool in cancer detection and medical practice.¹ Moreover, the search for new molecular imaging probes for cancer diagnosis is an intense area of research.² The ultimate goal is to visualize *in vivo* and through a non-invasive technique, the expression of relevant molecules involved in the tumoral process by the selective accumulation of the imaging agent on the malignant tissue.

For several years, radiolabelled monoclonal antibodies (mAb) have been studied as targeting vehicles for imaging and therapeutics purpose.^{3–5} Their high specificity and affinity for tumour antigens, and the stability of their structures, have been

attractive features.⁵ However, mAb pharmacokinetic properties limit their application in nuclear imaging. The slow clearance of radioimmunoconjugates increases their circulation time and signal in non-target tissues.^{6–9} One of the alternatives to overcome this problem has been the application of pretargeted strategies, where the labelling process occurs *in vivo*, after the recognition of the targeting molecule.^{9–16} For this approach, the non-radioactive mAb is first conjugated with a functional group or tag, administered in the organism, allowed to accumulate in the tumour and clear from the blood. Then, a radiolabelled molecule that will specifically react *in vivo* with the tagged-mAb is injected.^{14,15} The radiolabelled molecule is designed to react fast with the pretargeted mAb or quickly clear from the organism reducing the accumulation in non-target organs.^{9,12}

The pretargeting concept and its applications have been expanded since the description of bioorthogonal reactions. Defined by Bertozzi, bioorthogonal chemistry refers to a group of selective reactions that can occur selectively on living organisms.^{17–19} Of the reactions described as bioorthogonal, the Inverse Electron-Demand Diels-Alder (IEDDA) cycloaddition of [1,2,4,5]tetrazines (TZ) with highly reactive *trans*-cyclooctene (TCO) has gained great attention for *in vivo* pretargeting imaging.^{20–22} The exceptionally fast kinetic properties shown by this, in the absence of catalyst, makes it suitable for *in vivo* application.^{22,24} Several pretargeted approaches are under investigation for *in vivo* radiolabelling of biomolecules using the TZ-TCO reaction.^{22–29} The majority of the approaches focus on the conjugation of the mAb with TCO (first specie to

^aCentro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 2655, 11400 Montevideo, Uruguay.
E-mail: hcercetto@cieln.edu.uy

^bDepartment of Biochemistry, University of Missouri, Columbia, MO 65201, USA

^cCentro de Investigación Translacional em Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brazil

^dMedicina Nuclear, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brazil

^eLaboratório de Química Orgânica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguaçu 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^fUnidad de Biofísica de Proteínas, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo 2020, 11400 Montevideo, Uruguay

^gDepartamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Av. GmL Flores 2125, 11200 Montevideo, Uruguay

[†]Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8ob01255e